

Université de Montréal

**Caractérisation de molécules antibiofilm
produites par des souches de staphylocoques
isolées dans des cas de mammite bovine**

par Coralie Goetz

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

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

Juillet 2018

© Coralie Goetz, 2018

Résumé

Le biofilm bactérien est une communauté de bactéries qui s'agrègent en un amas structuré recouvert d'une matrice polymérique et adhèrent sur une surface biotique ou abiotique. Ce mode de vie permet à ces bactéries de survivre dans un environnement hostile et cela entre autres grâce à une plus grande résistance aux antibiotiques que les bactéries sous forme libre ou planctonique. Les bactéries ayant la capacité de former des biofilms constituent donc un grave problème de santé tout aussi bien pour l'homme que pour l'animal comme par exemple dans le cas de la mammite bovine (MB). La MB est une inflammation de la glande mammaire de la vache induisant des dommages des tissus du pis et de ce fait, une réduction de la production de lait ainsi qu'une altération du bien-être de l'animal. Il est donc important de développer de nouvelles stratégies prophylactiques et thérapeutiques contre la MB. Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire avaient mis en évidence la capacité de certaines souches de staphylocoques à coagulase négative (SCN) produisant peu ou pas de biofilm à inhiber la formation de biofilm par d'autres bactéries responsables de MB. Notre hypothèse était donc que certaines souches faibles productrices de biofilm produisaient une ou plusieurs molécule(s) capable(s) d'inhiber de façon significative la formation de biofilm par d'autres SCN mais également par *Staphylococcus aureus* et possiblement d'autres agents pathogènes de la MB. Le but de ce projet fut donc de caractériser des molécules antibiofilm produites par des souches de SCN. Pour cela, 30 souches de staphylocoques (cinq espèces de SCN et *S. aureus*) fortes productrices de biofilm et 10 souches de SCN (*Staphylococcus chromogenes* et *Staphylococcus simulans*) faibles productrices de biofilm ont été utilisées. Nos résultats ont montré que certaines souches de SCN présentant un phénotype de faible production de biofilm réduisaient significativement la formation de biofilm chez plusieurs espèces de

staphylocoques dont *S. aureus*. De plus, quatre souches de SCN (*S. chromogenes* C et E et *S. simulans* F et H) ont été capables d'inhiber de façon significative ($p < 0,05$) la formation de biofilm de 80% des souches testées. Cette activité antibiofilm a été également visualisée par microscopie confocale ainsi que dans des conditions dynamiques en utilisant un système de microfluidique. En parallèle, il a été démontré que les souches de SCN présentant un phénotype de faible production de biofilm n'inhibaient pas significativement la croissance des souches ayant un phénotype de forte production de biofilm. Par conséquent, l'activité antibiofilm observée ne semblait pas être due à une activité bactéricide. De plus, nos résultats ont montré que les surnageants de ces quatre souches présentaient également une activité antibiofilm et qu'ils possédaient un spectre d'activité étendu suggérant ainsi que les souches excrétaient une molécule antibiofilm dans son environnement extérieur. La caractérisation de ces surnageants a permis de mettre en évidence que l'activité inhibitrice était notamment conservée dans la fraction des surnageants $< 3\text{kDa}$ et qu'une des molécules responsables de cette activité était hydrophile, thermorésistante et sensible à l'action de la RNase A. Enfin, nous avons pu observer que ces surnageants avaient la capacité de réduire voir même de prévenir la colonisation de la glande mammaire par une souche de *S. aureus* résistante à la méthicilline dans un modèle murin de mammite. Ces surnageants semblent être une alternative prometteuse dans le contrôle de la MB pour prévenir et/ou traiter cette infection que ce soit seul ou en association avec un traitement antibiotique.

Mots clés : mammite bovine, biofilm, molécules antibiofilm, staphylocoques à coagulase négative, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

Bacterial biofilms are structured communities of bacteria cells enclosed in a self-produced polymeric matrix which is adherent to a biotic or abiotic surface. This lifestyle allows these bacteria to survive in hostile environments. For example, bacteria having the ability to form biofilms are significantly less susceptible to antibiotics than bacteria in planktonic form. Bacteria within biofilms pose a serious risk to human and animal health such as during bovine mastitis (BM). BM is an inflammation of the mammary gland of dairy cows which causes udder damages and reduces milk production. Therefore, it is important to develop new prophylactic and therapeutic strategies to control and treat BM. Preliminary results have demonstrated the ability of some coagulase-negative staphylococci (CNS) producing a weak biofilm to inhibit biofilm formation by other bacteria associated with BM. Our hypothesis is that some of CNS isolates having the ability to form a weak biofilm produce one or more molecule(s) able to significantly inhibit biofilm formation by other CNS, *Staphylococcus aureus* or other BM pathogens. The purpose of this project was to characterize antibiofilm molecules produced by CNS isolates. A total of 30 staphylococcal isolates (five species of CNS and *S. aureus*) with a strong biofilm phenotype and 10 CNS (*Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus simulans*) isolates with a weak biofilm phenotype were used. Our results indicated that some CNS isolates with a weak biofilm phenotype significantly reduced biofilm formation of several staphylococcal species including *S. aureus*. Importantly, four isolates of CNS (*S. chromogenes* C and E and *S. simulans* F and H) were able to significantly inhibit biofilm formation ($p < 0.05$) of 80% of staphylococcal isolates tested. This activity was confirmed using confocal microscopy but also in dynamic conditions using a microfluidic system. Additionally, CNS with a weak biofilm phenotype did not significantly inhibit the growth

of isolates with a strong biofilm phenotype. Therefore, the biofilm inhibition does not seem to be due to a bactericidal activity. The results also showed that the culture supernatants from these four bacteria still have an antibiofilm activity and own a broad spectrum of activity suggesting that the strains release an antibiofilm molecule into the external environment. The characterization of these supernatants indicated that the inhibitory activity was conserved in the < 3kDa fraction of the supernatants. Furthermore, one of the molecules responsible for the antibiofilm activity appears hydrophilic, heat-resistant and sensitive to the action of the RNase A. Finally, we observed that culture supernatants of these bacteria had the ability to reduce or even prevent colonization of the mammary gland by a strain of methicillin-resistant *S. aureus* in a murine model of mastitis. These supernatants appear to be a promising alternative alone or in combination with antibiotics in the control of BM.

Keywords: bovine mastitis, biofilm, antibiofilm molecules, coagulase negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations	xiii
Remerciements	xvii
Introduction.....	1
Revue de littérature	4
I La mammite bovine.....	5
1. Importance économique de la mammite bovine.....	5
2. Aspect clinique de la mammite bovine.....	5
3. Diagnostic de la mammite bovine.....	7
3.1 Le compte de cellules somatiques.....	7
3.2 Le California mastitis test.....	8
3.3 L'analyse bactériologique.....	8
4. Traitement et prophylaxie.....	10
5. Agents pathogènes impliqués dans la mammite bovine.....	11
5.1 Bactéries environnementales.....	13
5.2 Bactéries contagieuses.....	14
II Les staphylocoques.....	17
1. Caractéristiques générales.....	17
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.1 Généralités.....	17
2.2 Pathogénicité.....	18
2.3 Diagnostic.....	21
2.4 Traitement et antibiorésistance.....	22
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> méthiciline-sensible mais productrice de β-lactamases.....	22
2.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline.....	23
3. Staphylocoques à coagulase négative.....	24

3.1 Généralités.....	24
3.2 Pathogénicité.....	25
3.3 Diagnostic.....	27
3.4 Traitement et antibiorésistance.....	28
III Importance et controle de biofilms formés par les staphylocoques lors d’infections intra-mammaires chez la vache laitiere : une revue bibliographique.....	30
INTRODUCTION.....	33
LE BIOFILM BACTÉRIEN	36
Généralités.....	36
Caractéristiques communes des biofilms.....	36
Les différentes étapes de formation du biofilm.....	37
L’attachement.....	38
Le détachement	40
Rôle du biofilm lors d’infections intra-mammaires.....	41
LES ANTIBIOFILMS.....	43
Généralités.....	43
Les antibiofilms chez les staphylocoques.....	44
Inhibiteurs de l’attachement de la bactérie sous forme planctonique à une surface.....	44
Perturbateur de l’architecture du biofilm.....	45
Perturbateurs des signaux intra et extracellulaires.....	45
Les antibiofilms dans le traitement des infections intra-mammaires à staphylocoques chez les bovins.....	46
CONCLUSION.....	47
PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	68
MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS.....	70
Article 1: Coagulase-negative staphylococci species impact biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci.....	71
Article 2: Characterization and nature of antibiofilm molecules produced by coagulase-negative staphylococci	108
DISCUSSION ET CONCLUSION	149
I. Sélectionner les souches de staphylocoques à coagulase négative ayant une forte activité antibiofilm	151

II. Élucider le mode d'action et identifier la ou les molécule(s) responsable(s) de cette activité antibiofilm.....	153
III. Déterminer le spectre d'activité de cette activité antibiofilm.....	158
IV. Mesurer l'activité <i>in vivo</i> des fractions actives dans un modèle murin de mammite.....	161
BIBLIOGRAPHIE.....	165
ANNEXES.....	i
Annexe 1 : Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of bacteria growing as biofilms.....	ii
Annexe 2 : Mise à jour des données sur les travaux ciblant le développement de molécules antibiofilm	xv
Annexe 3 : Counteracting bacterial motility: a promising strategy to narrow <i>Listeria monocytogenes</i> persistence in food processing industries.....	xxviii
Annexe 4 : Résumé de l'affiche présentée au congrès de l'ASM Microbe 2018.....	lxvi
Annexe 5 : Affiche présentée au congrès de l'ASM Microbe 2018.....	lxix

Liste des tableaux

Revue de littérature

Tableau 1 . Caractéristiques principales des bactéries contagieuses et environnementales retrouvées dans les infections intra-mammaires chez la vache laitière. D’après Blowey et Edmonson, 2010.	12
Tableau 2. Facteurs de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i> . D’après Gordon et Lowy, 2008 et Becker, 2017.	20
Tableau 3. Facteurs de virulence de <i>Staphylococcus epidermidis</i> . D’après Otto, 2012.	26
Tableau 4. Pourcentage de souches de staphylocoques isolées lors de cas de mammite bovine résistantes à la pénicilline ou à la méthicilline. D’après Taponen et Pyörälä, 2009 et Saini et al., 2012b.....	29

Revue scientifique

Tableau 1. Les méthodes d'étude du biofilm les plus couramment utilisées en laboratoire	63
Tableau 2. Inhibiteurs de l'attachement de la bactérie sous forme planctonique à une surface biotique ou abiotique.	64
Tableau 3. Perturbateurs de l'architecture du biofilm.	65
Tableau 4. Perturbateurs de la signalisation inter et intracellulaire.	67

Méthodologie et résultats

Article 1

Table 1. Bacterial isolates with a weak biofilm phenotype used in this study.	96
Table 2. Bacterial isolates with a strong biofilm phenotype used in this study.	97

Article 2

Table 1. Biofilm formation conditions.	131
Table 2. Biofilm inhibition by 4 supernatants of <i>Staphylococcus chromogenes</i> and <i>Staphylococcus simulans</i> isolates with a weak biofilm phenotype against five isolates with	

a strong biofilm phenotype representing six bacterial species frequently isolated in bovine mastitis.	133
Table 3. Biofilm dispersion by 4 supernatants of <i>Staphylococcus chromogenes</i> and <i>Staphylococcus simulans</i> isolates with a weak biofilm phenotype against five isolates with a strong biofilm phenotype representing six bacterial species frequently isolated in bovine mastitis.	134
Table 4. Physicochemical properties of fractioned coagulase-negative staphylococci supernatants (< 3kDa) against isolates with a strong biofilm phenotype representing five staphylococcal species frequently isolated in bovine mastitis.	135
Table 5. Characterization of fractioned coagulasenegative staphylococci supernatants (< 3kDa) against isolates with a strong biofilm phenotype representing five staphylococcal species frequently isolated in bovine mastitis.	136

Liste des figures

Revue de littérature

Figure 1. Répartition des facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*.21

Revue scientifique

Figure 1. Composition du biofilm.62

Figure 2. Les différentes étapes de formation du biofilm62

Méthodologie et résultats

Article 1

Figure 1. Biofilm inhibition by 10 isolates of *Staph. chromogenes* and *Staph. simulans* with a weak biofilm phenotype (x axis) against five isolates with a strong biofilm phenotype representing six major species.99

Figure 2. Biofilm formation by an isolate with a strong biofilm phenotype (*Staph. chromogenes* #104) (A) or a weak biofilm phenotype (*Staph. chromogenes* C) (B) grown as single species (A & B) or dual-species biofilms (C) and visualized by confocal laser scanning microscopy. 101

Figure 3. Microscope images of biofilms formed by an isolate with a strong biofilm phenotype (*Staph. chromogenes* #104) (A) or a weak biofilm phenotype (*Staph. chromogenes* C) (B) grown as single-species (A & B) or dual-species biofilms (C). 102

Figure 4. Microscope images of biofilms formed by isolates with a strong biofilm phenotype (*Staph. epidermidis* #120 (A), *Staph. xylosus* #113 (D) & *Staph. haemolyticus* #122 (G)) or a weak biofilm phenotype (*Staph. chromogenes* E (B), *Staph. simulans* F (E) & *Staph. simulans* H (H)) grown as single-species (A, B, D, E, G & H) or dual-species biofilms (C, F & I). 103

Figure 5. Biofilm dispersion by 10 *Staph. simulans* and *Staph. chromogenes* isolates with a weak biofilm phenotype (x axis) against five isolates with a strong biofilm phenotype representing the six major species. 104

Supplemental Table S1. Biofilm inhibitory activity of the 10 isolates of *Staph. chromogenes* and *Staph. simulans* with a weak biofilm phenotype (top) against five isolates with a strong biofilm phenotype representing the six major species 106

Supplemental Table S2. Biofilm dispersion activity by the 10 isolates of *Staph. chromogenes* and *Staph. simulans* with a weak biofilm phenotype (top) against five isolates with a strong biofilm phenotype representing the six major species. 107

Article 2

Figure 1. Activity of 4 supernatants of *Staphylococcus chromogenes* (C and E) and *Staphylococcus simulans* (F and H) isolates with a weak biofilm phenotype (x axis) on biofilm formation of five isolates with a strong biofilm phenotype representing six staphylococcal species. 137

Figure 2. Microscope images of biofilms formed by a CNS isolate with a strong biofilm phenotype (*Staphylococcus simulans* #108) grown with BHI (a) or with *Staphylococcus chromogenes* C (b) or *Staphylococcus simulans* F supernatants (c)..... 139

Figure 3. Activity of 4 supernatants of *Staphylococcus chromogenes* (C and E) and *Staphylococcus simulans* (F and H) isolates with a weak biofilm phenotype (x axis) on biofilm dispersion of five isolates with a strong biofilm phenotype representing six staphylococcal species. 140

Figure 4. Visualization by confocal laser scanning microscopy of the biofilm formation by isolates with a strong biofilm phenotype (*Staphylococcus chromogenes* #104; *Streptococcus uberis* #131; *Trueperella pyogenes* #143; *Klebsiella oxytoca* #156; *Escherichia coli* #149) with or without the addition of coagulase negative staphylococci supernatant. 141

Figure 5. Biofilm inhibition by the non-fractionated supernatants (black) and the fractionated supernatants (< 10kDa: dark grey; < 3kDa: light grey) (x axis) against one isolate with a strong biofilm phenotype representing six staphylococcal species. 143

Supplementary data S1. Biofilm inhibitory activity of the 4 supernatants of *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus simulans* isolates with a weak biofilm phenotype (top) against five isolates with a strong biofilm phenotype representing six staphylococcal species. 145

Supplementary data S2 Biofilm dispersion activity by the 4 supernatants of *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus simulans* isolates with a weak biofilm

phenotype (top) against five isolates with a strong biofilm phenotype representing six staphylococcal species. 147

Discussion

Figure 1. Représentation schématique du mécanisme d'action hypothétique impliquant le transfert horizontal d'un petit ARN dans l'activité antibiofilm des surnageants de staphylocoques à coagulase négative.....163

Liste des sigles et abréviations

Aap : Protéine associée à l'agrégation (abrégé de l'anglais *Accumulation associated protein*)

ADNe : Acide désoxyribonucléique extracellulaire (ou eDNA en anglais pour *Extracellular deoxyribonucleic acid*)

Agr : Régulateur génique accessoire (abrégé de l'anglais *Accessory gene regulator*)

AIP: Peptides auto inductibles (abrégé de l'anglais *Auto inducing peptides*)

AMVPQ : Association des médecins vétérinaires praticiens du Québec

ARN : Acide ribonucléique (ou RNA en anglais pour *Ribonucleic acid*)

ARNm : Acide ribonucléique messenger (ou RNAm en anglais pour *RNA messenger*)

ASM : Société américaine de microbiologie (abrégé de l'anglais *American society for microbiology*)

Bap : Protéine associée au biofilm (abrégé de l'anglais *Biofilm associated protein*)

BHI : Infusion cœur-cerveille (abrégé de l'anglais *Brain hearth infusion*)

BHIG : Infusion cœur-cerveille additionné de 0,25% de glucose (abrégé de l'anglais *Brain Heart Infusion supplemented with 0,25% of glucose*)

CCS : Compte de cellules somatiques

CMEB : Concentration minimale éradiquant le biofilm

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMT : Test de mammite de Californie (abrégé de l'anglais *California mastitis test*)

CS : Cellules somatiques

Embp : Protéine liant la matrice extracellulaire (abrégé de l'anglais *Extracellular matrix binding protein*)

FAME : Enzyme modifiant les acides gras (abrégé de l'anglais *Fatty acid modifying enzyme*)

FnBps : Protéines liant la fibronectine (abrégé de l'anglais *Fibronectin binding proteins*)

IBL : Inhibiteurs de β -lactamases

IIM : Infection intra-mammaire (ou IMI en anglais pour *Intramammary infection*)

IL-8 : Interleukine 8

MAPAQ : Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec

MEC : Matrice extracellulaire

MLST : Typage génomique multilocus (abrégé de l'anglais *Multi-locus sequence typing*)

MRSA-LA : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline associé aux animaux de rente (abrégé de l'anglais *Methicillin-resistant S. aureus livestock associated*),

MSCRAMMs : Composants microbiens de surface reconnaissant les molécules adhésives de la matrice (abrégé de l'anglais pour *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*)

NIH : Instituts nationaux de santé (abrégé de l'anglais pour *National Institutes of Health*)

NMC : Conseil national sur la mammite (abrégé de l'anglais pour *National Mastitis Council*)

OD : Densité optique (abrégé de l'anglais pour *Optical density*)

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (abrégé de l'anglais pour *Polymerase chain reaction*)

PFGE : Électrophorèse sur gel en champ pulsé (abrégé de l'anglais pour *Pulse field Genome electrophoresis*)

PIA : Polysaccharide intercellulaire d'adhésion (abrégé de l'anglais pour *Polysaccharide intercellular adhesin*)

PLP : Protéines liant la pénicilline

PNAG : Polymère de N-acétylglucosamine

PMN : Polymorphonucléaires

PSM : Modulines solubles dans le phénol (abrégé de l'anglais pour *Phenol soluble modulins*)

QS : Quorum Sensing

RCRMBQL : Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine et la qualité du lait

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments d'amplification (abrégé de l'anglais pour *Amplified fragment length polymorphism*)

SAMS : *Staphylococcus aureus* méthicilline-sensible (ou MSSA en anglais pour *Methicillin-sensitive S. aureus*)

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (ou MRSA en anglais pour *Methicillin-resistant S. aureus*)

SCN : Staphylocoques à coagulase négative (ou CNS en anglais pour *Coagulase-negative staphylococci*)

SCV : Variants à petites colonies (abrégé de l'anglais pour *Small colony variants*)

SD : Écart-type (abrégé de l'anglais pour *Standard deviation*)

SNA : Staphylocoques non-*aureus* (ou NAS en anglais pour *Non-aureus staphylococci*)

Sp. : Espèce (abrégé de l'anglais pour *Species*)

Spp. : Espèces

SSC mec : cassette chromosomique mec du staphylocoque (abrégé de l'anglais pour *Staphylococcal chromosome cassette mec*)

TSST-1 : Toxine du syndrome de choc toxique (abrégé de l'anglais pour *Toxic Shock Syndrom Toxin*)

UFC : Unité formant colonie (ou CFU en anglais pour *Colony forming units*)

WGS : Séquençage du génome entier (abrégé de l'anglais *Whole genome sequencing*)

"Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées."

Marie Curie (1867-1934)

Remerciements

Cette thèse représente l'aboutissement de quatre années passées à la Faculté de médecine vétérinaire de Saint-Hyacinthe. Quatre années de travail intense, de moments de stress et de doutes mais surtout quatre années riches en connaissances et en rencontres, qu'elles soient amicales ou professionnelles, et aussi en réussite.

C'est pourquoi, je souhaite remercier chaque personne qui a participé de près ou de loin à cette aventure.

Au Pr Mario Jacques, pour m'avoir offert la possibilité de réaliser mon doctorat dans son laboratoire, mais surtout pour m'avoir conseillé, motivé, formé et fait confiance tout au long de ces années. Je suis extrêmement reconnaissante de toutes les opportunités qui m'auront été proposées au cours de cette thèse ;

Au Pr François Malouin et aux membres de mon comité conseil, Pre Marie Archambault et Pr Simon Dufour, pour leurs conseils avisés, leur collaboration et leur support ;

Aux membres du jury d'évaluation de cette thèse, Pre Josée Harel, Pr Jean-Philippe Roy et Pr Moussa Diarra, pour avoir accordé de leur temps à la lecture et à la correction de ce manuscrit ;

A tous les membres du laboratoire 3140, plus particulièrement à Josée et Ibtissem, pour leurs précieux conseils, leur aide inestimable et leur soutien moral et affectif ; mais aussi à Jérémy, Skander et Yannick pour tout ce qu'ils ont fait afin de faciliter mon arrivée et mon séjour au Québec mais surtout dans le laboratoire ;

A tous les stagiaires du laboratoire 3140, plus particulièrement à Sneha, Léa, Annie, Audrey, Carolina, Samar et Pauline, pour leur précieuse aide sur ce projet ;

A Eric Brouillette, pour son aide inestimable avec le modèle murin ;

Au Pr Francis Beaudry, pour ses conseils et son aide avec le spectromètre de masse, à Frédéric Berthiaume, pour son aide avec le microscope confocal, à Philippe Vogeleer, pour son aide et son support avec le bioflux et à Claudia Duquette, pour son aide avec tous les autres équipements.

Aux membres, étudiants et personnel, du Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine et la qualité du lait (RCRMBQL), du regroupement stratégique Op+Lait, du Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA) et du Groupe de recherche sur les maladies infectieuses en production animale (GREMIP), pour leur aide et leur soutien à tous les niveaux ;

A tout le corps enseignant de la faculté, pour la qualité des enseignements ainsi qu'au personnel administratif pour leur aide et leur patience lors de démarches administratives pas toujours évidentes ;

Aux différents organismes subventionnaires pour leur soutien financier ;

A mes parents pour avoir toujours cru en moi et pour tous les sacrifices qu'ils ont faits enfin que je puisse bénéficier d'une formation universitaire de qualité ;

A mon frère, Kevin, pour qui je ne cesserai jamais de me battre ;

A mes grands-parents, ainsi qu'à ma famille et belle famille, tout simplement pour leur soutien même à distance ;

A mes amis d'enfance, Janie, Kevin et Laura, pour avoir toujours été là pour moi et cela même à des milliers de kilomètres ;

A mes amis et camarades de la faculté, qui seraient bien trop nombreux à citer mais qui se reconnaîtront, et sans qui ces années n'auraient pas été les mêmes ;

Et enfin à Lionel, sans qui je n'aurais jamais pu aller jusqu'au bout et accomplir tout cela. Merci pour ta patience, ta confiance et ton amour. Merci tout simplement d'avoir toujours été là pour moi et cela même dans les moments les plus durs.

Introduction

La mammite bovine (MB) constitue pour l'industrie laitière un problème majeur, et cela notamment en raison de son incidence et de son impact économique sur la production et la qualité du lait (Halasa et al., 2007). On parlera de mammite sous clinique en l'absence de signes visibles et de mammite clinique en présence de signes cliniques associés à des changements de l'aspect du lait. La MB est une inflammation des glandes mammaires de la vache consécutive dans la majorité des cas à une infection intra-mammaire (Blowey et Edmondson, 2010). Les pathogènes responsables de cette infection sont classés en fonction de leur mode de transmission (Blowey et Edmondson, 2010). On parlera alors de bactéries environnementales (coliformes, *Streptococcus uberis*) ou de bactéries contagieuses (*Staphylococcus aureus*, certains staphylocoques à coagulase négative (SCN) ou staphylocoques non-*aureus* (SNA), *Mycoplasma bovis*). Les bactéries causant la mammite recourent à d'originales stratégies pour persister dans la glande mammaire, comme par exemple, en formant un biofilm (Melchior, 2011). Cette capacité est un des éléments qui permet notamment à *S. aureus* de persister longtemps dans la glande mammaire (Melchior, 2011). Dans le cas des SCN, la formation de biofilm pourrait également être impliquée dans leur persistance (Tremblay et al., 2013). De façon plus générale, les bactéries sous forme biofilm possèdent une résistance ou tolérance aux antibiotiques de 10 à 1000 fois supérieure aux bactéries sous forme planctonique (Olson et al., 2002). Cette propriété est notamment responsable de l'échec de certains traitements antibiotiques ce qui motive les chercheurs à trouver de nouvelles stratégies prophylactiques et thérapeutiques en association ou non avec le traitement antibiotique initial (Ceri et al., 2010). Une bonne connaissance des composants et des différentes étapes de formation du biofilm par les staphylocoques a permis de développer, essentiellement en médecine humaine, trois stratégies alternatives (Chung et Toh, 2014): (1) inhibition de l'adhésion de la bactérie

planctonique à la surface biotique ou abiotique et cela dans le but d'empêcher la formation du biofilm; (2) perturbation de l'architecture du biofilm durant la phase de maturation et (3) inhibition des signaux de communication intra et intercellulaires. L'utilisation potentielle de ce type de molécule ayant une cible différente de celle des antibiotiques pourrait être proposée en monothérapie ou en combinaison avec un antibiotique afin d'augmenter l'efficacité de ce dernier et ainsi contribuer à mieux contrôler les maladies infectieuses animales dont la MB.

Des résultats préliminaires réalisés dans notre laboratoire ont mis en évidence la capacité de certaines souches de SCN produisant peu ou pas de biofilm à inhiber la formation de biofilm par d'autres bactéries (SCN et *S. aureus* entre autres) responsables de MB.

Le but de ce projet est donc de caractériser les molécules antibiofilm produites par des souches de SCN isolées de cas de MB.

Revue de littérature

I. La mammite bovine

1. Importance économique de la mammite bovine

La MB constitue l'une des priorités de l'industrie laitière. En effet, cette inflammation de la glande mammaire de la vache entraîne une altération du bien-être de l'animal mais aussi une réduction de la qualité et de la production de lait (Halasa, 2007; De Vliegher et al., 2012). Au Canada, les pertes économiques imputables à cette maladie sont évaluées à près de 665 millions de dollars par an (Aghamohammadi et al., 2018).

2. Aspect clinique de la mammite bovine

La MB est une inflammation de la glande mammaire de la vache consécutive à une infection intra-mammaire (IIM) (Blowey et Edmondson, 2010; Ruegg et al., 2015). On différencie la mammite clinique de la mammite sous clinique.

La mammite sous clinique se caractérise par une augmentation du nombre de cellules somatiques stimulée par une multiplication bactérienne dans la glande mammaire (Zhao et Lacasse, 2008). L'animal commence donc à réagir à cette infection mais aucun signe clinique n'est observé. Les quartiers et le lait sont d'aspect normal. À ce stade, l'infection pourra alors guérir spontanément, devenir chronique ou s'aggraver. Dans ce dernier cas, l'aggravation sera consécutive à un endommagement des tissus extensifs de la glande mammaire suivi d'une altération de la barrière sang-lait. On parlera alors de mammite clinique (Zhao et Lacasse, 2008). La mammite clinique se caractérise par l'apparition de signes cliniques tels qu'une altération de l'état général de la vache (fièvre, abattement) ou un syndrome inflammatoire au niveau des quartiers (rougeur, enflure et douleur) mais aussi par des changements visibles de l'aspect du lait (présence de flocons

ou lait très aqueux). Ces signes seront plus ou moins accentués en fonction de la gravité de la maladie (Lévesque, 2006).

Bien que le stade sous clinique puisse évoluer vers un stade clinique, ces deux stades sont souvent indépendants (Barkema et al., 1998; Olde Riekerink et al., 2008). En effet, certaines bactéries pathogènes telles que *S. aureus* ou certains SCN conduiront à une inflammation modérée de la glande mammaire et seront capables d'y persister pendant une longue période. En revanche, d'autres bactéries pathogènes telles qu'*Escherichia coli* ou *Klebsiella* spp. ne possèdent généralement pas cette capacité à persister à bas bruit dans la glande mammaire. Ces bactéries entraîneront immédiatement une inflammation très sévère avec l'apparition rapide de signes cliniques. L'incidence de mammite clinique causée par des bactéries pathogènes à Gram négatif telles que *E. coli* et *Klebsiella* spp. est plus élevée dans des troupeaux produisant un lait ayant un faible taux de cellules somatiques (CS). Les mammites cliniques dues aux bactéries à Gram positif tels que *S. aureus* et *Streptococcus dysgalactiae* sont quant à elles plus fréquentes dans les troupeaux avec un taux élevé de CS dans le lait (Olde Riekerink et al., 2008). En revanche, aucune corrélation n'a été démontrée entre le taux de CS dans le lait et l'incidence des cas de mammites cliniques. En effet, les vaches d'un troupeau avec un faible compte de cellules somatiques (CCS) n'ont significativement pas plus de chance de développer une mammite clinique que les vaches d'un troupeau présentant un taux modéré ou élevé de CS (Barkema et al., 1998; Olde Riekerink et al., 2008).

Afin de limiter l'impact de la MB sur la santé du pis de la vache, il est important d'avoir recours à des méthodes de diagnostic rapides et efficaces de cette maladie.

3. Diagnostic de la mammite bovine

Un bon diagnostic de l'infection et de l'agent pathogène en cause, et cela de façon rapide, permettra d'adapter le traitement et d'obtenir un taux de guérison élevé. Différents outils sont à la disposition du vétérinaire mais également du producteur (Wallace, 2007; Viguier et al., 2009). On peut citer des méthodes de diagnostic indirect telles que le CCS et le CMT (California Mastitis Test) ou des méthodes de diagnostic direct telles que la culture bactériologique.

3.1 Le compte de cellules somatiques

Les CS sont composées principalement de globules blancs tels que les lymphocytes, les macrophages et les polymorphonucléaires (PMN) mais aussi, dans une moindre proportion, des cellules épithéliales desquamées. Ces populations cellulaires sont toutes naturellement présentes dans le lait. Lors d'une infection, on observera une augmentation de leur nombre et notamment de celui des PMN (Schukken et al., 2003).

Le CCS est un indicateur fiable de l'état de santé du pis (Dohoo et Leslie, 1991). Un seuil de 200 000 cellules par mL de lait peut être utilisé comme indicateur d'un quartier ou d'une vache infectée (Dohoo et Leslie, 1991). Une prime à la qualité du lait a d'ailleurs été mise en place au Québec afin d'inciter les producteurs laitiers à maintenir un taux de CS inférieur à 150000 cellules par mL de lait (MAPAQ, 2014). Un échantillonnage mensuel est réalisé par les organismes de contrôle laitier. Le taux de CS dans le lait est ensuite quantifié par cytométrie de flux. De nouveaux outils tels que le Porta SCC® (PortaCheck, Inc.) et le « DeLaval Cell Counter » ont été développés afin de permettre un comptage des CS plus rapide car réalisable et interprétable directement à la ferme (Lam et al., 2009).

3.2 Le California mastitis test

Le CMT constitue quant à lui un outil de détection de première ligne (Schalm et Noorlander, 1957). En effet, ce test est directement utilisé par le producteur. Il est donc réalisable en tout temps lors d'une suspicion d'IIM. De plus, le CMT permet d'identifier spécifiquement le ou les quartiers affecté(s) et permet de ce fait un suivi ciblé d'une infection avérée.

Le principe de ce test consiste à ajouter à l'échantillon de lait, un réactif associant un détergent et un indicateur de pH (Barnum et Newbould, 1961). On observera alors la formation d'un gel dont la viscosité augmentera proportionnellement avec le nombre de CS. Il faut noter que le CMT réagira de façon visible à partir d'un taux de CS égal ou supérieur à 400 000 cellules/mL de lait.

Le CCS et le CMT sont des méthodes de détection indirecte des IIM. En effet, elles permettent de mettre en évidence une inflammation intra-mammaire mais en aucun cas d'identifier l'agent pathogène responsable.

3.3 L'analyse bactériologique

Il existe plusieurs méthodes permettant de déterminer directement l'agent pathogène impliqué dans l'IIM (Britten, 2012; Rovai et al., 2014).

La méthode de référence est la culture bactériologique du lait (Wallace, 2007). Elle consiste à ensemercer les échantillons de lait frais sur des géloses non sélectives telles que la gélose au sang ou la gélose d'infusion cœur cerveau (ou BHI). Diverses analyses biochimiques seront ensuite réalisées afin de connaître l'identité de la bactérie causale en un ou cinq jours. Le délai d'identification de la bactérie en cause peut être considérablement diminué grâce à l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF

("Matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight"). En effet, une vingtaine de minutes sera nécessaire après culture pour obtenir un résultat (Kliem et Sauer, 2012; Cameron et al., 2017; Savage et al., 2017). L'Université du Minnesota de même que la compagnie 3M ont développé des plaques de culture (Minnesota Bi-Plate™; Minnesota Tri-Plate™; 3M™ Petrifilm™) utilisables à la ferme par le producteur lui-même pour obtenir un résultat en 24 h. Cependant celles-ci ne permettent pas un diagnostic d'espèce précis (Mc Carron et al., 2009).

La PCR quant à elle permet un diagnostic de l'espèce en cause en moins de 24h (Gillepsie et Oliver, 2005). Cependant cette technique est coûteuse et nécessite un personnel qualifié (Wallace, 2007). De plus, la PCR ne permet pas d'obtenir des informations sur la viabilité des bactéries. En effet, la présence d'ADN dans le lait ne signifie aucunement que la bactérie est vivante.

De nouvelles techniques de diagnostic moléculaire continuent d'émerger telles que : le séquençage du génome entier (ou WGS pour «Whole genome sequencing») et l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (ou PFGE pour «Pulse field Genome electrophoresis») ciblant le génome entier de la bactérie, ou encore le typage génomique multilocus (ou MLST pour «Multi-locus sequence typing»), le typage du gène *spa* et le polymorphisme de longueur des fragment d'amplification (ou RFLP pour «amplified fragment length polymorphism») ciblant des cibles bactériennes plus spécifiques (El-Sayed et al., 2017).

Au Québec, il est recommandé d'effectuer régulièrement (c'est à dire mensuellement) l'analyse du CCS individuel des vaches et de procéder à l'identification de la ou les bactérie(s) responsable(s) afin de permettre un meilleur suivi des troupeaux mais également d'assurer un traitement optimal lorsque celui-ci est préférable (Schukken et al., 2003).

4. Traitement et prophylaxie

Dans les années 60, de nombreux travaux ont été réalisés afin de mieux comprendre la MB et de pouvoir établir des règles afin de garantir un meilleur contrôle des mammites contagieuses (Neave et al., 1969). De ces travaux a découlé le « programme de contrôle en cinq points de la mammite » qui est devenu plus tard le « plan en 10 points de contrôle de la mammite » du NMC (National Mastitis Council) (www.nmconline.org). Dans ce dernier, il est notamment recommandé de traiter toutes les vaches du troupeau au tarissement avec un antibiotique à longue durée d'action afin de traiter les IIM préexistantes mais également de prévenir l'acquisition de nouvelles IIM durant la période de tarissement. Il y est également proposé d'avoir de bonnes techniques de traite ainsi qu'une machine à traire propre, de désinfecter les trayons avant et après la traite et enfin de réformer les vaches chroniquement infectées. Ces mesures ont permis de faire d'énormes progrès dans la diminution de la prévalence d'IIM et notamment d'entraîner une baisse significative de la prévalence d'IIM causée par *Streptococcus agalactiae* dans les troupeaux laitiers (Barkema et al., 2013).

Dans les cas sévères de mammite clinique, un traitement symptomatique est associé à la thérapie antibiotique (Ruegg et al., 2015). En effet, le vétérinaire peut prescrire l'administration de fluides ou d'électrolytes afin de palier à la survenue d'une déshydratation ou de troubles électrolytes telle qu'une hypocalcémie. Il peut également prescrire des anti-inflammatoires stéroïdiens (ex : dexaméthasone) ou non stéroïdiens (ex : flunixin méglumine) afin de traiter la douleur et la fièvre associée à la mammite clinique.

De plus en plus de chercheurs s'intéressent également au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de diminuer ou d'abolir l'utilisation des traitements antimicrobiens conventionnels utilisés à la ferme et cela dans le but de diminuer les coûts

associés à leur utilisation mais également de faire face à la pression exercée sur les producteurs et les vétérinaires en ce qui concerne la présence de résidus dans le lait ainsi que l'émergence de résistance aux antibiotiques (Oliver et Murinda, 2012; Francoz et al., 2017). On peut citer entre autres l'association d'un scellant interne (ex : Orbeseal®) à un traitement sélectif au tarissement (Afifi et al., 2018), les traitements homéopathiques (ex : *Phytolacca* L.; MacLeod, 1981), les immunostimulants (ex : IgY; Zhen et al., 2009), les probiotiques (ex : *Lactococcus lactis*; Klostermann et al., 2008), l'ocytocine (Roberson et al., 2004), les plantes (ex : le varech; Vacca et Walsh, 1954), les huiles essentielles (ex : *Satureja montana* L.; Fratini et al., 2014), les bactériocines (ex : la nisine; Cao et al., 2007) ainsi que les molécules antibiofilms (ex : le chitosan; Asli et al., 2017). Certaines de ces stratégies alternatives semblent très prometteuses. Cependant, il existe encore trop peu de données afin de conclure définitivement sur leur efficacité à la ferme contre les agents pathogènes responsables de MB.

5. Agents pathogènes impliqués dans la mammite bovine

Pendant longtemps, les bactéries impliquées dans la MB ont été classées en fonction de leur impact sur la santé du pis. On distinguait alors les bactéries pathogènes mineures telles que *Corynebacterium* spp. et les SCN, responsables d'une réaction inflammatoire légère, d'une faible hausse du CCS ainsi que d'une faible baisse de la production de lait, des bactéries pathogènes majeures telles que *S. aureus*, *Streptococcus* spp et *E. coli* responsables quant à elles de réactions inflammatoires sévères pouvant entraîner la mort de la vache, d'une forte hausse du CCS ainsi que d'une baisse importante de la production laitière (Reyher et al., 2010; Vanderhaegen et al., 2014).

En parallèle, une classification basée sur le réservoir principal et le mode de transmission de la bactérie, est fréquemment utilisée. On distingue alors les bactéries

environnementales telles que les coliformes, des bactéries contagieuses telles que les staphylocoques [Tableau 1] (Bradley, 2002; Pyörälä et Taponen, 2009; Blowey et Edmondson, 2010; Zadoks et al., 2011; Vanderhaeghen et al., 2015).

Tableau 1: Caractéristiques principales des bactéries contagieuses et environnementales retrouvées dans les infections intra-mammaires chez la vache laitière. D’après Blowey et Edmonson, 2010.

Propriétés	Bactéries contagieuses	Bactéries environnementales
Espèces	<i>Staphylococcus aureus</i> Staphylocoques à coagulase négative <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Corynebacterium bovis</i> <i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Streptococcus uberis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> coliformes (<i>Escherichia coli</i> et <i>Klebsiella</i> spp.) Staphylocoques à coagulase négative <i>Trueperella pyogenes</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Pasteurella</i> fungi et levures
Source(s) d’infection	Principalement par les autres quartiers infectés mais aussi par la peau des trayons et du pis	Environnement contaminé : litière, eau, plantes, fumier, mouches et peau de la vache
Mode de transmission	Transmission d’une vache à l’autre durant la traite par l’intermédiaire d’un vecteur	Contamination des trayons entre les traites par contact direct avec environnement contaminé
Type de mammite	Mammite sous clinique majoritaire CCS augmenté	Mammite clinique majoritaire CCS pouvant être très élevé au moment de la mammite mais redevenant rapidement normal
Prophylaxie	Antibiothérapie au tarissement Hygiène stricte lors de la traite Bain des trayons après la traite	Hygiène stricte de l’environnement de la vache Utilisation d’un scellant interne au tarissement Désinfection des trayons avant la traite Vaccination contre les coliformes

5.1 Bactéries environnementales

Les bactéries environnementales rassemblent entre autres *E. coli*, *Klebsiella* spp., *S. uberis*, *S. dysgalactiae* et *Trueperella pyogenes* et sont présentes essentiellement dans l'environnement de la vache comme par exemple dans le fumier, la litière, les aliments ou l'eau. Ces bactéries pathogènes sont responsables essentiellement de mammites cliniques (Blowey et Edmondson, 2010; Ruegg et al., 2015).

Les bactéries à Gram négatif, et plus particulièrement les coliformes (*E. coli* et *Klebsiella* spp.), sont responsables d'environ 40% des cas sévères de mammites cliniques (Schukken et al., 2012).

Escherichia coli est responsable de 2 à 15% des cas de mammite clinique modérée à sévère (Olde Riekerink et al., 2008; Fairbrother et Nadeau, 2010) La bactérie est présente essentiellement dans le fumier et la litière des vaches. On observe une recrudescence des cas de mammite clinique à *E. coli* lors des périodes de climat chaud et humide. Aussi beaucoup de ces cas surviennent durant la première semaine de lactation lorsque le système immunitaire de la vache est moins efficace. La moitié des cas de mammite clinique survenant en début de lactation auraient comme origine la période de tarissement (Bradley et Green, 2001). Puisque les symptômes résultent principalement d'une réponse inflammatoire exagérée, un traitement anti-inflammatoire ainsi que l'administration de fluides sont souvent recommandés. De plus, il est possible de vacciner son troupeau en prévention d'IIM à *E. coli* et aux autres coliformes (Erskine R.J., 2012). Un des vaccins commercialisés est l'Enviracor™ J-5 (Zoetis), qui permet de diminuer la sévérité et la durée de la mammite clinique (Hogan et al., 1995).

Une faible réponse à la vaccination ainsi qu'aux autres traitements mais également une symptomatologie sévère font de *Klebsiella* spp. un coliforme plus redoutable que *E. coli*.

Streptococcus uberis et *S. dysgalactiae* sont des bactéries présentes dans l'environnement de la vache notamment dans les litières. Cependant *S. dysgalactiae* est également considérée par certains comme contagieuse (Blowey et Edmondson, 2010). En effet, elle est communément retrouvée sur la peau du trayon particulièrement quand celle-ci est endommagée par les machines de traite.

Trueperella pyogenes, anciennement appelée *Arcanobacterium pyogenes*, est une bactérie à Gram positif également présente dans l'environnement de la vache (sol, fumier) mais surtout associée aux mouches environnantes (Blowey et Edmondson, 2010; Yassin et al., 2011). Cette bactérie est principalement connue en Europe pour son implication majeure dans les cas de mammite sévère dite « d'été » car ils surviennent principalement en juillet, août et septembre. La mammite d'été à *T. pyogenes* est caractérisée par une létalité importante et par des sécrétions épaisses et malodorantes (Blowey et Edmondson, 2010).

5.2 Bactéries contagieuses

Les bactéries contagieuses regroupent entre autres *S. aureus*, certains SCN, *S. agalactiae* et *M. bovis* (Barkema et al., 2009; Blowey et Edmondson, 2010).

Mycobacterium bovis est un agent pathogène opportuniste des muqueuses respiratoires et urogénitales des vaches en bonne santé mais également de la glande mammaire et des articulations de celles-ci (Fox et al., 2005). L'apparition de signes cliniques sera consécutive à un stress particulier (transport, vêlage). L'agent pathogène est très contagieux et est transmis aux autres vaches du troupeau par l'intermédiaire du matériel de traite. *M. bovis* ne répond pas bien aux traitements antibiotiques d'où l'importance de suivre des règles d'hygiène très strictes.

Les souches de *S. aureus* et *S. agalactiae* sont essentiellement isolées au niveau de la glande mammaire et notamment sur le pis de la vache (Keefe, 1997; Zadoks et al., 2011). Ces bactéries sont transmises d'une vache à l'autre à l'aide de différents vecteurs tels que les mains du producteur, la machine de traite ou encore les mouches. *Staphylococcus aureus* est responsable majoritairement de mammites sous cliniques chroniques et cela en raison d'une bonne adaptation de cette bactérie dans la glande mammaire. Cependant *S. aureus* est également impliquée dans des cas de mammites cliniques dans une proportion importante (environ 10%) (Olde Riekerink et al., 2008). Si *S. agalactiae* répond bien aux traitements, l'éradication de *S. aureus* est quant à elle plus compliquée (Barkema et al., 2006). En effet, différents mécanismes, qui seront détaillés plus loin, lui permettent un échappement thérapeutique conduisant à la persistance de la bactérie chez son hôte (Cain, 2013). D'autres facteurs peuvent également influencer sur le taux de guérison d'une IIM à *S. aureus*. En effet, il a été démontré que les chances de succès du traitement diminuaient avec l'âge de la vache mais également avec une augmentation du CCS, de la durée de l'infection ou encore du nombre de quartiers infectés (Barkema et al., 2006). L'utilisation d'infusions intra-mammaires d'antibiotiques au moment du tarissement associée aux règles d'hygiène strictes semble cependant améliorer la guérison (Barkema et al., 2006). De plus, l'administration de l'antibiotique sur une durée supérieure à celle habituellement prescrite semble également augmenter les chances de succès du traitement (Roy et al., 2009).

Les SCN quant à eux, ont longtemps été considérés comme des bactéries pathogènes mineures. Cependant, et notamment en raison de l'amélioration de leur diagnostic au niveau de l'espèce, les SCN constituent à ce jour le groupe de bactéries les plus fréquemment isolées lors d'IIM (Pitkälä et al., 2004; Tenhagen et al., 2006; Sampinon et al., 2009; Le Loir et al., 2014). Au Canada, en 2007-2008, la prévalence des SCN dans

les quartiers de vaches en apparence normale était évaluée à 42.7% (Dufour et al., 2012a). Les SCN ont été considérés par certains comme des bactéries pathogènes émergentes (Pyörälä et Taponen, 2009). Une vingtaine d'espèces ont été identifiées chez la vache laitière dont cinq espèces prédominantes: *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus haemolyticus* et *Staphylococcus epidermidis* (Tremblay et al., 2013; Fry et al., 2014; Vanderhaeghen et al., 2014; Condas et al., 2017). Il y a de plus en plus d'intérêt pour ces bactéries. De ce fait, les recherches s'amplifient et apportent de nouvelles informations sur les SCN et notamment sur les différences inter-espèces. En effet, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis* et *S. haemolyticus* semblent être associées aux infections persistantes (Piessens et al., 2011; Supré et al., 2011; Fry et al., 2014). *Staphylococcus chromogenes*, *S. simulans* et *S. xylosum* augmenteraient le CCS de façon significative et cela de la même façon que *S. aureus* (Supré et al., 2011; Fry et al., 2014). De plus, *S. chromogenes* et *S. epidermidis* sont des espèces considérées comme des bactéries pathogènes opportunistes qui colonisent les trayons ou la peau et qui sont rarement retrouvées dans l'environnement des vaches à l'inverse de *S. simulans*, *S. haemolyticus* et *S. xylosum* considérées elles comme des espèces versatiles préférentiellement retrouvées dans l'environnement de la vache (Piessens et al., 2011; Vanderhaeghen et al., 2014). L'effet des SCN sur le risque d'acquisition d'une nouvelle IIM par un agent pathogène majeur est beaucoup discuté dans la littérature (Reyher et al., 2012; Vanderhaeghen et al., 2014). En effet, certains chercheurs ont proposé qu'une IIM préexistante causée par des SCN avait un effet protecteur contre l'acquisition d'une nouvelle IIM. Cependant d'autres chercheurs n'observent aucun effet ou bien une augmentation du risque d'acquérir une nouvelle IIM. Les dernières données semblent indiquer que cet effet, qu'il soit bénéfique ou néfaste, serait espèce-dépendant (Vanderhaeghen et al., 2014). Récemment, le terme de staphylocoques non-*aureus* (SNA

ou NAS en anglais pour « non-*aureus* staphylococci ») a été proposé afin de former un groupe d'agents pathogènes de la MB regroupant les SCN, les staphylocoques à coagulase variable et les staphylocoques à coagulase positive à l'exception de *S. aureus* (Condas et al., 2017).

II. Les staphylocoques

1. Caractéristiques générales

Les bactéries du genre *Staphylococcus* appartiennent à l'embranchement des *Firmicutes* et à la famille des *Staphylococcaceae*. Ces microorganismes sont associés principalement à la peau et aux muqueuses de l'hôte (Prescott, Harley et Klein, 1993; Kloos et Bannerman, 1995). Ce sont des cocci à Gram positif, catalase positive et oxydase négative, regroupés en amas. Les staphylocoques sont immobiles, non-sporulés, aérobies facultatifs et possèdent des acides teichoïques dans leur paroi cellulaire (Singleton et Sainsbury, 1993). Les souches de staphylocoques sont divisées en souches coagulase positive, coagulase négative et coagulase variable.

2. *Staphylococcus aureus*

2.1 Généralités

Staphylococcus aureus est une bactérie pathogène majeure de l'homme et de l'animal pouvant causer un éventail de maladies bénignes à mortelles.

Chez l'animal, de nombreuses espèces servent de réservoir à *S. aureus* (Jacques et al., 2010; Peton et Le Loir, 2013). Chez les volailles, *S. aureus* est présente au niveau de la peau et est associée notamment à des cas d'ostéomyélites et d'arthrites (Butterworth et al.,

2001; Nemati et al., 2009). *Staphylococcus aureus* est également responsable d'infections associées aux soins chez les petits animaux et les chevaux (Catry et al., 2010), d'infections cutanéomuqueuses chez les lapins et les chiens (Okerman et al., 1984; Fazakerley et al., 2009) mais surtout d'IIM chez les bovins (Vanderhaeghen et al., 2010). *Staphylococcus aureus* est un agent pathogène redouté dans les fermes laitières et cela en raison de son fort potentiel à causer des IIM chroniques, contagieuses, difficilement traitables et entraînant des baisses de production laitière importantes (Barkema et al., 2009; Reyher et al., 2011). Un modèle murin de mammite causée par *S. aureus* est d'ailleurs utilisé afin de mieux pouvoir étudier cette infection (Brouillette et Malouin, 2005).

2.2 Pathogénicité

Staphylococcus aureus est considéré comme un agent pathogène opportuniste. C'est-à-dire qu'il est présent de façon commensale de la flore cutanée et du nasopharynx principalement, sans provoquer de maladies. En revanche, dès lors que les défenses de l'hôte seront affaiblies, *S. aureus* deviendra pathogène (Gordon et Lowy, 2008).

Staphylococcus aureus possède un grand nombre de facteurs de virulence impliqués dans son attachement aux surfaces, dans sa persistance et sa chronicité ou encore dans son échappement aux défenses de l'hôte ainsi qu'aux traitements antibiotiques [Figure 1; Tableau 2] (Gordon et Lowy, 2008; Becker et al., 2017). On peut citer comme exemple de facteur de virulence, les MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) qui sont impliquées dans l'attachement de la bactérie sur des surfaces biotiques ou abiotiques telles que les cathéters en raison de leur capacité à fixer entre autres le collagène, le fibrinogène et la fibronectine. De ce fait, les MSCRAMMs sont impliquées dans la virulence des infections à *S. aureus* et notamment lors d'infections associées aux soins. Cependant, il est important de noter que toutes les souches de *S.*

aureus ne possèdent pas les mêmes facteurs de virulence (Gordon et Lowy, 2008). En effet, on pourra observer par exemple des différences dans leur capacité de formation de biofilm. De plus, des études inter-espèces ont également révélé l'existence de différences dans l'expression des facteurs de virulences notamment entre les souches humaines et bovines (Delgado et al., 2011; Chu et al., 2013).

L'implication de facteurs de virulence telles que les enzymes ou les toxines a également été prouvé dans le cas d'IIM à *S. aureus* chez la vache (Sutra et Poutrel, 1994). De plus, l'expression spécifique par *S. aureus* de certains gènes de virulence lors d'IIM bovine a été démontrée. C'est notamment le cas de SACOL0442 et SACOL0718-720 impliqués respectivement dans l'expression d'une exotoxine putative et d'un transporteur ABC qui joue un rôle dans la résistance aux antibiotiques ainsi qu'à plusieurs peptides antimicrobiens (Allard et al., 2013; Côté-Gravel et al., 2016).

Tableau 2: Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. D'après Gordon et Lowy, 2008 et Becker, 2017.

Type de facteurs de virulence	Exemple	Gènes	Syndromes cliniques associés
Impliqués dans l'attachement	MCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) Autolysine/Adhesines	<i>fnbA</i> , <i>fnbB</i> , <i>bbp</i> , <i>aap</i> , <i>atla</i>	Endocardite, ostéomyélite, arthrite septique et infections sur matériel implantable
Impliqués dans la persistance	Accumulation du biofilm (ex: PNAG, polymère de N-acétyl-D-glucosamine) et persistance intracellulaire (SCV)	locus <i>ica</i> , mutation de <i>hemB</i>	Fibrose kystique, mammite clinique et infections chroniques
Impliqués dans l'échappement aux défenses de l'hôte	Leucocidines (ex: toxine γ), polysaccharides capsulaire (ex: 5 et 8), protéine A, Eap et PSM (phenol soluble modulins),	<i>eap</i> , <i>spa</i> , <i>chp</i> , cluster de gènes <i>psm-α</i>	Infections cutanéomuqueuses, pneumonie nécrosante et abcès
Impliqués dans l'évasion/ pénétration tissulaire	Protéases, lipases, nucléases, phospholipase C et métalloprotéases (élastase)	<i>sspA</i> , <i>plc</i> , <i>sepA</i>	Destruction tissulaire et infections métastasées
Impliqués dans les maladies imputables à des toxines et/ou septicémie	Enterotoxines, TSST, toxines exfoliatives A et B, toxine α , peptidoglycane et acide lipotéichoïque	<i>sea-q</i> , <i>tst-H</i> , <i>eta</i> , <i>etb</i> , <i>hla</i>	Toxi-infection alimentaire, syndrome de choc toxique, syndrome de la peau ébouillanté, impétigo et septicémie
Avec un rôle dans la virulence peu défini	Coagulase et bactériocine	<i>bsa</i>	

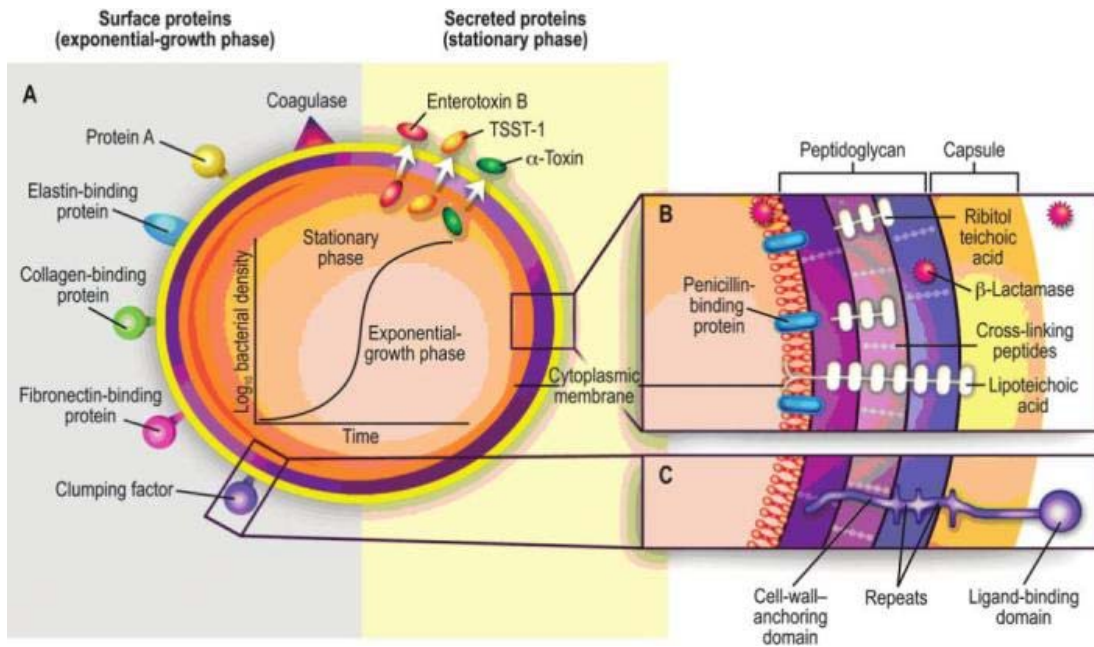


Figure 1: Répartition des facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* (Gordon et Lowy, 2008).

A. Protéines de surfaces (MSCRAMMs) et protéines sécrétées (toxines). B et C. Facteurs de pathogénicité de l'enveloppe (ex : résistance aux antibiotiques).

2.3 Diagnostic

Afin d'identifier *S. aureus*, il faut dans un premier temps prélever l'échantillon à tester (ex : lait).

Du milieu gélosé sélectif (ex : gélose Chapman ou « *Mannitol Salt Agar* ») ou non (ex : gélose au sang ou BHI) sera ensuite ensemencé avec l'échantillon prélevé.

L'examen d'un montage frais de l'échantillon sous microscope permettra d'observer des amas de cocci d'un μm de diamètre environ. Après 24 h de culture sur gélose au sang à 37°C, les colonies seront lisses et de couleur blanche à jaunâtre très fréquemment entourées d'une double zone d'hémolyse (α - β hémolytique) (Singleton et Sainsbury, 1993). Un diagnostic indirect pourra également être réalisé afin de mettre en

évidence, par exemple, la présence de la protéine A à l'aide d'un test d'agglutination faisant intervenir des particules de latex enrobées d'anticorps dirigés contre la protéine ciblée (Larsson et Sjöquist, 1989).

Le diagnostic biochimique sera quant à lui : catalase positive, oxydase négative, DNase positive et coagulase positive et pourra être réalisé aisément notamment à l'aide d'une galerie API® Staph (BioMérieux).

2.4 Traitement et antibiorésistance

Une fois le diagnostic d'infection à *S. aureus* posé, le choix de l'antibiotique devra répondre à plusieurs critères et règles stricts tels que le respect d'un temps de retrait chez la vache laitière. L'antibiotique devra également être présent au niveau de l'organe ou du tissu cible (ex : glande mammaire) à une concentration suffisante pour être efficace mais surtout il devra présenter une action bactéricide ou bactériostatique envers la bactérie incriminée (Blowey et Edmondson, 2010). Les molécules thérapeutiques de choix pour traiter une mammite à *S. aureus* sont les β -lactamines (céphalosporines, pénicillines, les combinaisons thérapeutiques associées à la pénicilline) ou encore les macrolides (Barkema et al., 2006). Dans certains cas, il sera utile de déterminer si l'on est en présence d'une souche de *S. aureus* méthicilline-sensible (SAMS) ou d'une souche de *S. aureus* résistante à la méthicilline (SARM) et cela dans le but de pouvoir adapter le traitement antibiotique et d'éviter les échecs thérapeutiques.

2.4.1 *S. aureus* méthicilline-sensible mais productrice de β -lactamases

La production de β -lactamase est le mécanisme de résistance envers les β -lactamines le plus fréquent et le plus inquiétant (Livermore, 1995). Les β -lactamases sont des enzymes qui inactivent les β -lactamines par hydrolyse de la liaison amine du cycle β -

lactame (Tenover, 2006). Elles peuvent être catégorisées selon deux méthodes de classifications : la classification fonctionnelle de Bush-Jacobi-Medeiros (Bush et al., 1995) ou la classification moléculaire d'Ambler (Ambler, 1980). Les gènes codant pour ces enzymes peuvent être d'origine chromosomique ou plasmidique. La pénicillinase de *S. aureus* est une β -lactamase plasmidique et inductible, c'est-à-dire que sa production sera accrue en présence de pénicillines. Elle est également extracellulaire, c'est-à-dire qu'elle est sécrétée à l'extérieure de la bactérie. Afin de déterminer la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques, on pourra utiliser soit des méthodes de dilution en bouillon ou gélose ou alors des méthodes de diffusion sur gélose. La sensibilité à ces antibiotiques sera recouvrée après ajout d'un inhibiteur de β -lactamase (IBL) comme par exemple l'acide clavulanique. Les IBL se fixent alors sur la β -lactamase, permettant ainsi à la β -lactamine d'échapper à l'action de l'enzyme. Dans le cas de la MB, les isolats de *S. aureus* résistants aux β -lactamines sont peu nombreux au Canada et cela malgré le fait que les β -lactamines sont fréquemment utilisées en traitement et en prévention de la MB (Saini et al., 2012a).

2.4.2 *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

La méthicilline est une β -lactamine, plus précisément une pénicilline de type M. Les souches de SARM sont résistantes à toutes les β -lactamines. Cette classe d'antibiotique agit en inhibant la synthèse du peptidoglycane impliqué dans la formation de la paroi bactérienne, par blocage des transpeptidases que l'on nomme PLP (protéines liant la pénicilline) (Merck, 2005). La résistance à la méthicilline est due à la production d'une PLP modifiée, la PLP 2a. Celle-ci est codée par le gène *mecA* porté par un élément mobile, la SCCmec (*Staphylococcal Chromosome Cassette mec*) (Cain, 2013). De récentes études ont démontré que la résistance à la méthicilline chez les staphylocoques n'était pas seulement due à *mecA* mais également à un gène homologue appelé *mecC* (Becker et al.,

2014; Paterson et al., 2014). Les SARM représentent un problème émergent en médecine vétérinaire. En effet, des souches de SARM ont été isolées chez les animaux de compagnie ainsi que chez les animaux d'élevage (MRSA-LA : MRSA Livestock associated) (Weese, 2010). L'émergence de souches de SARM en médecine vétérinaire s'explique notamment par les contacts étroits entre les humains et les animaux mais aussi par l'utilisation accrue d'antibiotiques (Weese, 2010; Cuny et al., 2010). Chez les bovins laitiers, l'incidence des mammites à SARM demeure faible. Par exemple, au Canada, moins de 0.05 % des *S. aureus* en cause lors d'IIM chez la vache sont résistants à la méthicilline (Saini et al., 2012b).

Cependant il est important de respecter les mesures de préventions individuelles et collectives afin de prévenir la survenue de SARM notamment par une hygiène stricte des mains mais aussi en diminuant l'utilisation d'antibiotique au profit d'autres alternatives thérapeutiques (Gardete et Tomasz, 2014).

3. Staphylocoques à coagulase négative

3.1 Généralités

Les SCN sont des cocci à Gram positif qui à l'inverse de *S. aureus*, n'entraînent pas la coagulation du plasma de lapin (Murray et al., 1995). On dénombre 48 espèces et 23 sous-espèces de SCN, classées entre autres en fonction de leur sensibilité à la novobiocine (Piette et Verschraegen, 2009; Vanderhaeghen et al., 2015). Pendant longtemps les SCN ont été considérés comme de simples contaminants de culture. Ce n'est qu'à partir de 1970 qu'ils ont été reconnus comme agents étiologiques d'infections (Piette et Verschraegen, 2009). Ce sont des bactéries opportunistes commensales de la peau, des glandes cutanées et des muqueuses des mammifères à sang chaud (Prescott et al., 1995).

Chez l'animal, les SCN sont principalement associés aux IIM (Blowey et Edmondson, 2010). Chez la vache, les SCN sont les bactéries les plus fréquemment isolées au niveau de l'apex du trayon. En effet, elles représentent 59% des isolats totaux (Braem et al., 2013).

3.2 Pathogénicité

Les SCN sont, tout comme *S. aureus*, des bactéries pathogènes opportunistes de l'humain et des animaux. Dans le cas de *S. epidermidis*, commensale de la peau, la bactérie deviendra pathogène dès lors qu'il y aura une altération de la barrière épithéliale (Otto, 2012). La littérature sur les facteurs virulence des SCN est pauvre en comparaison à celle disponible pour *S. aureus*. Le tableau 3 présente les connaissances amassées sur les mécanismes moléculaires de virulence mis en évidence chez *S. epidermidis*, l'espèce de SCN la plus étudiée à ce niveau en raison de son importance en médecine humaine [Tableau 3] (Otto, 2012). De plus en plus d'articles mettent en évidence la présence de ces facteurs de virulence chez les autres espèces de SCN (Tremblay et al., 2013; Becker et al., 2014; Da et al., 2017; Soumya et al., 2017).

La formation de biofilm constitue un des facteurs de virulence des SCN (Piette et Verschraegen, 2009; Otto, 2012; Vanderhaeghen et al., 2014). Notamment en raison de son rôle dans l'adhésion des bactéries aux surfaces mais aussi dans l'échappement aux défenses de l'hôte. D'autres facteurs de virulence tels que des exoenzymes (ex : élastase, lipases, protéase à cystéine) ou plus récemment des entérotoxines ont été rapportés chez des souches de SCN (Otto, 2012).

Tableau 3: Facteurs de virulence de *Staphylococcus epidermidis*. D'après Otto, 2012.

Type de facteurs de virulence	Exemple	Gène	Fonction
Impliqués dans la formation de biofilm, plus particulièrement dans l'attachement primaire	AtlE, Aae	<i>atlE, aae</i>	Adhésine, autolysine
	Acides teichoïques		Attachement
	SdrF	<i>sdrF</i>	Liaison au collagène
	SdrG	<i>sdrG</i>	Liaison au fibrinogène
	SdrH	<i>sdrH</i>	Fonction putative de liaison seulement
	Ebp	<i>ebp</i>	Liaison à l'élastine
	Embp	<i>embp</i>	Liaison à la fibronectine
	AtlE/Aae	<i>atlE/aae</i>	Liaison aux protéines de la matrice
	Aap	<i>aap</i>	Liaison aux cornéocytes
Impliqués dans la formation de biofilm, plus particulièrement dans l'agrégation intercellulaire	PNAG/PIA	<i>icaADBC</i>	Adhésine intercellulaire de type polysaccharide Protection contre les IgG, la phagocytose et le système du complément
	Bap	<i>bap</i>	Adhésine intercellulaire de type protéique
	Aap	<i>aap</i>	Précurseur d'adhésine intercellulaire de type protéique
	Embp	<i>embp</i>	Adhésine intercellulaire de type protéique
Toxines	Acides teichoïques		Composant de la matrice du biofilm
	Enterotoxines (SEC3 et SE1L)	<i>sec3, se1L</i>	
	Modulines solubles dans le phénol (PSMs)	<i>psmβ1, psmβ2, psmα, psmδ et psmε</i>	Surfactants de biofilm, pro-inflammatoire Cytolysines, pro-inflammatoires
Exoenzymes	Protéase à cystéine (SspB, Ecp)	<i>sspB</i>	Inconnue (dommages tissulaires?)
	Métalloprotéase, élastase (SepA)	<i>sepA</i>	Dommages tissulaires?
	Endopeptidase glutamique (GluSE, SspA, Esp)	<i>sspA</i>	Dégradation du fibrinogène et du facteur C5 du complément
	Lipases GehC, GehD	<i>gehC, gehD</i>	
Autres	Enzyme modifiant les acides gras (FAME)		Détoxification des acides gras bactéricides

3.3 Diagnostic

Pendant longtemps, les SCN ont été considérés comme un seul groupe et notamment en raison de la difficulté à réaliser un diagnostic d'espèce. De ce fait, les SCN étaient seulement différenciés de *S. aureus* et cela en mettant en évidence leur incapacité à coaguler le plasma sanguin. Par la suite, un diagnostic plus sensible des SCN a été développé et notamment grâce à l'observation de la morphologie des colonies bactériennes (absence de pigments dorés pour la plupart des espèces de SCN) et à la réalisation de simples tests biochimiques comme par exemple la mise en évidence de thermonucléase. Cependant, la finalité de ce diagnostic était toujours d'écarter une infection à *S. aureus* et non d'identifier l'espèce de SCN en cause. En effet, l'identification d'espèce de SCN ne semblait pas être nécessaire pour une prise en charge optimale du patient. En revanche, l'identification d'espèces s'est avérée primordiale afin d'en savoir plus sur la pathogénicité des SCN (Huebner et Goldmann, 1999).

Chez l'homme, l'identification phénotypique des SCN est obtenue en utilisant des kits commerciaux d'identification (ex : API Staph ID ® BioMérieux) basés sur des caractéristiques spécifiques tels que la coagulation du plasma, l'hémolyse ou encore la réduction des nitrates (Piette et Verschragegen, 2009). L'identification phénotypique a cependant ses limites. En effet, il a été mis en évidence lors de l'identification d'isolats de SCN provenant de la vache que cette méthode présentait un faible degré d'exactitude et de typabilité (Vanderhaeghen et al., 2015). De ce fait, l'utilisation de techniques d'identifications moléculaires est de plus en plus privilégiée. Le séquençage de gènes de ménage ou constitutifs tels que l'ARN ribosomal 16S, *rpoB* ou encore *cpn60* est considéré comme la méthode d'identification d'espèces bactériennes la plus fiable et présentant la meilleure exactitude pour ce groupe de bactéries (Vanderhaeghen et al., 2015). L'analyse

par spectrométrie de masse MALDI-TOF a également été validée pour permettre une identification efficace des SCN (Carbannelle et al., 2007). Cette technique est couramment utilisée dans les laboratoires de diagnostic en médecine vétérinaire et notamment en raison de la rapidité d'obtention des résultats. Cette méthode a d'ailleurs été utilisée pour déterminer les SCN présents lors l'IIM chez la vache (Cameron et al., 2018; Cameron et al., 2017; Tomazi et al., 2014). De plus, nous avons également mis en évidence dans notre laboratoire la capacité du MALDI-TOF à identifier les SCN ainsi que d'autres bactéries responsables de MB directement à partir d'un biofilm (Annexe 1). Également utilisée dans le but d'identifier les SCN chez la vache, la technique d'analyse des courbes de fusion haute résolution (ou High Resolution Melting Analysis, HRMA) est une technique rapide, efficace et moins coûteuse que le MALDI-TOF (Ajitkumar et al., 2013).

3.4 Traitement et antibiorésistance

L'antibiorésistance chez les staphylocoques n'est pas un problème spécifique à *S. aureus*. En effet, la résistance à la pénicilline des SCN est évaluée de nos jours à environ 91% des souches cliniques en médecine humaine (Cuevas et al., 2004; Koksal et al., 2009; Piette et Verschraegen, 2009). Dans les cas des SCN obtenus à partir d'IIM, ces derniers semblent même être plus résistants aux antibiotiques que *S. aureus* et plus enclins à développer des multirésistances (Taponen et Pyörälä, 2009). Différentes études réalisées en Europe ont montré que les SCN étaient plus résistants à la pénicilline G que *S. aureus* à l'exception de la Finlande [Tableau 4]. Le constat est le même pour la résistance à la méthicilline, avec comme hypothèse que la cassette *SSC mec* a été transmise à *S. aureus* par les SCN [Tableau 4] (Taponen et Pyörälä, 2009; Saini et al., 2012b).

Tableau 4: Pourcentage de souches de staphylocoques isolées lors de cas de mammite bovine résistantes à la pénicilline ou à la méthicilline. D’après Taponen et Pyörälä, 2009 et Saini et al., 2012b.

	% de souches résistantes à la pénicilline		% de souches résistantes à la méthicilline		Références
	SCN	<i>S. aureus</i>	SCN	<i>S. aureus</i>	
Norvège	36%	7%	-	-	NORM-VET, 2005
Danemark	25%	18-30%	-	-	DANMAP, 2001
Pays-Bas	41-61%	7-12%	5%	0	MARAN, 2004 et 2005
Finlande	32%	52%	10%	4%	Pitkälä et al., 2004
Canada	-	8.8%	-	0.05%	Saini et al., 2012b

Chez les bovins, les SCN semblent en revanche mieux répondre aux traitements antibiotiques que *S. aureus*. En effet, les chances de guérison sont de 15 à 85% dans le cas d’une infection à *S. aureus* tandis que dans le cas d’une infection à SCN elles sont de 80 à 90% (Taponen et Pyörälä, 2009). Cependant, il ne faut pas négliger dans le cas des SCN le nombre élevé d’IIM qui sont éliminées par l’hôte lui-même, sans intervention thérapeutique. En effet, 79% des IIM à SCN sont éliminées sans aucun traitement en un mois (Dufour et al., 2012a). En revanche, en ce qui concerne *S. aureus*, le taux d’élimination des IIM est en général d’environ 30% avec une grande variation d’un troupeau à l’autre (Dufour et al., 2012b).

Chez les staphylocoques, la résistance aux antibiotiques constitue au même titre que la capacité à former un biofilm un facteur de virulence important. C’est pourquoi, la formation de biofilm constitue une cible intéressante dans le développement d’alternatives thérapeutiques aux antibiotiques.

III Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière : une revue bibliographique

Coralie GOETZ^{1,‡}, Simon DUFOUR^{1,‡}, Marie ARCHAMBAULT^{1,‡},

François MALOUIN^{2,‡} et Mario JACQUES^{1,‡,*}

¹ Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St Hyacinthe, QC, Canada.

² Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada.

[‡] Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale (Op+Lait),
St-Hyacinthe, QC, Canada.

* Correspondance: mario.jacques@umontreal.ca

Publiée en 2016 dans la Revue de médecine vétérinaire

167, 7-8, 215-229.

Implication de l'auteur dans cet article

Dans un premier temps, j'ai défini avec les autres co-auteurs, le sujet de la revue et les différents sujets à traiter.

Ensuite, j'ai fait un recueil de la littérature existante sur le sujet puis j'ai rédigé le manuscrit en respectant les recommandations du journal ciblé.

Par la suite, j'ai effectué les corrections demandées que ce soit celles des co-auteurs ou des réviseurs.

RÉSUMÉ

Le biofilm bactérien est un mode de vie permettant aux bactéries de survivre dans un environnement hostile et cela grâce à une plus grande tolérance aux biocides et à la réponse immunitaire de l'hôte que les bactéries sous forme libre ou planctonique. Les bactéries ayant la capacité de former des biofilms peuvent causer des complications cliniques chez l'animal dont les bovins. En effet, la plupart des espèces bactériennes fréquemment isolées lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière possèdent la capacité de former un biofilm. C'est notamment le cas des staphylocoques qui sont des agents pathogènes fréquents de la glande mammaire. La mammite bovine est une inflammation plus ou moins prononcée de la glande mammaire qui peut entraîner une réduction de l'activité sécrétrice de la glande, des signes visibles et quantifiables d'inconfort et de douleur et, parfois, la mort de l'animal. Les pertes économiques imputables à cette maladie sont considérables. Les connaissances se rapportant aux biofilms formés par les staphylocoques ont permis le développement de molécules antibiofilm ciblant spécifiquement les étapes de formation du biofilm. Ces molécules ont été développées afin d'être appliquées en médecine humaine et, malheureusement, très peu de données existent sur leur utilisation en médecine vétérinaire. Pourtant l'utilisation potentielle de ces molécules ayant une cible différente de celles des antibiotiques pourrait être proposée en monothérapie ou en combinaison avec un antibiotique afin d'augmenter l'efficacité de ce dernier et ainsi contribuer à définir de nouvelles alternatives thérapeutiques en médecine vétérinaire afin de mieux contrôler certaines maladies infectieuses animales dont la mammite bovine.

INTRODUCTION

Les mammites bovines constituent pour l'industrie laitière une des maladies les plus redoutées et cela notamment en raison de leur incidence élevée et de leurs impacts négatifs importants sur le bien-être animal, la production laitière et la qualité du lait [27, 42]. Les mammites sont une inflammation de la glande mammaire de la vache le plus souvent consécutive à une infection intra-mammaire (IIM) [9, 91]. Les pathogènes responsables de ces infections sont souvent classés en fonction de leur mode de transmission [9]. On parlera alors d'IIM d'origine environnementale (ex : les IIM à coliformes, à *Streptococcus uberis*), qui sont associées essentiellement à la forme clinique de la maladie, ou d'IIM d'origine contagieuse (ex : IIM à *Staphylococcus aureus*, à *Streptococcus agalactiae*) associées quant à elles majoritairement à la forme subclinique de la maladie (i.e. absence de signes visibles) [11, 87, 108]. Dans ce dernier cas, une procédure diagnostique devra être utilisée pour identifier les vaches ou les quartiers affectés. Le comptage des cellules somatiques (CCS) et l'analyse bactériologique du lait sont souvent utilisés à cette fin [29, 32].

Bien que, sur un individu donné le stade subclinique puisse évoluer vers un stade clinique et vice versa, d'un point de vue populationnel, ces deux formes de la maladie sont souvent considérées comme deux problèmes de santé indépendants [5, 72]. En effet, dans les troupeaux laitiers, il est fréquent d'observer une incidence élevée de mammite clinique sans problème majeur de CCS et le contraire est également souvent observé (i.e. CCS du réservoir élevé, mais peu de cas de mammite clinique) [5, 72].

Dans une étude récente menée sur une cohorte de 69 troupeaux canadiens, on estimait qu'en général 21.3% des vaches expérimentent au moins un épisode de mammite clinique durant une lactation standardisée de 305 jours [36]. Des données similaires ont été obtenues au Pays-Bas (28.6%), en Flandre (27%), en France dans des troupeaux présentant

un faible CCS (20.1%) ainsi qu'en Nouvelle-Zélande (22.7%) [7, 85, 93, 104]. Au Danemark, l'incidence d'épisode de mammite clinique semblait plus élevée (44.7%) [94].

Bien que très visibles et inquiétants pour les producteurs laitiers, les cas de mammite clinique entraînent généralement une baisse de production laitière relativement faible puisque ces événements sont souvent de courte durée. Dans le pire des cas, des pertes de production significatives pourront être observées sur près de 70 jours et seront suivies d'un retour à un niveau de production s'approchant, mais inférieur, au niveau de production initial [41].

La mammite subclinique est, quant à elle, beaucoup plus fréquente. Au Canada, des prévalences de quartiers infectés de 3.9 et 42.7% étaient rapportées pour l'espèce *S. aureus* et les SCN, respectivement [33, 34]. De manière similaire, des prévalences de quartiers infectés à *S. aureus* ou à SCN, respectivement de 3.1 et 9.7% ont été rapportées en Flandre [86]. Au Danemark, des prévalences de vaches infectées à *S. aureus* ou à SCN de 10.2 et 4.1% ont été observées [1]. Finalement, 9.7 et 13.2% des 77 172 échantillons de lait soumis au Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory entre 1994 et 2001 étaient positifs pour *S. aureus* ou SCN, respectivement [62].

Cependant, ces résultats s'intéressant à la prévalence d'IIM peuvent difficilement être comparés aux résultats d'incidence de mammite clinique. Malheureusement très peu de données existent sur l'incidence d'IIM par espèce bactérienne. Dans l'étude cohorte canadienne préalablement citée, on estimait qu'en général 7% des quartiers (i.e. approximativement 20 à 28% des vaches) développent une IIM à *S. aureus* durant une lactation standardisée de 305 jours (i.e. une incidence de 0.007 nouvelles IIM/quartier-mois [33]). Des résultats similaires ont été rapportés par Zadoks et al. [108]. Cependant, ces IIM persisteront souvent pour de longues périodes de temps, parfois pour la vie de l'animal, et entraîneront une inflammation et une baisse de production laitière continue et

persistante [28]. Pour d'autres pathogènes souvent impliqués lors de mammite subclinique, les SCN par exemple, une incidence encore plus élevée de nouvelles infections a été rapportée avec 290% des quartiers qui expérimentaient une nouvelle IIM à SCN durant une lactation de 305 jours (i.e. une incidence de 0.29 nouvelles IIM/quartier-mois [33]). Les IIM causées par ces derniers pathogènes, cependant, dureraient en général moins d'un mois et entraîneraient donc des baisses de production laitière relativement moins importantes [38].

La capacité que possèdent certains pathogènes, par exemple *S. aureus*, à persister dans la glande mammaire pour de longue période de temps est extrêmement problématique pour l'industrie laitière. Plusieurs mécanismes permettent l'échappement de la bactérie au système immunitaire de l'hôte et/ou aux approches thérapeutiques [6, 14]. Plus particulièrement, la capacité à former un biofilm a été démontrée en laboratoire pour plusieurs des pathogènes de la mammite dont *S. aureus*, *Escherichia coli*, et *S. uberis* [69]. Cette propriété est possiblement responsable de l'échec de certains traitements antibiotiques ce qui motive les chercheurs à définir de nouvelles alternatives thérapeutiques pour traiter la mammite en association ou non avec un traitement antibiotique [17]. Une bonne connaissance des composants et des différentes étapes de formation du biofilm ont permis de développer trois stratégies alternatives [23] : (1) inhibition de l'adhésion de la bactérie sous forme planctonique sur une surface et cela dans le but d'empêcher la formation du biofilm ; (2) perturbation de l'architecture du biofilm durant la phase de maturation ; (3) inhibition des signaux intra et intercellulaires. L'utilisation potentielle de ces molécules ayant une cible différente de celles des antibiotiques pourrait être proposée en monothérapie ou en combinaison avec un antibiotique afin d'augmenter l'efficacité de ce dernier et ainsi contribuer à mieux contrôler les maladies infectieuses animales dont la mammite bovine.

L'objectif de cette revue est de synthétiser les connaissances actuelles sur les biofilms, particulièrement ceux produits par les staphylocoques, et leur rôle dans le cas des IIM chez la vache laitière et de discuter les avenues potentielles de traitement ciblant le biofilm.

LE BIOFILM BACTÉRIEN

Généralités

Le biofilm bactérien est une communauté de bactéries qui s'agrègent en une microcolonie recouverte d'une matrice polymérique et adhèrent sur une surface biotique (ex : muqueuses) ou abiotique (ex : cathéters, surfaces ou équipements à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation) [24]. Il est estimé que près de 80 % de la biomasse microbienne de la planète résiderait sous forme de biofilm [89]. Ce mode de vie permet aux bactéries de survivre dans un environnement hostile et cela grâce entre autres à une plus grande résistance ou tolérance aux antibiotiques, aux désinfectants mais aussi à la réponse immunitaire de l'hôte, que les bactéries sous forme libre ou planctonique [17, 24, 68, 74, 95, 102]. Les bactéries ayant la capacité de former des biofilms peuvent amener des problèmes cliniques aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Les « National Institutes of Health » (NIH) aux États-Unis estiment que plus de 75% des infections microbiennes chez l'homme (ex : endocardite, fibrose kystique, infections associées aux soins) sont imputables à la persistance des bactéries sous forme de biofilm [43, 44, 82].

Caractéristiques communes des biofilms

Les bactéries ayant la capacité de former un biofilm présentent des caractéristiques conjointes [24, 102]. Premièrement, ces cellules bactériennes sont recouvertes d'une

matrice polymérique fortement hydratée (>90% d'eau) et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques (Figure 1). Cependant, leur répartition est fonction de l'espèce concernée. Par exemple, chez *S. aureus*, le polysaccharide le plus fréquemment retrouvé est un polymère de N-acétyl-D-glucosamine (nommé PNAG ou PIA, « polysaccharide intercellular adhesin ») [3].

Deuxièmement, le développement du biofilm répond à des signaux extracellulaires qui sont soit présents dans l'environnement proche de la bactérie soit produits par la bactérie elle-même comme par exemple le « quorum sensing » (QS) [70]. Le QS est un mécanisme de régulation de l'expression génique en réponse à des variations de la densité cellulaire. On parle alors de mécanisme de perception de densité cellulaire. Ce dernier est basé sur un principe de masse critique, c'est-à-dire qu'une fois que les concentrations en molécules signales atteignent une valeur seuil, des régulateurs transcriptionnels vont être activés et exercer un contrôle sur des gènes spécifiques impliqués notamment dans les stades tardifs de formation du biofilm. Le QS régule la physiologie du biofilm ainsi que l'épaisseur du biofilm. Il va également initier la phase de dispersion du biofilm [78].

Troisièmement, le biofilm protège les bactéries de toute agression extérieure telle que le système immunitaire de l'hôte, la dessiccation ou encore les biocides (antibiotiques et désinfectants) [24, 44].

Les différentes étapes de formation du biofilm

Les étapes de formation du biofilm suivent également un schéma similaire pour toutes les bactéries (Figure 2). On différencie en général cinq phases : (1) développement d'un film conditionnant sur une surface ; (2) mouvement des bactéries sous forme planctonique vers cette même surface ; (3) adhésion réversible puis irréversible des microorganismes à

la surface ; (4) croissance et division des microorganismes puis formation de microcolonies et maturation du biofilm ; (5) détachement et dispersion de cellules du biofilm [82].

Dans le texte qui suit, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux facteurs moléculaires d'adhésion et de dispersion qui sont des acteurs importants dans le développement de stratégies antibiofilm. Ces facteurs varient d'une espèce bactérienne à l'autre. Ici, nous nous intéresserons à ceux mis en place chez les staphylocoques [77].

L'attachement

Dans un premier temps, les cellules bactériennes sous forme planctonique vont venir s'agréger à une surface biotique ou abiotique par l'intermédiaire de transport passif (ex : sédimentation) ou alors de transport actif en faisant notamment intervenir des structures spécifiques de la bactérie (ex : flagelles chez *Pseudomonas aeruginosa*) [82]. Il s'en suivra une adhésion réversible correspondant à un attachement faible des cellules bactériennes à la surface et faisant intervenir des interactions faibles de type forces de Van der Waals et liaisons électrostatiques.

L'attachement sur une surface biotique se fera soit directement à la surface soit indirectement par l'intermédiaire d'un film conditionnant formé par les molécules de la matrice de l'hôte et reconnus par les MSCRAMMs (« microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules ») qui sont ancrées dans la membrane cellulaire de la bactérie [77]. On distinguera 3 types de MSCRAMMs en fonction de leur ligand (i.e. fibronectine, collagène et fibrinogène). La formation d'un film conditionnant pourra également être observée lors de l'attachement à une surface abiotique. Dans ce cas-là, l'attachement sera dépendant des caractéristiques physicochimiques du matériel impliqué ainsi que de la surface de la bactérie mise en cause (hydrophobicité et exopolysaccharides). Si la cellule réside assez longtemps à la surface, l'adhésion deviendra irréversible et

entraînera l'adhésion permanente du microorganisme à cette même surface et cela grâce à des interactions fortes et spécifiques.

Une fois que l'attachement des cellules bactériennes à la surface sera définitif, celles-ci vont s'agréger entre elles et former des microcolonies. On observera ensuite la croissance et la maturation du biofilm qui sera régi par des forces d'adhésion notamment pour permettre l'agglutination des bactéries entre elles mais également par des forces perturbatrices qui vont quant à elles permettre au biofilm d'acquies sa structure finale mais également plus tardivement de permettre le détachement d'amas de cellules bactériennes du biofilm [77].

Chez les staphylocoques, la molécule d'adhésion la plus importante est le PNAG ou PIA [76]. Ce dernier est codé par les gènes du locus *ica*. *icaA* et *icaD* interviennent notamment dans la synthèse d'une N-acétyl-D-glucosamine transférase dont le rôle est d'ajouter des résidus N-acétyl-glucosamine à la chaîne oligo N-acétyl-glucosamine en cours de polymérisation. *icaC* quant à lui code pour le transporteur du PNAG. Enfin, IcaB va déacétyler le pré-PNAG après son exportation. Les charges positives introduites par la N-déacétylation vont notamment expliquer la localisation du PNAG à la surface de la bactérie.

En revanche, des souches de staphylocoques ayant la capacité de former des biofilms ne possédant pas les gènes du locus *ica* ont permis de mettre en évidence l'implication de protéines dans l'adhésion du biofilm telles que Aap (« Accumulation associated protein »), Embp (« Extracellular matrix binding protein »), FnBps (« Fibronectin binding proteins ») ou encore la protéine A [77]. Leurs mécanismes d'implication dans l'adhésion cellule-cellule ne sont cependant pas encore totalement élucidés. Des polymères semblent également impliqués dans cette phase comme par exemple l'acide teichoïque qui interagit avec d'autres polymères de surface par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques.

L'ADN extracellulaire (eDNA) libéré par les bactéries lysées semble également impliqué dans l'interaction avec d'autres structures de surface de la bactérie et de l'hôte et cela grâce à ses charges négatives [77].

Le détachement

Une fois la taille maximale du biofilm atteinte, différents mécanismes de dispersion vont intervenir [61]. Ce phénomène pourra être initié par différents facteurs tels qu'une perturbation mécanique (ex : forces de cisaillement), une dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire (ex : DNase) ou du substrat sur lequel le biofilm est attaché (ex : hyaluronidase), une induction de la motilité, une production d'agents tensioactifs ou encore un relâchement dans l'environnement extérieur d'exopolysaccharides [51]. Le mécanisme majeur mis en place par *S. aureus* est la production d'enzymes et de surfactants dans le but de dégrader plus ou moins spécifiquement les composants de la matrice polysaccharidique.

L'implication des PSM (« phenol soluble modulins »), une famille de toxines isolées notamment dans des souches de *S. aureus* très virulentes, dans le développement du biofilm et surtout dans le détachement des cellules bactériennes a été démontrée [84]. Chez les staphylocoques, la régulation de ces toxines est prise en charge par le système Agr (« Accessory gene regulator »).

Le système Agr est le nom donné au QS chez les staphylocoques. Ce système est activé par des peptides auto-induits (AIP), codés et produits par l'opéron *agr*. Ce système contrôle également d'autres facteurs de détachement, quant à eux plus spécifiques, les protéases.

On compte chez *S. aureus*, 10 protéases dont 7 sérine protéases, 2 cystéine protéases et 1 métalloprotéase. Celles-ci sont impliquées dans la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire et de ce fait de la déstabilisation du biofilm. La protéase V8, par

exemple, dégrade spécifiquement Bap (« Biofilm associated protein ») et FnBPs. À noter, que des protéases notamment produites par *Staphylococcus epidermidis*, semblent également entraîner la dispersion du biofilm de *S. aureus* [61].

D'autres mécanismes enzymatiques sont également impliqués dans cette étape de détachement, comme les nucléases ou encore la dispersine B. Cette dernière, isolée chez *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, va induire une dispersion du biofilm de *S. aureus* et de *S. epidermidis* en hydrolysant la liaison glycosidique du PNAG, dégradant ainsi la matrice et entraînant le détachement de cellules bactériennes du biofilm [52].

Le détachement est une étape clé dans la transmission et la persistance du biofilm car il entraîne la dispersion de cellules planctoniques qui vont coloniser d'autres surfaces et ainsi pouvoir conduire à la transmission de la bactérie de l'environnement vers un hôte mais aussi entre individus ou encore à une propagation de l'infection chez un même individu.

Afin d'étudier la formation et la dispersion du biofilm mais également de déterminer l'effet de molécules thérapeutiques sur celui-ci, plusieurs techniques sont disponibles en laboratoire. Parmi elles, on distinguera les méthodes statiques telles que les microplaques 96 puits et le "biofilm ring test", des méthodes dynamiques telles que le "drip flow cell" et la microfluidique. Les caractéristiques de ces différentes techniques, mais également leurs avantages et inconvénients, sont dans le tableau 1.

Rôle du biofilm lors d'infections intra-mammaires

En médecine vétérinaire, les bactéries pouvant former des biofilms sont responsables de nombreuses pathologies persistantes et sont notamment impliquées dans les infections chroniques non traitables, les infections associées à du matériel chirurgical, mais aussi, dans la mammite bovine [39, 69, 100]. En effet, des études ont mis en évidence la capacité

à former un biofilm par les pathogènes de la mammite [69]. C'est notamment le cas pour *S. aureus*, *E. coli*, *S. uberis* et les SCN [69, 100]. Le biofilm est présenté comme un facteur de virulence de ces bactéries dans les IIM. Chez *S. aureus*, la formation de biofilm est associée à la persistance des IIM mais également à la perte de sensibilité de la bactérie aux traitements antibiotiques. Chez les SCN, la formation de biofilm semble aussi intervenir dans la persistance puisque sa production est associée à des stades plus avancés de la lactation [100] mais également à une perte de sensibilité aux biocides. En effet, une étude réalisée sur des souches de SCN isolées dans des cas de mammite bovine a montré que les souches ayant la capacité à former un biofilm présentaient une sensibilité diminuée aux antibiotiques et désinfectants couramment utilisés [101]. Il faudra, par exemple, utiliser une dose d'antibiotique (pénicilline G/novobiocine ou ceftiofur) 4 à 2048 fois supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) afin de pouvoir éradiquer le biofilm formé par les souches de SCN [101]. Ces souches vont également présenter une sensibilité diminuée aux désinfectants à base d'iode. En effet, un temps de contact 2 à 10 fois supérieur sera nécessaire afin d'éradiquer complètement le biofilm formé [101]. En revanche, la chlorhexidine présenterait la même efficacité sur les différentes souches de SCN testées qu'elles soient sous forme planctonique ou sous forme biofilm [101].

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer la perte de sensibilité des bactéries sous forme biofilm vis-à-vis des agents antimicrobiens [24, 44]. Premièrement, la matrice polymérique agit comme une barrière et diminue ou empêche la diffusion de l'antibiotique dans le biofilm. La concentration d'antibiotique ne sera alors plus suffisante pour endommager la bactérie ciblée. Deuxièmement, la matrice polymérique présente des charges électrostatiques à sa surface qui vont fixer et bloquer certains agents antimicrobiens empêchant une fois encore d'atteindre une concentration suffisante d'antibiotique. La dernière explication concerne l'état physiologique des cellules

bactériennes du biofilm qui, du fait d'une faible concentration en éléments nutritifs ainsi qu'en oxygène à certains endroits du biofilm, seront peu actives voir dormantes et ne seront donc pas ciblées par les antibiotiques inhibant le processus métabolique bactérien. Ces cellules dites persistantes permettront alors la repopulation du biofilm affaibli par le traitement antibiotique et conduiront à une chronicité de l'infection [49]. De plus, les bactéries cultivées en condition de biofilm mixte (i.e. comportant plus d'une espèce microbienne) présentent une diminution de leur sensibilité aux antibiotiques en comparaison à celle cultivées en condition de biofilm simple. Par exemple, une espèce bactérienne habituellement sensible aux β -lactamines pourra être protégée contre l'action de ces antibiotiques grâce à la production d'une β -lactamase par une autre espèce bactérienne présente dans le biofilm mixte [44].

La résistance ou tolérance conférée aux bactéries du biofilm est responsable de l'échec de certains traitements antibiotiques ce qui pousse à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, en association ou non, avec le traitement antibiotique initial [17].

LES ANTIBIOFILMS

Généralités

Différentes stratégies sont envisagées pour prévenir ou inhiber le développement du biofilm [92]. Par exemple, en limitant l'étape d'adhésion, le passage de la forme planctonique à la forme biofilm, l'étape de maturation ou les échanges intercellulaires. Mais aussi en réactivant les cellules dormantes ou encore en favorisant la dispersion des cellules bactériennes du biofilm [10].

Les antibiofilms chez les staphylocoques

L'importance des infections chroniques à staphylocoques en médecine animale et en médecine humaine justifie la recherche d'alternatives thérapeutiques aux antibiotiques. Un éventail de stratégies thérapeutiques curatives ou préventives ciblant les différentes étapes de formation du biofilm est proposé en médecine humaine. La littérature se rapportant à l'utilisation de molécules antibiofilm chez l'animal est quant à elle beaucoup moins documentée. Les exemples qui suivent portent donc presque exclusivement sur des données obtenues en médecine humaine.

Inhibiteurs de l'attachement de la bactérie sous forme planctonique à une surface

La façon la plus simple d'inhiber le développement d'un biofilm est d'empêcher sa formation et cela notamment en perturbant l'attachement des bactéries sous forme planctonique à une surface biotique ou abiotique. L'attachement est contrôlé par différents facteurs tels que les protéines d'adhésion de la bactérie mais également les propriétés physico-chimiques de la surface en question [30].

De ce fait de nouvelles stratégies ont été proposées afin de bloquer les stades précoces du développement du biofilm en prévenant l'attachement de la bactérie à une surface abiotique. Cela pourra se faire soit en utilisant des surfaces modifiées soit en recouvrant les surfaces avec des composés limitant l'adhésion des bactéries comme c'est le cas de l'aryl-rhodamine [23]. Les différentes propriétés de ces stratégies alternatives (nature du composé, origine, spectre et mode d'action), sont représentées dans le tableau 2. Cependant cette stratégie n'est pas adaptée aux IIM étant donné que l'objectif sera, dans ce cas, d'éradiquer un biofilm déjà formé sur une surface biotique, la glande mammaire. En revanche, ce type de stratégie peut être intéressant pour l'industrie laitière notamment en

empêchant la formation de biofilm sur la surface des équipements utilisés pour la récolte et l'entreposage du lait sur les fermes ou encore dans les usines de transformation du lait [99].

Perturbateur de l'architecture du biofilm

La majorité des molécules antibiofilm proposées dans la littérature agissent en perturbant l'architecture du biofilm (Tableau 3), et cela soit par inhibition de la formation du biofilm soit par induction de sa dispersion. Dans ce dernier cas, les cellules libérées dans le milieu extérieur recouvreront leur sensibilité initiale aux antibiotiques. De ce fait, les molécules induisant une dispersion des cellules du biofilm seront indiquées en association à une antibiothérapie. Parmi les différentes alternatives proposées, on retrouve essentiellement des enzymes ciblant la matrice comme par exemple la dispersine B qui est une enzyme catalysant l'hydrolyse du PNAG et va ainsi perturber l'architecture du biofilm de staphylocoques [52]. Mais également des molécules signales telle que l'acide cis-2-décénoïque qui en plus d'inhiber la formation du biofilm va aussi induire sa dispersion [25]. L'immunothérapie [83] et la phagothérapie [15, 54] sont également des alternatives prometteuses. Les molécules antibiofilm perturbant l'architecture pourrait ainsi être utilisées pour traiter les IIM en association (molécules dispersant le biofilm) ou non (molécules inhibant la formation de biofilm) avec un traitement antibiotique comme par exemple avec les céphalosporines, la pénicilline ou encore les combinaisons thérapeutiques associées à la pénicilline.

Perturbateurs des signaux intra et extracellulaires

Les bactéries sont exposées à différents signaux. Ils peuvent être mécaniques (ex : « surface sensing »), environnementaux (ex : concentrations en fer, en glucose, en oxygène), intracellulaires (ex : c-di-GMP) ou encore être basés sur la densité cellulaire

(ex : QS). Ces mécanismes sont impliqués dans la formation mais également dans la dispersion du biofilm, la perturbation de ces signaux peut constituer une nouvelle alternative thérapeutique (Tableau 4). Et cela notamment par le développement d'inhibiteurs du QS. Ces petites molécules non peptidiques, peptides ou protéines vont agir soit en inhibant la génération de ces signaux soit en bloquant le récepteur du signal soit en perturbant le signal émis et de ce fait altérer les interactions intercellulaires nécessaires à la formation d'un biofilm. Ce type de molécule peut s'avérer intéressant également dans le traitement des IIM en association ou non avec les antibiotiques conventionnels.

Les antibiofilms dans le traitement des IIM à staphylocoques chez les bovins

Parmi les différentes stratégies proposées précédemment, très peu d'études s'intéressent à l'application des molécules antibiofilm en médecine vétérinaire dans le traitement des infections à staphylocoques [12, 37, 53, 57]. Pourtant cette alternative pourrait s'avérer intéressante étant donné les problèmes liés à l'utilisation des antibiotiques dans le traitement de la MB à staphylocoques (e.g. développement de résistance, présence de résidus dans le lait, temps de retrait) [73]. Des études devront être réalisées afin d'évaluer l'efficacité de ces différentes molécules dans un contexte d'IIM chez la vache laitière mais également d'établir les limites liées à leur formulation, leur mode d'administration ainsi qu'à leur toxicité. De ce fait, nous pouvons spéculer sur l'administration d'une molécule antibiofilm idéale. Dans un premier temps, celle-ci pourrait être dispensée sous différentes formulations telles qu'une pommade ou un onguent, une suspension intramammaire, une solution de trempage ou encore des lingettes pré-imprégnées. Ensuite, en fonction de la forme galénique utilisée, un schéma thérapeutique sera mis en place. Dans le cas de suspensions, le produit sera administré par

voie intramammaire et pourra être utilisé lors de la phase de tarissement afin de prévenir les nouvelles IIM mais également de traiter les IIM préexistantes (infusion intramammaire). Dans le cas d'une solution de trempage, de lingettes, de pommades ou d'onguent, la molécule pourra être administrée par voie topique après la traite afin de déloger les bactéries de l'extrémité du trayon et ainsi prévenir la survenue d'IIM. Finalement, il faudra vérifier l'efficacité du produit chez la vache. Pour cela, les paramètres pharmacocinétiques (e.g. biodisponibilité, concentration maximale, volume de distribution, demi-vie d'élimination, et clairance) et pharmacodynamiques (fenêtre thérapeutique) devront être mesurés. De plus, il sera important de vérifier que l'effet n'est pas diminué dans le lait comme c'est le cas pour l'oxytétracycline qui est quatre fois moins efficace dans le lait [9].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La littérature se rapportant aux staphylocoques et à leur capacité à former un biofilm est plutôt complète. En effet, on connaît assez bien les différentes étapes et composantes du biofilm de staphylocoques particulièrement chez les souches d'origine humaine. Cette connaissance a d'ailleurs permis le développement d'une variété de molécules antibiofilm ciblant spécifiquement les étapes d'attachement, de maturation et de dispersion du biofilm. L'utilisation potentielle de ces molécules ayant une cible différente de celles des antibiotiques pourra être proposée en monothérapie ou en combinaison avec un antibiotique afin d'augmenter l'efficacité de ce dernier. Des études devront par contre être réalisées afin d'évaluer l'efficacité de ces différentes molécules ainsi que les limites liées à leur utilisation dans un contexte d'IIM chez la vache laitière.

REMERCIEMENTS

CG a reçu une bourse du Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale (Op+Lait), un regroupement stratégique financé par le Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies et les Producteurs de lait du Québec. Les travaux de MJ, SD et FM sont financés en partie par la Grappe de recherche laitière (Les producteurs laitiers du Canada, Agriculture et Agroalimentaire Canada et la Commission canadienne du lait).

LEGENDES DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Composition du biofilm.

Les cellules bactériennes sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques. D'après Lister et al., 2014 [61].

Figure 2: Les différentes étapes de formation du biofilm.

Les bactéries sous forme libre ou planctonique vont adhérer à une surface, s'agréger et former des microcolonies. S'en suivra une différenciation de ces dernières en biofilm avec une croissance et une maturation de ce dernier jusqu'à sa taille maximale puis un détachement et une dispersion de bactéries qui vont-elles-mêmes aller coloniser de nouvelles surfaces.

Tableau 1 : Les méthodes d'étude du biofilm les plus couramment utilisées en laboratoire.

Plusieurs techniques sont disponibles en laboratoire afin d'étudier la formation et la dispersion du biofilm mais également afin de déterminer l'effet de molécules thérapeutiques sur celui-ci. Le choix de la technique se fera en fonction de ses avantages et inconvénients mais également en fonction de son usage. D'après Lebeaux et col [60].

Tableau 2 : Inhibiteurs de l'attachement de la bactérie sous forme planctonique à une surface biotique ou abiotique.

Le développement de surfaces recouvertes de substances antibactériennes va empêcher l'attachement des cellules bactériennes sous forme planctonique à cette surface et ainsi bloquer la formation future d'un biofilm.

Tableau 3 : Perturbateurs de l'architecture du biofilm.

Les molécules antibiofilm perturbant l'architecture du biofilm vont agir soit en bloquant le développement d'un biofilm mature soit en entraînant la dispersion des cellules du biofilm.

Tableau 4 : Perturbateurs de la signalisation inter et intracellulaire.

Les molécules antibiofilm perturbant la signalisation inter et intracellulaire vont agir en inhibant la génération de ces signaux, en bloquant le récepteur du signal ou encore en perturbant le signal émis.

BIBLIOGRAPHIE

1. AARESTRUP F.M., WEGENER H.C., ROSDAHL V.T., JENSEN N.E.: Staphylococcal and other bacterial species associated with intramammary infections in Danish dairy herds. *Acta Vet Scand.*, 1995, **36**, 475-487.
2. ABRAHAM N.M., LAMLERTTHON S., FOWLER V.G., JEFFERSON K.K.: Chelating agents exert distinct effects on biofilm formation in *Staphylococcus aureus* depending on strain background: role for clumping factor B. *J Med Microbiol.*, 2012, **61**, 1062-1070.
3. ARCIOLA C.R., CAMPOCCIA D., RAVAIOLI S., MONTANARO L.: Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol.*, 2015, 5:7. eCollection 2015. Review.
4. ARTINI M., PAPA R., BARBATO G., SCOARUGHI G.L., CELLINI A., MORAZZONI P., BOMBARDELLI E., SELAN L.: Bacterial biofilm formation inhibitory activity revealed for plant derived natural compounds. *Bioorg Med Chem.*, 2012, **20**, 920-926.
5. BARKEMA H.W., SCHUKKEN Y.H., LAM T.J., BEIBOER M.L., WILMINK H., BENEDICTUS G., BRAND A.: Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J Dairy Sci.*, 1998, **81**, 411-419.
6. BARKEMA H.W., SCHUKKEN Y.H., ZADOKS R.N.: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.*, 2006, **89**, 1877-1895.
7. BARNOUIN J., BORD S., BAZIN S., CHASSAGNE M.: Dairy management practices associated with incidence rate of clinical mastitis in low somatic cell score herds in France. *J Dairy Sci.*, 2005, **88**, 3700-3709.
8. BENOIT M.R., CONANT C.G., IONESCU-ZANETTI C., SCHWARTZ M., MATIN A.: New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. *Appl Environ Microbiol.*, 2010, **76**, 4136-4142.
9. BLOWEY R., EDMONDSON P.: Mastitis control in dairy herds, 256 pages, Kindle edition, Londres, 2010.
10. BORDI C., DE BENTZMANN S.: Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. *Ann Intensive Care*, 2011, **1**, 19.

11. BRADLEY A.J., GREEN M.J.: Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J Clin Microbiol.*, 2001, **39**, 1845-1849.
12. BRADY R.A., O'MAY G.A., LEID J.G., PRIOR M.L., COSTERTON J.W., SHIRTLIFF M.E.: Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. *Infect Immun.*, 2011, **79**, 1797-1803.
13. BUDRI P.E., SILVA N.C., BONSAGLIA E.C., FERNANDES JÚNIOR A., ARAÚJO JÚNIOR J.P., DOYAMA J.T., GONÇALVES J.L., SANTOS M.V., FITZGERALD-HUGHES D., RALL V.L.: Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. *J Dairy Sci.*, 2015, **98**, 5899-5904.
14. CAIN C.L.: Antimicrobial resistance in staphylococci in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 2013, **43**, 19-40.
15. CERCA N., OLIVEIRA R., AZEREDO J.: Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* planktonic cells and biofilms to the lytic action of *Staphylococcus* bacteriophage K. *Lett Appl Microbiol.*, 2007, **45**, 313-317.
16. CERI H., OLSON M.E., STREMICK C., READ R.R., MORCK D., BURET A.: The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.*, 1999, **37**, 1771-1776.
17. CERI H., OLSON M.E., TURNER R.J.: Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opin Pharmacother.*, 2010, **11**, 1233-1237.
18. CHAIGNON P., SADOVSKAYA I., RAGUNAH CH., RAMASUBBU N., KAPLAN J.B., JABBOURI S.: Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2007, **75**, 125-132.
19. CHAVANT P., GAILLARD-MARTINIE B., TALON R., HÉBRAUD M., BERNARDI T.: A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods*, 2007, **68**, 605-612.
20. CHERNOUSOVA S., EPPLE M.: Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2013, **52**, 1636-1653.

21. CHRISTENSEN G.D., SIMPSON W.A., BISNO A.L., BEACHEY E.H.: Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun.*, 1982, **37**, 318-326.
22. CHRISTENSEN G.D., SIMPSON W.A., YOUNGER J.J., BADDOUR L.M., BARRETT F.F., MELTON D.M, BEACHEY E.H.: Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.*, 1985, **22**, 996-1006.
23. CHUNG P.Y., TOH Y.S.: Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathog Dis.*, 2014, **70**, 231-239.
24. COSTERTON J.W, STEWART P.S, GREENBERG E.P.: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, **284**, 1318-1322.
25. DAVIES D.G., MARQUES C.N.: A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol.*, 2009, **191**, 1393-1403.
26. DE LA FUENTE-NÚÑEZ C., REFFUVEILLE F., HANEY E.F., STRAUS S.K., HANCOCK R.E.: Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog.*, 2014, 10(5).
27. DE VliegHER S., FOX L.K., PIEPERS S., MCDougALL S., BARKEMA H.W.: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci.*, 2012, **95**, 1025-1040.
28. DJABRI B., BAREILLE N., BEAUDEAU F., SEEGER S.H.: Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Vet Res.*, 2002, **33**, 335-357.
29. DOHOO I.R., SMITH J., ANDERSEN S., KELTON D.F., GODDEN S.: Diagnosing intramammary infections: evaluation of definitions based on a single milk sample. *J Dairy Sci.*, 2011, **94**, 250-261.
30. DONLAN R.M.: Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.*, 2002,**8**, 881-890.
31. DRAGO L., DE VECCHI E., MATTINA R., ROMANÒ C.L.: Activity of N-acetyl-L-cysteine against biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on orthopedic prosthetic materials. *Int J Artif Organs*, 2013, **36**, 39-46.
32. DUFOUR S., DOHOO I.R.: Monitoring herd incidence of intramammary infection in lactating cows using repeated longitudinal somatic cell count measurements. *J Dairy Sci.*, 2013, **96**,1568-1580.

33. DUFOUR S., DOHOO I.R., BARKEMA H.W., DESCÔTEAUX L., DEVRIES T.J., REYHER K.K., ROY J.P., SCHOLL D.T.: Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. *J Dairy Sci.*, 2012, **95**, 1283-1300.
34. DUFOUR S., DOHOO I.R., BARKEMA H.W., DESCÔTEAUX L., DEVRIES T.J., REYHER K.K., ROY J.P., SCHOLL D.T.: Epidemiology of coagulase-negative staphylococci intramammary infection in dairy cattle and the effect of bacteriological culture misclassification. *J Dairy Sci.*, 2012, **95**, 3110-3124.
35. DÜRIG A., KOUSKOUMVEKAKI I., VEJBORG R.M., KLEMM P.: Chemoinformatics-assisted development of new anti-biofilm compounds. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2010, **87**, 309-317.
36. ELGHAFGHUF A., DUFOUR S., REYHER K., DOHOO I., STRYHN H.: Survival analysis of clinical mastitis data using a nested frailty Cox model fit as a mixed-effects Poisson model. *Prev Vet Med.*, 2014, **117**, 456-468.
37. FEDERMAN C., JOO J., ALMARIO J.A., SALAHEEN S., BISWAS D.: Citrus-derived oil inhibits *Staphylococcus aureus* growth and alters its interactions with bovine mammary cells. *J Dairy Sci.*, 2016, **99**, 3667-3674.
38. FRY P.R., MIDDLETON J.R., DUFOUR S., PERRY J., SCHOLL D., DOHOO I.: Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. *J Dairy Sci.*, 2014, **97**, 4876-4885.
39. GARDNER A.J., PERCIVAL S.L., COCHRANE C.A.: Biofilms and role to infection and disease in veterinary medicine. In Percival SL (éd), Knottenbelt D.C. (éd), Cochrane C.A. (éd): *Biofilms and veterinary medicine*, Springer, Heidelberg, 2011, 111-129.
40. GOERES D.M., HAMILTON M.A., BECK N.A., BUCKINGHAM-MEYER K., HILYARD J.D., LOETTERLE L.R., LORENZ L.A., WALKER D.K., STEWART P.S.: A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nat Protoc.*, 2009, **4**, 783-788.
41. GRÖHN Y.T., WILSON D.J., GONZÁLEZ R.N., HERTL J.A., SCHULTE H., BENNETT G., SCHUKKEN Y.H.: Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci.*, 2004, **87**, 3358-3374.

42. HALASA T., HUIJPS K., ØSTERÅS O., HOGVEEN H.: Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q.*, 2007, **29**, 18-31.
43. HALL-STOODLEY L., COSTERTON J.W., STOODLEY P.: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.*, 2004, **2**, 95-108.
44. HALL-STOODLEY L., STOODLEY P.: Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.*, 2009, **11**, 1034-1043.
45. HEYDORN A., NIELSEN A.T., HENTZER M., STERNBERG C., GIVSKOV M., ERSBØLL B.K., MOLIN S.: Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 2000, **146**, 2395-2407.
46. HOOK A.L., CHANG C.Y., YANG J., LUCKETT J., COCKAYNE A., ATKINSON S., MEI Y., BAYSTON R., IRVINE D.J., LANGER R., ANDERSON D.G., WILLIAMS P., DAVIES M.C., ALEXANDER M.R.: Combinatorial discovery of polymers resistant to bacterial attachment. *Nat Biotechnol.*, 2012, **30**, 868-875.
47. HUIGENS R.W. 3RD, MA L., GAMBINO C., MOELLER P.D., BASSO A., CAVANAGH J., WOZNIAK D.J., MELANDER C.: Control of bacterial biofilms with marine alkaloid derivatives. *Mol Biosyst.*, 2008, **4**, 614-621.
48. HUME E.B., BAVEJA J., MUIR B., SCHUBERT T.L., KUMAR N., KJELLEBERG S., GRIESSER H.J., THISSEN H., READ R., POOLE-WARREN L.A., SCHINDHELM K., WILLCOX M.D.: The control of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and in vivo infection rates by covalently bound furanones. *Biomaterials*, 2004, **25**, 5023-5030.
49. HUMPHREYS G.J., MC BAIN A.J.: An introduction to the biology of biofilm recalcitrance. In Percival S.L. (éd), Williams D. (éd), Randle J. (éd): Biofilms in infection prevention and control, Elsevier Academic Press, San Diego, 2014, 245-256.
50. IWASE T., UEHARA Y., SHINJI H., TAJIMA A., SEO H., TAKADA K., AGATA T., MIZUNOE Y.: *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, 2010, **465**, 346-349.
51. JACQUES M., ARAGON V., TREMBLAY Y.D.: Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim Health Res Rev.*, 2010, **11**, 97-121.
52. KAPLAN J.B., RAGUNATH C., VELLIYAGOUNDER K., FINE D.H., RAMASUBBU N.: Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2004, **48**, 2633-2336.

53. KARAOLIS D.K., RASHID M.H., CHYTHANYA R., LUO W., HYODO M., HAYAKAWA Y.: c-di-GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2005, **49**, 1029-1038.
54. KELLY D., MCAULIFFE O., ROSS R.P., COFFEY A.: Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives. *Lett Appl Microbiol.*, 2012, **54**, 286-291.
55. KIEDROWSKI M.R., KAVANAUGH J.S., MALONE C.L., MOOTZ J.M., VOYICH J.M., SMELTZER M.S., BAYLES K.W., HORSWILL A.R.: Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 2011, **6**.
56. KIRAN M.D., ADIKESAVAN N.V., CIRIONI O., GIACOMETTI A., SILVESTRI C., SCALISE G., GHISELLI R., SABA V., ORLANDO F., SHOHAM M., BALABAN N.: Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening. *Mol Pharmacol.*, 2008, **73**, 1578-1586.
57. KLEIN R.C., FABRES-KLEIN M.H., DE OLIVEIRA L.L., FEIO R.N., MALOUIN F., RIBON ADE O.: A C-Type Lectin from *Bothrops jararacussu* Venom Disrupts Staphylococcal Biofilms. *PLoS One*, 2015, **10**.
58. KOKAI-KUN J.F., CHANTURIYA T., MOND J.J.: Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice. *J Antimicrob Chemother.*, 2009, **64**, 94-100.
59. KWON A.S., PARK G.C., RYU S.Y., LIM D.H., LIM D.Y., CHOI C.H., PARK Y., LIM Y.: Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, **32**, 68-72.
60. LEBEAUX D., CHAUHAN A., RENDUELES O., BELOIN C.: From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens*, 2013, **2**, 288-356.
61. LISTER J.L., HORSWILL A.R.: *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol.*, 2014, **4**, 178.
62. MAKOVEC J.A., RUEGG P.L.: Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J Dairy Sci.*, 2003, **86**, 3466-3472.

63. MANN E.E., RICE K.C., BOLES B.R., ENDRES J.L., RANJIT D., CHANDRAMOHAN L., TSANG L.H., SMELTZER M.S., HORSWILL A.R., BAYLES K.W.: Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*, 2009, **4**.
64. MANN E.E., WOZNIAK D.J.: *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev.*, 2012, **36**, 893-916.
65. MARTÍ M., TROTONDA M.P., TORMO-MÁS M.A., VERGARA-IRIGARAY M., CHEUNG A.L., LASA I., PENADÉS J.R.: Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.*, 2010, **12**, 55-64.
66. MASURKAR S.A., CHAUDHARI P.R., SHIDORE V.B., KAMBLE S.P.: Effect of biologically synthesised silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* biofilm quenching and prevention of biofilm formation. *IET Nanobiotechnol.*, 2012, **6**, 110-114.
67. MDOWELL P., AFFAS Z., REYNOLDS C., HOLDEN M.T., WOOD S.J., SAINT S., COCKAYNE A., HILL P.J., DODD C.E., BYCROFT B.W., CHAN W.C., WILLIAMS P.: Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.*, 2001, **41**, 503-512.
68. MELCHIOR M.B., FINK-GREMMELS J., GAASTRA W.: Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2006, **53**, 326-332.
69. MELCHIOR M.B., Bovine mastitis and biofilms. In Percival SL (éd), Knottenbelt D.C. (éd), Cochrane C.A. (éd): *Biofilms and veterinary medicine*, Springer, Heidelberg, 2011, 205-222.
70. MILLER M.B., BASSLER B.L.: Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.*, 2001, **55**, 165-199.
71. NOSTRO A., SUDANO ROCCARO A., BISIGNANO G., MARINO A., CANNATELLI M.A., PIZZIMENTI F.C., CIONI P.L., PROCOPIO F., BLANCO A.R.: Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol.*, 2007, **56**, 519-523.
72. OLDE RIEKERINK R.G., BARKEMA H.W., KELTON D.F., SCHOLL D.T.: Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.*, 2008, **91**, 1366-77.

73. OLIVER S.P., MURINDA S.E.: Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 2012, **28**, 165-185.
74. OLSON M.E., CERI H., MORCK D.W., BURET A.G, READ R.R.: Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res.*, 2002, **66**, 86-92.
75. OPPERMAN T.J., KWASNY S.M., WILLIAMS J.D., KHAN A.R., PEET N.P., MOIR D.T., BOWLIN T.L.: Aryl rhodanines specifically inhibit staphylococcal and enterococcal biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2009, **53**, 4357-4367.
76. OTTO M.: Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol.*, 2012, **34**, 201-214.
77. OTTO M.: Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.*, 2013, **64**, 175-188.
78. PAN J., REN D.: Quorum sensing inhibitors: a patent overview. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2009, 19, 1581-1601.
79. PARK J., JAGASIA R., KAUFMANN G.F., MATHISON J.C., RUIZ D.I., MOSS J.A., MEIJLER M.M., ULEVITCH R.J., JANDA K.D.: Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. *Chem Biol.*, 2007, **14**, 1119-1127.
80. PARK J.H., LEE J.H., CHO M.H., HERZBERG M., LEE J.: Acceleration of protease effect on *Staphylococcus aureus* biofilm dispersal. *FEMS Microbiol Lett.*, 2012, **335**, 31-38.
81. PAYNE D.E., MARTIN N.R., PARZYCH K.R., RICKARD A.H., UNDERWOOD A., BOLES B.R.: Tannic acid inhibits *Staphylococcus aureus* surface colonization in an IsaA-dependent manner. *Infect Immun.*, 2013, **81**, 496-504.
82. PERCIVAL S.L., MALIC S., CRUZ H., WILLIAMS D.W.: Introduction aux biofilms. In Percival SL (éd), Knottenbelt D.C. (éd), Cochrane C.A. (éd): *Biofilms and veterinary medicine*, Springer, Heidelberg, 2011, 41-69.
83. PÉREZ M.M., PRENAFETA A., VALLE J., PENADÉS J., ROTA C., SOLANO C., MARCO J., GRILLÓ M.J., LASA I., IRACHE J.M., MAIRA-LITRAN T., JIMÉNEZ-BARBERO J., COSTA L., PIER G.B., DE ANDRÉS D., AMORENA B.: Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl beta-1,6

- glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. *Vaccine*, 2009, **27**, 2379-2386.
84. PESCHEL A., OTTO M.: Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol.*, 2013, **11**, 667-673.
85. PETROVSKI K.R., HEUER C., PARKINSON T.J., WILLIAMSON N.B.: The incidence and aetiology of clinical bovine mastitis on 14 farms in Northland, New Zealand. *N Z Vet J.*, 2009, **57**, 109-115.
86. PIEPERS S., DE MEULEMEESTER L., DE KRUIF A., OPSOMER G., BARKEMA H.W., DE VLIEGHER S.: Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J Dairy Res.*, 2007, **74**, 478-483.
87. PYÖRÄLÄ S., TAPONEN S.: Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol.*, 2009, **134**, 3-8.
88. RAHMAN M., KIM S., KIM S.M., SEOL S.Y., KIM J.: Characterization of induced *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin. *Biofouling*, 2011, **27**, 1087-1093.
89. RICHARDS J.J., MELANDER C.: Controlling bacterial biofilms. *ChemBioChem*, 2009, **10**, 2287-2294.
90. ROGERS S.A., HUIGENS R.W. 3RD, CAVANAGH J., MELANDER C.: Synergistic effects between conventional antibiotics and 2-aminoimidazole-derived antibiofilm agents. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2010, **54**, 2112-2118.
91. RUEGG P.L., ERSKINE R.J., MORIN D.E.: Mammary gland health. In Smith B.P. (éd.): Large animals internal medicine, fifth edition, Elsevier, St Louis, 2015, 1015-1043.
92. RUMBAUGH K.P. ET AHMAD I.: Antibiofilm agents: from diagnosis to treatment and prevention, Volume 8, 497 pages, Springer, Heidelberg, 2013.
93. SANTMAN-BERENDS I.M., SWINKELS J.M., LAM T.J., KEURENTJES J., VAN SCHAIK G.: Evaluation of udder health parameters and risk factors for clinical mastitis in Dutch dairy herds in the context of a restricted antimicrobial usage policy. *J Dairy Sci.*, 2016, **99**, 2930-2639.

94. SATO K., BARTLETT P.C., ALBAN L., AGGER J.F., HOUE H.: Managerial and environmental determinants of clinical mastitis in Danish dairy herds. *Acta Vet Scand.*, 2008, **50**, 4.
95. SCHERR T.D., HEIM C.E., MORRISON J.M., KIELIAN T.: Hiding in Plain Sight: Interplay between Staphylococcal Biofilms and Host Immunity. *Front Immunol.*, 2014, **5**.
96. SCHLAG S., NERZ C., BIRKENSTOCK T.A., ALTENBEREND F., GÖTZ F.: Inhibition of staphylococcal biofilm formation by nitrite. *J Bacteriol.*, 2007, **189**, 7911-7919.
97. SECINTI K.D., ÖZALP H., ATTAR A., SARGON M.F.: Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. *J Clin Neurosci.* 2011, **18**, 391-395.
98. SMITH R.S., ZHANG Z., BOUCHARD M., LI J., LAPP H.S., BROTSKE G.R., LUCCHINO D.L., WEAVER D., ROTH L.A., COURY A., BIGGERSTAFF J., SUKAVANESHVAR S., LANGER R., LOOSE C.: Vascular catheters with a nonleaching poly-sulfobetaine surface modification reduce thrombus formation and microbial attachment. *Sci Transl Med.*, 2012, **4**.
99. TEH H.K., FLINT S., BROOKS J. AND KNIGHT G.: Biofilms in the dairy industry, 263 pages, John Wiley & sons, Chichester, 2015.
100. TREMBLAY Y.D., LAMARCHE D., CHEVER P., HAINE D., MESSIER S., JACQUES M.: Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J Dairy Sci.*, 2013, **96**, 234-246.
101. TREMBLAY Y.D., CARON V., BLONDEAU A., MESSIER S., JACQUES M.: Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Vet Microbiol.*, 2014, **172**, 511-518.
102. TREMBLAY Y.D., HATHROUBI S., JACQUES M.: Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res.*, 2014, **78**, 110–116.
103. VEH K.A., KLEIN R.C., STER C., KEEFE G., LACASSE P., SCHOLL D., ROY J.-P., HAINE D., DUFOUR S., TALBOT B.G., RIBON A.O.B., MALOUIN F. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Causing Persistent and Non-Persistent Subclinical Bovine Intramammary-Quarter Infections During Lactation or at Dry-Off. *J Dairy Sci.*, 2015, **98**, 155-168.

104. VERBEKE J., PIEPERS S., SUPRÉ K., DE VliegHER S.: Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. *J Dairy Sci.*, 2014, **97**, 6926-6934.
105. WANG D., JIN Q., XIANG H., WANG W., GUO N., ZHANG K., TANG X., MENG R., FENG H., LIU L., WANG X., LIANG J., SHEN F., XING M., DENG X., YU L.: Transcriptional and functional analysis of the effects of magnolol: inhibition of autolysis and biofilms in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 2011, **6**.
106. WU J.A., KUSUMA C., MOND J.J., KOKAI-KUN J.F.: Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2003, **47**, 3407-3414.
107. YUJIE L., GENG X., HUANG Y.C., LI Y., YANG K., YE L., CHEN X., ZHAO G., YIN C.: The effect of brominated furanones on the formation of *Staphylococcus aureus* biofilm on PVC. *Cell Biochem Biophys.*, 2013, **67**, 1501-1505.
108. ZADOKS R.N., ALLORE H.G., BARKEMA H.W., SAMPIMON O.C., WELLENBERG G.J., GRÖHN Y.T., SCHUKKENT Y.H.: Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.*, 2001, **84**,

1

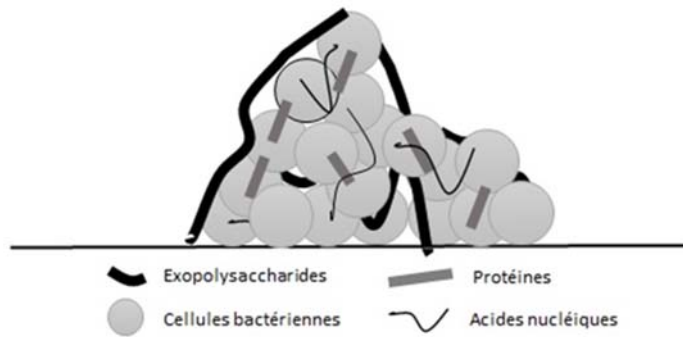


Figure 1 : Composition du biofilm.

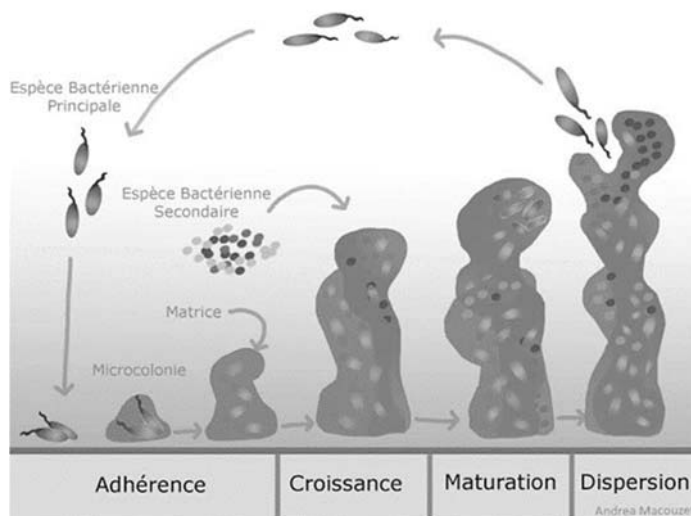


Figure 2 : Les différentes étapes de formation du biofilm.

Tableau 1: Les méthodes d'étude du biofilm les plus couramment utilisées en laboratoire.

Méthodes d'étude du biofilm	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients	Références
Microplaques 96 puits	Interface solide liquide ; Évaluation quantitative de la formation de biofilms par mesure de sa densité optique	Simple d'utilisation ; Rapide ; Criblage haut débit ; Compatible avec lecteur de plaques	Condition statique : pas de forces de cisaillement ; Aucun ajout de milieu frais	[22]
"Biofilm ring test"	Interface solide liquide ; Évaluation quantitative de la formation de biofilms par mesure de la capacité du biofilm à immobiliser des billes magnétiques	Simple d'utilisation ; Rapide ; Criblage haut débit ; Absence d'étapes de lavage et coloration	Condition statique : pas de forces de cisaillement ; Aucun ajout de milieu frais	[19]
 Tubes de plastique ou de verre	Interface air liquide ; Évaluation qualitative de la formation de biofilm	Condition dynamique (agitation) ; Observation de pellicules	Non quantitatif	[21]
"Flow cell"	Étude de la formation de biofilm à l'interface solide liquide sous l'action de forces de cisaillement ; Gros volumes	Condition dynamique ; Observable directement par microscopie	Forces de cisaillement ; Nombre de chambres limité ; Risque de contamination élevé	[45]
"Drip flow cell"	Idem "Flow cell" mais formation de biofilm à l'interface air liquide ; Gros volumes	Condition dynamique ; Écoulement milieu frais ; Conditions proches de celles retrouvées dans les poumons;	Forces de cisaillement ; Nombre de chambres limité ; Risque de contamination élevé	[40]
Microfluidique	Étude de la formation de biofilms à l'interface solide liquide sous l'action de forces de cisaillement	Criblage haut débit ; Micro volumes ; Forces de cisaillement contrôlées ; Observable directement par microscopie	Coût élevé de l'appareil ; Personnel expérimenté requis	[8]
Calgary Biofilm Device	Formation de biofilms sur des "Peg"; Évaluation de la résistance du biofilm aux biocides par mesure de la CMEB (Concentration minimale éradiquant le biofilm)	Criblage haut débit d'agents antimicrobiens; Forces de cisaillement	Non adapté à toutes les espèces bactériennes	[16]

Tableau 2: Inhibiteurs de l'attachement de la bactérie sous forme planctonique à une surface biotique ou abiotique.

Stratégie antibiofilm	Nature du composé	Origine du composé	Mode d'action	Spectre d'activité	Références
Silicone recouverte d'un polymère modifié	Polymère d'acrylate modifié	Biotechnologie	Inhibe l'attachement de la bactérie à la surface abiotique de façon non spécifique	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	[46]
Surface de cathéters modifiée avec un polymère de sulfobétaine	Polymère zwitterionique	Biotechnologie	Antithrombotique et inhibe l'attachement des cellules bactériennes à la surface abiotique de façon non spécifique	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> et <i>Staphylococcus epidermidis</i>	[95]
Aryl rhodamines	Composés organiques	Synthèse chimique	Inhibe l'adhésion primaire de la cellule bactérienne à la surface de façon non spécifique.	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> et <i>E. gallinarum</i>	[75]
Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) et trisodium citrate (TSC)	Agents chélateurs	Synthèse chimique	Fixe les cations métalliques Ca ⁺⁺ et Mg ⁺⁺ qui ont un rôle important dans l'adhésion	Certaines souches de <i>S. aureus</i>	[2]
Eugenol et cinnamaldehyde	Huiles essentielles	Végétale (<i>Syzygium aromaticum</i> et <i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	Inhibe l'adhésion primaire de la cellule bactérienne à la surface de façon non spécifique.	<i>S. aureus</i>	[13]
Argent (Ag)	Ion, métal ou nanoparticule	Naturels et biotechnologies	Entraine une modification de la structure et de la morphologie du microorganisme en interagissant avec des molécules contenant du soufre ou du phosphore (ex: ADN)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>	[20, 97]

Tableau 3: Perturbateurs de l'architecture du biofilm.

Stratégie antibiofilm	Nature du composé	Origine du composé	Mode d'action	Spectre d'activité	Références
Acide cis-2 décénoïque	Acide gras	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inhibe le développement du biofilm et induit sa dispersion	Gram négatif et positif dont <i>S. aureus</i>	[25]
N-acétyl L cystéine	Acide aminé non essentiel	Synthèse chimique	Induit la dégradation du biofilm	<i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i>	[31]
Dispersine B	Glycosyl hydrolase	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Enzyme bactérienne hydrolysant la liaison glycosidique du PNAG de la matrice	<i>S. epidermidis</i>	[52]
Nucléase	DNase	<i>S. aureus</i>	Endonuclease dégradant l'ADN simple et double brin de façon Ca ⁺⁺ dépendant	<i>S. aureus</i>	[55]
Pulmozyme	DNase I	Génie génétique	Hydrolyse l'ADN contenu dans la matrice et prévient la formation de biofilm sur les surfaces abiotiques	<i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i>	[63]
Lysostaphine	Métallo-endopeptidase	<i>Staphylococcus simulans</i>	Clive spécifiquement le pont transversal pentaglycine du peptidoglycane et perturbe l'architecture de la matrice extracellulaire du biofilm	<i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>	[106, 58]
Protéinase K	Enzyme protéolytique	<i>Tritirachium album</i>	Dégradation des protéines de surface et des protéines de la matrice par clivage des liaisons peptides des AA	<i>S. aureus</i>	[18]
Ssp A	Sérine protéase	<i>S. aureus</i>	Clivage de protéines de surface et de protéines sécrétées	<i>S. aureus</i>	[65]
Esp	Sérine protéase	<i>S. epidermidis</i>	Homologue de la protéase V8. Clivage de protéines de surface et de protéines sécrétées	<i>S. aureus</i>	[50]
Aureolysine	Métalloprotéase	<i>S. aureus</i>	Clivage de protéines de surface et de protéines sécrétées	<i>S. aureus</i>	[65]
Las B	Élastase	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibe la formation du biofilm et dispersion	<i>S. aureus</i>	[80]
Lectine de type C	Protéine	Venin de serpent	Inhibe la formation du biofilm	<i>S. aureus</i> et SCN	[57]

Carvacrol et thymol	Huile essentielle	Végétale	Inhibe la croissance du biofilm préformé mais aussi sa formation	<i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>	[71]
Peptide 1018	Peptide	Synthèse chimique	Bloque le ppGpp, une alarmone (une molécule produite suite à un stress), impliqué dans le développement du biofilm	Gram négatif et positif dont <i>S. aureus</i>	[26]
Vaccin	Cellules bactériennes inactivées	<i>S. aureus</i>	Immunsation avec des cellules inactivées d'une souche de <i>S. aureus</i> productrice forte de biofilm	<i>S. aureus</i>	[83]
Vaccin quadrivalent	Protéines de la paroi et de la membrane bactérienne	<i>S. aureus</i>	Immunsation avec des protéines immunogènes; Réduction ostéomyélite en coadministration avec vancomycine	<i>S. aureus</i>	[12]
Phagothérapie + rifampicine	Bactériophage SAP 26	<i>S. aureus</i>	Les phages vont induire la destruction du biofilm libérant des bactéries sous forme planctonique alors sensibles aux ATB.	<i>S. aureus</i>	[88]
Huiles d'agrumes	Huiles essentielles	Végétale	Inhibition de la formation mais entraîne également sa dispersion	<i>S. aureus</i>	[37]
Acide ellagique	Composé polyphénolique	Végétale	Inhibe la formation du biofilm	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	[35]
Chelerythrine, sanguinarine dihydroxybenzofurane et proanthocyanidine	Alcaloïdes et flavonoïdes	Végétale	Inhibe la formation du biofilm	<i>S. aureus</i> et Gram positif	[4]
Acide tannique	Composé polyphénolique	Végétale	Inhibe la croissance du biofilm sans inhiber la croissance bactérienne	<i>S. aureus</i>	[81]
Magnolol	Composé organique	Végétale	Inhibe la formation du biofilm par inhibition de l'autolyse et de la libération d'ADN extracellulaire	<i>S. aureus</i>	[105]
Bromoageliferine	Dérivés alcaloïdes	Marine	Inhibe la formation du biofilm	Gram négatif et positif dont <i>S. aureus</i>	[47]
Oroidin, Ageliferin, Mauritiamine	2-amino-imi/triazole	Synthèse Chimique	Inhibe la formation du biofilm et dispersion Activité synergique avec ATB traditionnels	<i>S. aureus</i> , <i>A. baumannii</i>	[90]

Tableau 4: Perturbateurs de la signalisation inter et intracellulaire.

Stratégie antibiofilm	Nature du composé	Origine du composé	Mode d'action	Spectre d'activité	Références
Hamamelitannin	Polyphenol. Analogue non peptidique de RIP (RNAIII Inhibiting Peptide)	Naturel (<i>Hamamelis virginiana</i>)	Inhibe les signaux intracellulaires par inhibition d'un régulateur du QS, le RNA III	<i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>	[56]
Nanoparticules d'Ag couplées à des extraits de citronnelle	Nanotechnologie	Biotechnologie couplée à des extraits d'origine naturelle <i>Cimbopogan citratus</i>	Augmente l'activité du Quorum quenching contre la formation de biofilm	<i>S. aureus</i>	[66]
Nitrate de sodium (NaNO₃) ou nitrite de sodium (NaNO₂)	Composés chimiques	Synthèse	Réponse adaptative induite par un stress après administration de nitrite (Production de NO)	<i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>	[96]
AIP type I (Auto Inducing Peptide)	Peptide	<i>S. aureus</i>	Inhibe l'expression de RNA III	<i>S. aureus</i>	[67]
AIP type IV			Inhibe l'expression d'agr		
Furanone 7 couplé à du polystyrène ou à un cathéter	Lactone hétérocyclique	Synthèse chimique	Interfère dans la communication entre les bactéries induite par AI-2.	<i>S. epidermidis</i>	[48]
Furanone 2 et 3	Lactone hétérocyclique	Synthèse chimique	Bloque la formation du biofilm via une inhibition de la cascade de signalisation initiée par AIP	<i>S. aureus</i>	[107]
AP 4-5	Haptène	Synthèse chimique	Provoque une réponse immunitaire de type Ac (Acm anti AIP IV) qui inhibe le QS par séquestration de l'AIP de type IV	<i>S. aureus</i>	[79]
c-di-GMP extracellulaire	Messenger secondaire	Synthèse chimique	Inhibe l'adhésion intercellulaire	<i>S. aureus</i>	[53]

PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Le biofilm confère aux bactéries une protection accrue aux antibiotiques et aux désinfectants. Les bactéries ayant la capacité de former des biofilms constituent donc un problème majeur tout aussi bien chez l'homme que chez l'animal. C'est notamment le cas avec la MB qui engendre des pertes évaluées à plus de 665M\$ par an au Canada. Il est de ce fait important de développer de nouvelles stratégies prophylactiques et thérapeutiques contre les agents pathogènes responsables de la MB et ainsi proposer une stratégie alternative à l'utilisation en monothérapie des antibiotiques.

L'hypothèse de ce projet est que certaines souches de SCN faibles productrices de biofilm produisent une ou plusieurs molécule(s) capable(s) d'inhiber de façon significative la formation de biofilm par d'autres staphylocoques et possiblement par d'autres agents pathogènes de la MB.

Le but de ce projet est donc de caractériser des molécules antibiofilm produites par des souches de SCN. Pour cela, nous nous sommes fixés plusieurs objectifs :

- I. Sélectionner les souches de staphylocoques à coagulase négative ayant une forte activité antibiofilm;
- II. Elucider le mode d'action et identifier la ou les molécule(s) responsable(s) de cette activité antibiofilm;
- III. Déterminer le spectre d'activité de cette activité antibiofilm;
- IV. Mesurer l'activité *in vivo* des fractions actives des surnageants de staphylocoques à coagulase négative dans un modèle murin de mammite.

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Article 1

Publié en juin 2017 dans Journal of Dairy Science,

8, 6454-6464.

Coagulase-negative staphylococci species impact biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci

**Coralie Goetz^{*,†}, Yannick D.N. Tremblay^{*,†}, Daphnée Lamarche^{*},
Andréanne Blondeau^{*}, Annie M. Gaudreau^{*}, Josée Labrie^{*}, François Malouin^{§,†} and
Mario Jacques^{*,†,1}**

^{*} Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

[§] Département de biologie

Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

[†] Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network,

St-Hyacinthe, Québec, Canada

¹Corresponding author : Mario Jacques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,

3200 Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2 Tel.: 450-773-8521 (ext. 8348);

Fax : 450-778-8108 ; E-mail : mario.jacques@umontreal.ca

Implication de l'auteur dans l'article

Dans un premier temps, nous avons défini avec les autres co-auteurs de l'article le plan de ce dernier.

Ensuite, en qualité de premier auteur, j'ai établi les différents protocoles nécessaires, réalisé la majorité des expériences et rédigé le manuscrit en respectant les recommandations du journal ciblé.

Enfin, j'ai effectué les corrections demandées par les co-auteurs mais également par les réviseurs du journal.

ABSTRACT

Coagulase negative staphylococci (CNS) are considered to be commensal bacteria of human and animals but are now recognized as the etiological agents of several infections including bovine mastitis. Biofilm formation appears to be an important factor in CNS pathogenicity. Furthermore, CNS colonization of the intramammary environment has been proposed by some researchers to have a protective effect against other pathogens. The mechanisms behind the protective effect of CNS have yet to be characterized. The aim of this study was to evaluate the effect of CNS isolates with a weak biofilm phenotype on the biofilm formation of other staphylococci isolates. A total of 10 CNS with a weak biofilm phenotype and 30 staphylococcal isolates with a strong biofilm phenotype were selected for this study. Biofilm production by individual isolates was measured using a standard polystyrene microtiter plate assay and compared to biofilm produced in mixed cultures. Results were confirmed using confocal microscopy and a microfluidic system with low shear force. Four of the CNS isolates (*Staphylococcus chromogenes* C and E and *Staphylococcus simulans* F and H) with a weak biofilm phenotype significantly reduced biofilm formation of approximately 80% of the staphylococcal species tested including the coagulase-positive *Staphylococcus aureus*. The four *Staph. chromogenes* and *Staph. simulans* isolates were also able to disperse pre-established biofilms, but to a lesser extent. Additionally, the number of colony forming units in the mixed biofilm assays was recorded on differential or selective agar plates. Overall, CNS with a weak biofilm phenotype did not significantly inhibit the growth of isolates with a strong biofilm phenotype. In conclusion, the results suggest that some CNS isolates can negatively impact the ability of other staphylococci isolates and species to form biofilms by a mechanism that does not involve growth inhibition.

Keywords: mastitis, coagulase-negative staphylococci, biofilm, inhibition, dispersion.

INTRODUCTION

Intramammary infections (IMI) trigger an inflammatory response in the udder, which may lead to mastitis in cows. This disease is the most common and detrimental disease in the dairy industry which has a major economic impact on the production and quality of milk. Coagulase-negative staphylococci (CNS) are the bacteria most frequently isolated from the intramammary environment in Canada (Fry et al., 2014) and other countries (Tenhagen et al., 2006; Pyörälä and Taponen, 2009; Sampimon et al., 2009). CNS have traditionally been considered minor pathogens causing IMI but are increasingly recognized as emerging mastitis pathogens (Pyörälä and Taponen, et al., 2009).

Conflicting results regarding the effect of CNS on risk of a quarter acquiring a new IMI with a major pathogen have been reported in the literature. For example, CNS IMI or teat apex colonization have long been considered to have a protective effect (Rainard and Poutrel, 1988; Matthews et al., 1991). However, a meta-analysis revealed that observational studies did not report a protective effect of pre-existing IMI with CNS (Reyher et al., 2012a). Furthermore, the presence of CNS increased the probability of a new *Staph. aureus* IMI (Reyher et al., 2012b) and new IMI in the ipsilateral quarter (Reyher et al., 2013). Overall, it has been proposed that any protective or negative effect of CNS on new IMI is probably species dependent (Reyher et al., 2012a; Vanderhaeghen et al., 2014). The mechanisms behind the positive or detrimental effects of CNS have yet to be characterized.

Some CNS isolated from dairy cows are able to produce bacteriocins, with anti-bacterial activity against other mastitis pathogens, including other CNS species, *Staph. aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* (dos Santos Nascimento et al., 2005; Ceotto et al., 2010; Brito et al., 2011; Braem et al., 2014). These bacteriocins likely play an important role in interspecies competition in ecological niche such as the udder (De

Vuyst and Leroy, 2007).

In addition to bacteriocins, biofilms formed by commensal bacteria at the surface of epithelial cells may prevent colonization by certain pathogens (Kuboniwa et al., 2006, Rickard et al., 2003). Biofilms are considered a universal trait of microorganism that are defined as structured communities of bacterial cells enclosed in a self-produced matrix attached to surfaces (Costerton et al., 1999; Jacques et al., 2010). The thickness and the composition of the biofilm have an important role in its functionality. Specifically, the polymer matrix acts as a barrier and reduces or blocks the diffusion of antibiotics inside the biofilm. Therefore, a thicker biofilm may increase the difficulties of antibiotics to penetrate inside and reach bacterial cells. Furthermore, the electrostatic charges at the surface of the polymeric matrix will bind charged microbial agents and prevent these agents from reaching their effective concentration. The protective barrier of the biofilms might not be limited to antimicrobials. For example, the ability to form biofilms might protect bacteria against the host inflammatory cells found in the mammary gland. Additionally, nutrient and oxygen gradients develop during growth in biofilm resulting in the presence of slow-growing or metabolically inactive bacterial cells that are less affected by antibiotics (Hathroubi et al., 2017). Although *in vitro* studies mainly focus on single species biofilms, multispecies biofilms are considered to be predominant in the context of host colonization and environmental conditions. Furthermore, chronic and biofilm-related infections may be facilitated by the persistence of polymicrobial biofilms (Burmølle et al., 2014; Miquel et al., 2016). Consequently, researchers are now focusing their efforts towards understanding the complexity and interactions in multispecies biofilms (Burmølle et al., 2014). CNS isolates recovered from dairy cows have been reported to form biofilms (Piessens et al., 2012; Simojoki et al., 2012; Tremblay et al., 2013) but this was not associated with an increase in somatic cell count (Simojoki et al., 2012; Tremblay et al., 2013). However,

biofilms might also facilitate the environmental transmission of CNS and their persistence (Tremblay et al., 2013). Specifically, strong biofilm production by CNS isolates was associated with later stages of the lactation cycle (Tremblay et al., 2013). Furthermore, biofilm formation decreases CNS susceptibility towards commonly used antibiotics on dairy farms (Tremblay et al., 2014). In the context of biofilm formation, interactions between CNS and other mastitis pathogens has yet to be investigated. Therefore, the objective of this study was to investigate the effect of CNS with a weak biofilm phenotype on the biofilm formation of staphylococci associated with bovine mastitis.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Growth Conditions

Coagulase-negative staphylococci and *Staph. aureus* isolates were obtained from the Mastitis Pathogen Culture Collection (MPCC) managed by the Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network (St-Hyacinthe, Québec, Canada; Reyher et al., 2011). CNS isolates were first selected from the five main species found on Canadian farms (i.e. *Staph. chromogenes*, *Staph. simulans*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus epidermidis*; Fry et al., 2014) (Tables 1-2). Five *Staph. aureus* isolates that were previously described as strong biofilm producers were also selected from the MPCC to represent the four predominant *spa* types found in Canada and one methicillin resistant *Staph. aureus* (MRSA) (Veh et al., 2015) (Table 2). CNS isolates were assigned to a species by amplifying and sequencing the staphylococcal *rpoB* gene (Fry et al., 2014). This identification was then confirmed using matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight (MALDI-ToF) mass spectrometry analysis (Cameron et al., 2016). *Staph. chromogenes* isolate #2, a characterized bacteriocin producer, was obtained from Prof. Sarne De Vliegher (Ghent University, Belgium). CNS and *Staph. aureus* isolates were cultured on brain heart infusion (BHI) agar and incubated for 16h at 37°C.

Single Species Biofilm Assay

CNS and *Staph. aureus* biofilms were cultured in BHI supplemented with glucose (BHIG; 0.25% w/v) in 96-well microtiter plates (Corning Costar #3595) as described before (Tremblay et al., 2013). Briefly, colonies from BHI agar were suspended in BHIG to a 0.5 McFarland standard and 200 µL was aliquoted in three wells. The plate was then incubated for 24h at 37°C. After the incubation, cells were removed by washing the wells

three times with PBS. The biofilms were air-dried and stained with 0.1% (wt/vol) safranin for 10 min. The stain was then released with 200 μ L of the destaining solution [50% (vol/vol) ethanol, 50% (vol/vol) glacial acetic acid] and quantified by measuring the absorbance at 490 nm (A_{490}). Each bacterial isolate was tested in three wells on three independent days.

Dual Species Biofilm Assay

For the CNS-CNS and CNS-*Staph. aureus* dual species biofilms, the weak-biofilm CNS suspensions and the strong-biofilm CNS or *Staph. aureus* suspensions were prepared as above and 100 μ L from each suspension were added to a microtiter plate for a total volume of 200 μ L in three wells. The plate was incubated for 24h at 37°C and treated as described above. In each experiment, single species biofilms and wells with sterile BHIG acted as controls. Each assay was repeated on three independent days with three technical replicates on each day.

Dispersion of Biofilms by CNS

Single species biofilms were grown as described above. After a 24h incubation, the liquid above the biofilm was removed and 200 μ L of a weak-biofilm CNS suspension in BHIG were added to three wells with pre-established biofilms. For control purposes, bacterial suspensions were also added to wells without biofilms and untreated biofilms were incubated with 200 μ L of BHIG. After another 24h of incubation, the biofilms were stained as described above. Each assay was repeated on three independent days with three technical replicates on each day.

Colony Forming Units on Differential and Selective Media

Dual species biofilms were prepared and after a 24h incubation, the biofilm and planktonic cells from three different wells were recovered by scraping the surface with sterile pipette tips, vigorously shaken, and serially diluted. The dilutions were plated on BBL™ CHROMagar™ *Staph aureus* and on BBL™ Mannitol Salt Agar (BD, Mississauga, ON, Canada) to differentiate CNS species from other CNS and from *Staph. aureus*. Plates were incubated at 37°C for a minimum of 16h and a maximum of 48h. Each assay was repeated on two independent days

Confocal Laser Scanning Microscopy

Single and dual species biofilms were prepared as described above and stained with the SYTO® 9 green fluorescent nucleic acid stain (Invitrogen, Waltham, MA, USA) as recommended by the manufacturer. The stained biofilms were visualized by confocal laser scanning microscopy (CLSM; FV1000 IX81; Olympus, Markham, ON, Canada) and images were acquired using Fluoview software (Olympus).

Biofilm Formation in a Microfluidic System

Dynamic biofilm growth was evaluated using the BioFlux 200 device (Fluxion Biosciences, South San Francisco, CA, USA). The method used to observe growing biofilms was adapted from Moormeier et al. (2013). Briefly, colonies of CNS were suspended in 4 mL of fresh prewarmed (37°C) BHIG to an optical density at 600 nm of approximately 1. The microfluidic channels were dampened with prewarmed BHIG and were inoculated by injecting the bacterial suspension into the output reservoir for 20 s at 0.5 dyne/cm². The microfluidic plate was incubated for 1 h at 37°C to allow bacterial adhesion onto the surface. Fresh prewarmed and diluted BHIG (5%) was added into the input reservoir and the flow of fresh medium was initiated at 0.5 dyne/cm² for 23h. Then,

biofilms were washed by injecting phosphate-buffered saline (PBS) from the input reservoir for 20 min at 0.5 dyne/cm². Each assay was repeated on two independent days. Images of biofilms were obtained using a microscope equipped with a 40× objective (CKX41; Olympus), a digital camera (Retiga EX; QImaging, Surrey, BC, Canada) and the software provided with the BioFlux 200 device.

Statistical Analysis

For the microtiter plate assay, a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett post test (GraphPad Prism Version 5.03 software) was used to compare biofilm production by a bacterial isolate with a strong biofilm phenotype in the absence of treatment to the biofilm production in the presence of CNS isolates with a weak biofilm phenotype. Differences were considered statistically significant with a $P < 0.05$.

RESULTS

Inhibition of Biofilm Formation by Staph. chromogenes and Staph. simulans in Static Conditions

Preliminary results revealed that *Staph. simulans* isolate (I) with a weak biofilm phenotype reduced the biofilm formation of *Staph. chromogenes*, *Staph. xylosus*, *Staph. epidermidis* and *Staph. haemolyticus* having a strong biofilm phenotype (data not shown). Similar observations were made for a *Staph. chromogenes* isolate (A) with a weak biofilm phenotype but not with *Staph. xylosus*, *Staph. haemolyticus* and *Staph. epidermidis* isolates (data not shown).

Since the biofilm inhibition activity was mainly found in *Staph. chromogenes* and *Staph. simulans*, five isolates with a weak biofilm phenotype of each of these two species were evaluated further. After the selection of these isolates, dual species biofilm assays were performed and different profiles of inhibition were observed (Fig. 1; Supplemental Table S1). All five *Staph. chromogenes* isolates with a weak biofilm phenotype inhibited biofilm formation by the five isolates of *Staph. chromogenes*, *Staph. xylosus* and *Staph. haemolyticus* with a strong biofilm phenotype; the effect was smaller for the five *Staph. simulans* isolates with a weak biofilm phenotype (Fig. 1A, 1C and 1D). A reduction in biofilm formation was also observed for some *Staph. epidermidis* and *Staph. aureus* isolates with a strong biofilm phenotype when grown in the presence of a weak biofilm producer (Fig. 1E and 1F). Overall, *Staph. chromogenes* isolates with a weak biofilm phenotype have stronger biofilm inhibition activity against each species tested with the exception of some *Staph. simulans* isolates. These isolates appear to be less sensitive to the biofilm inhibitory activity (Fig. 1B). Furthermore, *Staph. simulans* isolate (#107) with a strong biofilm phenotype is not inhibited by any of the CNS isolates with a weak biofilm phenotype (Fig. 1B).

The biofilm inhibitory activity was confirmed by visualizing with a confocal microscope the biofilm of an isolate with a strong biofilm phenotype (*Staph. chromogenes* #104) grown in the presence of one of the four CNS with the greatest ability to inhibit biofilm formation (*Staph. chromogenes* C). As expected, the single species biofilm of the *Staph. chromogenes* isolate (#104; $A_{490}= 2.515$) appeared as a complex structure and had a thickness of approximately 120 μm (Fig. 2A) while the single species biofilm of the *Staph. chromogenes* isolate (C; $A_{490}= 0.394$) was very thin with a thickness of 10 μm (Fig. 2B). When both isolates were mixed and grown together, the mixed species biofilm ($A_{490}= 0.13$) was very thin with a thickness of approximately 12 μm (Fig. 2C). This confirms that the strong biofilm producer *Staph. chromogenes* #104 is unable to form its thick biofilm layer in the presence of the weak biofilm producer *Staph. chromogenes* C (Fig. 2C).

CFU Counts in Dual Species Biofilms

Next, colony-forming units (CFUs) were counted to exclude that a bactericidal effect was responsible for the observed biofilm inhibition. CNS isolates having a significant impact on biofilm formation (*Staph. chromogenes* C and *Staph. simulans* F) were added in a dual biofilm assays with a *Staph. xylosus* isolate (#113) having a strong biofilm phenotype. In dual species biofilm, the number of *Staph. xylosus* CFUs decreased by 1.0 \log_{10} in the presence of *Staph. chromogenes* C and by 2.02 \log_{10} in the presence of *Staph. simulans* F compared to monospecies biofilm. Similar results were observed with *Staph. haemolyticus*, *Staph. epidermidis* and *Staph. aureus* isolates with a strong biofilm phenotype (data not shown). As a control, *Staph. chromogenes* isolate #2 with the ability to produce a bacteriocin (DeVliegher et al., 2004) was grown with strong biofilm producers and this resulted in the complete inhibition of growth of the strong biofilm producers. The reduction in CFU was equal to 6.32 \log_{10} . Since the CNS with a weak biofilm phenotype

did not markedly inhibit the growth of *Staphylococcus* isolates with a strong biofilm phenotype and the reduction in CFU was not important compared to control, this indicates that the observed biofilm inhibition is not due to an antibacterial activity.

Inhibition of Biofilm Formation by *Staph. chromogenes* and *Staph. simulans* under Dynamic Conditions

Microtiter plates used to evaluate biofilm formation under static conditions are closed systems which often lead to the accumulation of bacterial metabolic products. Furthermore, there is a lack of shear forces in this model and shear forces are present at several infection sites in the host or produced by instruments used for milking. The BioFlux device is a microfluidic system with low shear force that may be used to resemble *in vivo* conditions (Benoit et al., 2010). Therefore, we tested the same isolates combination (*Staph. chromogenes* #104 and *Staph. chromogenes* C) in this dynamic system. The *Staph. chromogenes* isolate with a strong biofilm phenotype (#104) under static conditions also formed a homogeneous and dense biofilm in a flow system (Fig. 3A). The *Staph. chromogenes* C isolate with a weak biofilm phenotype under static conditions formed a non-continuous biofilm characterized by scattered microcolonies in a flow system (Fig. 3B). When both isolates were mixed and grown together, the resulting biofilm resembled the one observed for the single species culture of the isolate with a weak biofilm phenotype (*Staph. chromogenes* C; Fig. 3C). Therefore, the strong biofilm former *Staph. chromogenes* (#104) was unable to form its typical robust biofilm in the presence of the weak biofilm former *Staph. chromogenes* (C). Similar results were observed with other isolates combinations (Fig. 4).

Dispersion of Established Biofilms by *Staph. chromogenes* and *Staph. simulans*

Our previous results revealed that some CNS isolates with a weak biofilm phenotype significantly reduced biofilm formation of several staphylococcal species with a strong biofilm phenotype (Fig. 1, 2, 3 and 4). The next step was to investigate if weak biofilm producers could disperse pre-established biofilms. Specifically, suspensions of the weak biofilm producers were added to pre-established biofilms of strong producers grown and both species interacted for 24h. The impact of the weak biofilm producer on the dispersion of biofilm formed by staphylococcal isolates with a strong biofilm phenotype varied greatly and it was species and isolate dependent (Fig. 5; Supplemental Table S2). We noticed that every *Staph. chromogenes* with a weak biofilm phenotype and some *Staph. simulans* with a weak biofilm phenotype could disperse the biofilm of certain *Staph. simulans*, *Staph. xylosum*, *Staph. epidermidis*, *Staph. haemolyticus* and *Staph. aureus* isolates. The five *Staph. simulans* isolates with a weak biofilm phenotype were unable to disperse the biofilms formed by *Staph. chromogenes* isolates with a strong biofilm phenotype (Fig. 5A).

Some CNS isolates with a weak biofilm phenotype could also disperse the biofilms formed by other staphylococcal isolates.

DISCUSSION

The effect of pre-existing CNS colonization on new infections is a major topic of discussion in the field (Reyher et al., 2012a; Vanderhaeghen et al., 2014) and conflicting results have been reported regarding this effect. The exact nature of the observed effect with CNS are still unknown. Interspecies interaction in bacteria is complex with multiple factors influencing the outcomes such as biofilm formation. For CNS, biofilm formation appears to be an important factor for their persistence in the intramammary environment. Therefore, the objective of our study was to investigate the interactions between CNS species and *Staph. aureus* in the context of biofilm formation. Specifically, the effect of CNS with a weak biofilm phenotype on biofilm formation of other staphylococci.

We observed that *Staph. chromogenes* and *Staph. simulans* isolates with a weak biofilm phenotype have the ability to inhibit biofilm formation by other *Staphylococcus* isolates. This inhibition was observed for isolates from each of the five major CNS species and *Staph. aureus*. Furthermore, we observed that the inhibition occurred both under static and dynamic biofilm conditions. For example, we observed that the strong biofilm producer *Staph. chromogenes* #104 is unable to form its thick and robust biofilm layer in the presence of the weak biofilm producer *Staph. chromogenes* C (Fig. 2C and 3C). The results observed under dynamic conditions (Fig. 3 and 4) confirm the biofilm inhibition properties of some CNS isolates and suggests that the inhibitory activity is not solely dependent on bacterial metabolic products accumulating in a closed system. To the best of our knowledge, this is the first study that shows the *Staph. chromogenes*, *Staph. haemolyticus* and *Staph. xylosus* biofilm formation in a BioFlux system. Importantly, we identified four CNS isolates (*Staph. chromogenes* C and E and *Staph. simulans* F and H) that were able to inhibit biofilm formation by at least 50% in 76-83% of the staphylococcal isolates tested (Figure 1). Overall, the *Staph. chromogenes* isolates appeared to have

stronger biofilm inhibition activity than *Staph. simulans* isolates. Furthermore, *Staph. haemolyticus* and *Staph. xylosus* isolates seem to be more sensitive to this biofilm inhibition effect. The variation in the inhibitory effect among species are in agreement with the latest literature which indicate that the beneficial or harmful effect of CNS IMI on secondary infections appears to be species dependent (Vanderhaeghen et al., 2014). Furthermore, we showed that the biofilm inhibitory effect appears to be dependent on isolate or combination, suggesting that more than one mechanisms might be involved.

When assayed for pre-established biofilms effect, the degree of biofilm dispersion was not as important as the one observed for biofilm inhibition. Indeed, we observed that the four CNS isolates having a significant impact on biofilm formation (*Staph. chromogenes* C and E, and *Staph. simulans* F and H) were able to significantly disperse a minimum of 50% of the biofilm preformed by 23-43% of the staphylococcal isolates tested (Fig. 5). This could be explained by the fact that different factors and mechanisms are involved in staphylococci biofilm formation and dispersion (Otto, 2013). Indeed, inhibition of biofilm formation can be achieved by preventing attachment of the bacteria to the surfaces. For example, DNase I will cleave eDNA in the biofilm matrix of *Staph. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and prevent biofilm formation on abiotic surfaces (Mann and al, 2009). Additionally, quorum sensing (QS) inhibition by hamamelitannin will prevent intracellular signals by repressing RNA III, a QS regulator in *Staph. aureus* and *Staph. epidermidis* (Kiran and al., 2008). Biofilm dispersion can be achieved by using matrix-degrading enzymes such as dispersin B that depolymerizing the poly-N-acetylglucosamine (PNAG), a polysaccharide found in some staphylococcal biofilms (Kaplan and al., 2004).

Some CNS isolated from dairy cows are known to produce bacteriocins that have anti-bacterial activity against other mastitis pathogens, including other CNS species and

Staph. aureus (dos Santos Nascimento et al., 2005; Ceotto et al., 2010; Brito et al., 2011; Braem et al., 2014). When CFUs were determined in our mixed biofilm assays, no significant growth inhibition was observed when isolates were grown with the four CNS isolates with the strongest biofilm inhibition activity. No growth inhibition was observed using deferred antagonism test on BHI agar (data not shown). Therefore, these CNS isolates do not seem to produce bacteriocins under the conditions tested and the inhibition of biofilm formation does not seem to be due to a bactericidal activity.

In conclusion, we have shown that some CNS isolates with a weak biofilm phenotype are able to negatively impact the biofilm forming ability of other staphylococci including *Staph. aureus*, one of the most prevalent pathogens causing IMI in dairy cattle (Barnouin et al., 2007; Olde Riekerink RG et al., 2010; Piepers et al., 2007; Petrovski et al., 2009; Sato et al., 2008). These findings are in contrast with a majority of studies that focus on cooperative interactions and advantages provided by living in a biofilm community (e.g. antibiotic resistance and protection against immune defenses) (Elias and Banin, 2012; Burmølle et al., 2014; Harriott and Noverr, 2009; Peters and al., 2010). Recent studies have, however, highlighted the importance of competitive interactions in biofilm communities (Rendueles and Ghigo, 2012). For example, *Streptococcus pneumoniae* is able to eradicate a preformed *Staph. aureus* biofilm using physical contact between the two bacteria (Khan et al., 2016). Another study observed that spatial competition between *Lactococcus lactis* and *Listeria monocytogenes* in mixed species biofilms resulted in the inhibition of *L. monocytogenes* (Habimana et al., 2011).

The mechanism(s) behind the biofilm inhibition and dispersion effect of CNS has yet to be characterized and its impact on other important mastitis pathogens including *Streptococcus spp*, *Klebsiella spp* and *Escherichia coli* should also be evaluated in a future study to determine the spectrum of this activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported from a grant by the Dairy Research Cluster II (Dairy Farmers of Canada, Agriculture and Agri-Food Canada, Canadian Dairy Commission) through the Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network. CG and AMG are the recipients of a NSERC-CREATE in milk quality scholarship. CG is also the recipient of a FRQNT Op⁺Lait Strategic Cluster scholarship. We thank Sarne De Vliegher (Ghent University, Belgium) for the generous gift of the *Staph. chromogenes* #2 isolate. We also thank Frederic Berthiaume for his help with confocal laser scanning microscopy, and Marguerite Cameron and Greg Keefe (University of Prince Edward Island, Canada) for their help with CNS species confirmation by MALDI-ToF.

REFERENCES

- Barnouin J., S. Bord, S. Bazin, and M. Chassagne. 2005. Dairy management practices associated with incidence rate of clinical mastitis in low somatic cell score herds in France. *J. Dairy Sci.* 88:3700-3709.
- Benoit M.R., C.G Conant, C. Ionescu-Zanetti, M. Schwartz, and A. Matin. 2010. New Device for High-Throughput Viability Screening of Flow Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:4136-4142.
- Braem, G., B. Stijlemans, W. Van Haken, S. De Vliegher, L. De Vuyst, and F. Leroy. 2014. Antibacterial activities of coagulase-negative staphylococci from bovine teat apex skin and their inhibitory effect on mastitis-related pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 116:1084-1093.
- Brito, M. A., G. A. Somkuti, and J. A. Jr. Renye. 2011. Production of antilisterial bacteriocins by staphylococci isolated from bovine milk. *J. Dairy Sci.* 94:194-200.
- Burmølle, M., D. Ren, T. Bjarnsholt, and S. J. Sørensen. 2014. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends Microbiol.* 22:84-91.
- Cameron, M., H.W. Barkema, J. De Buck, S. De Vliegher, M. Chaffer, J. Lewis, G.P. Keefe. 2016. Identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a direct transfer protocol. *J Dairy Sci.* S0022-0302(16)30923-7.
- Ceotto, H., H. Holo, K. F. da Costa, Jdos S. Nascimento, Z. Salehian, I. F. Nes, and Mdo C. Bastos. 2010. Nukacin 3299, a lantibiotic produced by *Staphylococcus simulans* 3299 identical to nukacin ISK-1. *Vet. Microbiol.* 146:124-31.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science.* 284:1318–1322.
- De Vliegher S., G. Opsomer, A. Vanrolleghem, L. A. Devriese, Sol J O. C. Sampimon, H.

- W. Barkema, F. Haesebrouck, and A. de Kruif. 2004. In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. *Vet. Microbiol.* 101:215-21.
- De Vuyst, L., and F. Leroy. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13 :194-9.
- dos Santos Nascimento, J., P.C. Fagundes, M.A. de Paiva Brito, K.R. dos Santos, M. do Carmo de Freire Bastos. 2005. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 106:61-71.
- Elias S., and E. Banin. 2012. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* 36:990–1004.
- Fry, P.R., J.R. Middleton, S. Dufour, J. Perry, D. Scholl, and I. Dohoo. 2014. Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 97 :4876-4885.
- Habimana O., L. Guillier, S. Kulakauskas, and Briandet R. 2011. Spatial competition with *Lactococcus lactis* in mixed-species continuous-flow biofilms inhibits *Listeria monocytogenes* growth. *Biofouling.* 27:1065-72.
- Harriott M.M., and M.C. Noverr. 2009. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: Effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 53:3914-3922.
- Hathroubi S., M.A. Mekni, P. Domenico, D. Nguyen and M. Jacques. 2017. Biofilms: Microbial Shelters Against Antibiotics. *Microb. Drug Resist.* 23:147-156.
- Jacques M., V. Aragon, and Y.D.N. Tremblay. 2010. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim. Health Res. Rev.* 11:97–121.
- Khan F., X. Wu X, G.L. Matzkin, M.A. Khan, F. Sakai, and J.E. Vidal. 2016. *Streptococcus pneumoniae* eradicates preformed *Staphylococcus aureus* biofilms through a mechanism

- requiring physical contact. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:104.
- Kaplan J.B., K. Velliyagounder, C. Rangunath, H. Rohde, D. Mack, J.K. Knobloch, N. Ramasubbu. 2004. Genes involved in the Synthesis and Degradation of Matrix Polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* Biofilms. *J. Bacteriol.* 186:8213-8220.
- Kiran M.D., N.V. Adikesavan, O. Cirioni, A. Giacometti, C. Silvestri, G. Scalise, R. Ghiselli, V. Saba, F. Orlando, M. Shoham, and N. Balaban. 2008. Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening. *Mol. Pharmacol.* 73:1578-1586.
- Kuboniwa M., G.D. Tribble, C.E. James, A.O. Kilic, L. Tao, M.C. Herzberg, S. Shizukuishi, and R.J. Lamont. 2006. *Streptococcus gordonii* utilizes several distinct gene functions to recruit *Porphyromonas gingivalis* into a mixed community. *Mol. Microbiol.* 60:121-39.
- Mann E.E., K.C. Rice, B.R. Boles, J.L. Endres, D. Ranjit, L. Chandramohan, L.H. Tsang, M.S. Smeltzer, A.R. Horswill, and K.W. Bayles. 2009. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One* 4(6):e5822
- Matthews K.R., R.J. Harmon, and B.E. Langlois. 1991. Effect of naturally occurring coagulase-negative staphylococci infections on new infections by mastitis pathogens in the bovine. *J. Dairy Sci.* 74 :1855–1859.
- Miquel S., R. Lagrèfeuille, B. Souweine, and C. Forestier. 2016. Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front. Microbiol.* 7:592.
- Moormeier D.E., J.L. Endres, E.E. Mann, M.R. Sadykov, A.R. Horswill, K.C. Rice, P.D. Fey, and K.W. Bayles. 2013. *Use of microfluidic technology to analyze gene expression during Staphylococcus aureus* biofilm formation reveals distinct physiological

- niches. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:3413-24.
- Olde Riekerink R.G., H.W. Barkema, D.T. Scholl, D.E. Poole, and D.F. Kelton. 2010. Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. *Prev. Vet. Med.* 97:20-8.
- Otto M. 2013. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* 64:175-188.
- Peters B.M., M.A. Jabra-Rizk, M.A. Scheper, J.G. Leid, J.W. Costerton, M.E. Shirtliff. 2010. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* –*Candida albicans* dual-species biofilms. *Fems Immunol. Med. Microbiol.* 59 :493-503.
- Petrovski K.R., C. Heuer, T.J. Parkinson, N.B. Williamson. 2009. The incidence and aetiology of clinical bovine mastitis on 14 farms in Northland, New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 57 :109-115.
- Piepers S., L. De Meulemeester, A. de Kruif, G. Opsomer, H.W. Barkema, and S. De Vliegher. 2007. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J. Dairy Res.* 74:478-83.
- Piessens V., S. de Vliegher, B. Verbist, G. Braem, A. van Nuffel, L. de Vuyst, M. Heyndrickx, and E. van Coillie. 2012. Characterization of coagulase-negative *Staphylococcus* species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. *J. Dairy Sci.* 95:7027-7038.
- Pyörälä S., and S. Taponen. 2009. Coagulase-negative staphylococci - emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.* 134:3-8.
- 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.*

49:327-329.

- Rendueles O., and J.M. Ghigo. 2012. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol.* 36:972-89.
- Reyher K.K., I.R. Dohoo, and C.A. Muckle. 2013. Evaluation of clustering of new intramammary infections in the bovine udder, including the impact of previous infections, herd prevalence, and somatic cell count on their development. *J. Dairy Sci.* 96:219-233.
- Reyher K.K., D. Haine, I.R. Dohoo, C.W. Revie. 2012a. Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens - a systematic review and meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 95:6483-6502.
- Reyher K.K., I.R. Dohoo, D.T. Scholl, G.P. Keefe. 2012b. Evaluation of minor pathogen intramammary infection, susceptibility parameters, and somatic cell counts on the development of new intramammary infections with major mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 95:3766-3780.
- Reyher K. K., S. Dufour, H.W. Barkema, L. Des Coteaux, T.J. Devries, I.R. Dohoo, G.P. Keefe, J.P. Roy, and D.T. Scholl. 2011. The National Cohort of Dairy Farms - A data collection platform for mastitis research in Canada. *J. Dairy Sci.* 94:1616-1626.
- Rickard H., P. Gilbert, N.J. High, P.E. Kolenbrander, P.S. Handley. 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 11 :94-100.
- Sampimon O., H.W. Barkema, I. Berends, J. Sol, and T. Lam. 2009. Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. *J. Dairy Res.* 76:129-136.

- Sato K., P.C. Bartlett, L. Alban, J.F. Agger, and H. Houe. 2008. Managerial and environmental determinants of clinical mastitis in Danish dairy herds. *Acta Vet. Scand.* 50:4.
- Simojoki H., P. Hyvönen, C. Plumed Ferrer, S. Taponen, and S. Pyörälä. 2012. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet. Microbiol.* 158:344-352.
- Tenhagen B.A., G. Koster, J. Wallmann, and W. Heuwieser. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.* 89 :2542-2551.
- Tremblay Y.D.N., D. Lamarche, P. Chever, D. Haine, S. Messier, and M. Jacques. 2013. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J. Dairy Sci.* 96 :234-246.
- Tremblay Y.D.N., V. Caron, A. Blondeau, S. Messier, and M. Jacques. 2014. Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Vet. Microbiol.* 172:511-518.
- Vanderhaeghen W., S. Piepers, F. Leroy, E. Van Coillie, F. Haesebrouck, and S. De Vliegher. 2014. Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. *J Dairy Sci.* 97:5275-5293.
- Veh K.A., R.C. Klein, C. Ster, G. Keefe, P. Lacasse, D. Scholl, J.P. Roy, D. Haine, S. Dufour, B.G. Talbot, A.O Ribon, and F. Malouin. 2015. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. *J. Dairy Sci.* 98 :155-68.

Table 1: Bacterial isolates with a weak biofilm phenotype used in this study.

Bacterial Species and Isolates	Biofilm Phenotype ¹	Biofilm (A_{490nm})
<i>Staphylococcus chromogenes</i>		
A	Weak	0.300 ²
B	Negative	0.083 ²
C	Negative	0.074 ²
D	Weak	0.152 ²
E	Negative	0.089 ²
<i>Staphylococcus simulans</i>		
F	Weak	0.139 ²
G	Moderate	0.652 ²
H	Weak	0.156 ²
I	Weak	0.172 ²
J	Weak	0.183 ²

¹ The ability of a CNS isolate to form a biofilm was classified as negative ($A_{490} < 0.110$), weak ($0.110 < A_{490} < 0.500$) or moderate ($0.500 < A_{490} < 1.500$) (Tremblay et al., 2013)

² From Tremblay et al., 2013

Table 2: Bacterial isolates with a strong biofilm phenotype used in this study.

Bacterial Species and isolates	Symbols	Biofilm Phenotype ¹	Biofilm (A ₄₉₀)
<i>Staphylococcus chromogenes</i>			
101	●	Strong	1.686 ²
102	■	Strong	3.500 ²
103	▲	Strong	3.466 ²
104	◆	Strong	3.334 ²
105	▼	Strong	2.823 ²
<i>Staphylococcus simulans</i>			
106	●	Strong	3.124 ²
107	■	Strong	3.559 ²
108	▲	Strong	2.759 ³
109	◆	Strong	1.906 ²
110	▼	Strong	3.464 ²
<i>Staphylococcus xylosus</i>			
111	●	Strong	2.349 ²
112	■	Strong	2.195 ²
113	▲	Strong	3.500 ²
114	◆	Strong	3.060 ²
115	▼	Strong	3,537 ²
<i>Staphylococcus epidermidis</i>			
116	●	Strong	2,096 ³
117	■	Strong	1,420 ³
118	▲	Strong	2,400 ³
119	◆	Strong	1.916 ³
120	▼	Strong	1,960 ³
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>			
121	●	Strong	3.278 ²
122	■	Strong	2.620 ²
123	▲	Strong	2.683 ²
124	◆	Strong	3.192 ²
125	▼	Strong	1,180 ²
<i>Staphylococcus aureus</i>			
126 (t13401)	●	Strong	2,000 ³
127 (t13401)	■	Strong	1,000 ³
128(t13401)	▲	Strong	1,400 ³
129(t605)	◆	Strong	2.810 ³
130 (MRSA) ⁴	▼	Strong	2,060 ³

¹ The ability of a CNS isolate to form a biofilm was classified as negative ($A_{490} < 0.110$), weak ($0.110 < A_{490} < 0.500$) moderate ($0.500 < A_{490} < 1.500$), or strong ($A_{490} > 1.500$)

(Tremblay et al., 2013)

² From Tremblay et al., 2013

³ This study

⁴ MRSA: methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

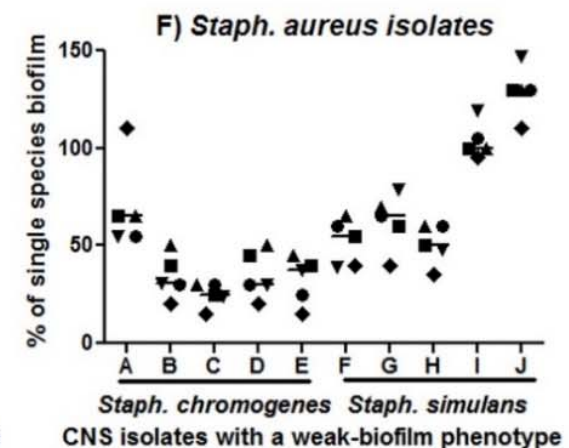
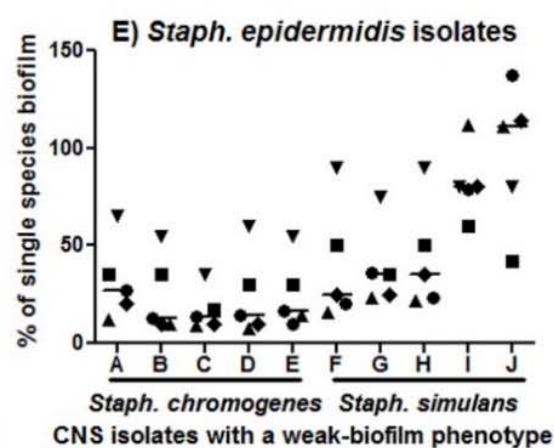
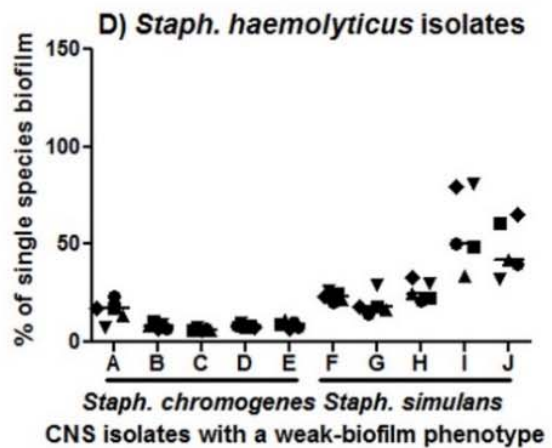
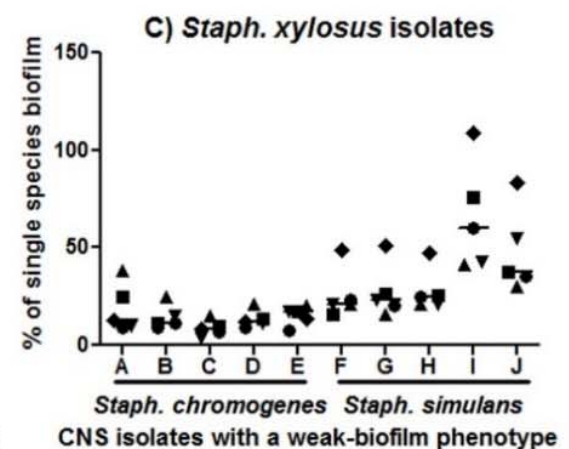
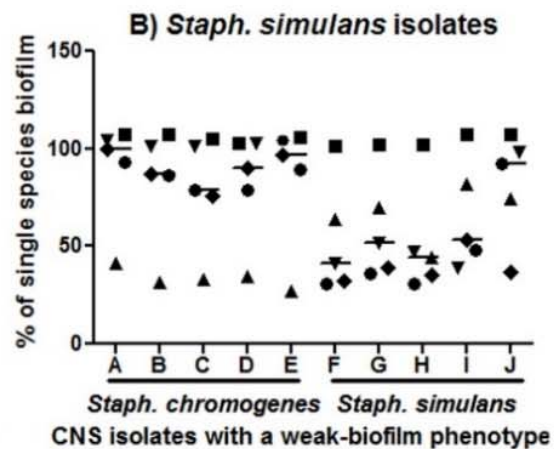
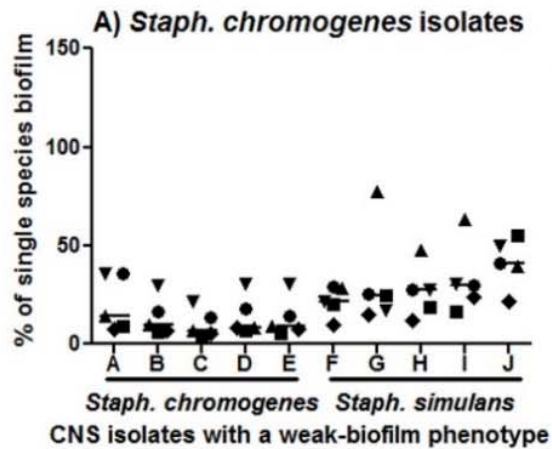


Figure 1: Biofilm inhibition by 10 isolates of *Staph. chromogenes* and *Staph. simulans* with a weak biofilm phenotype (x axis) against five isolates with a strong biofilm phenotype representing six major species: *Staph. chromogenes* (A), *Staph. simulans* (B), *Staph. xylosus* (C), *Staph. haemolyticus* (D), *Staph. epidermidis* (E) and *Staph. aureus* (F). Biofilm formation is expressed as % of the remaining biofilm compared to a single species biofilm. Each dot represents the mean of the triplicates from three independent days for each isolate. The 5 different symbols represent the 5 different isolates with a strong biofilm ability from each species. The bars represent the median values of each group.

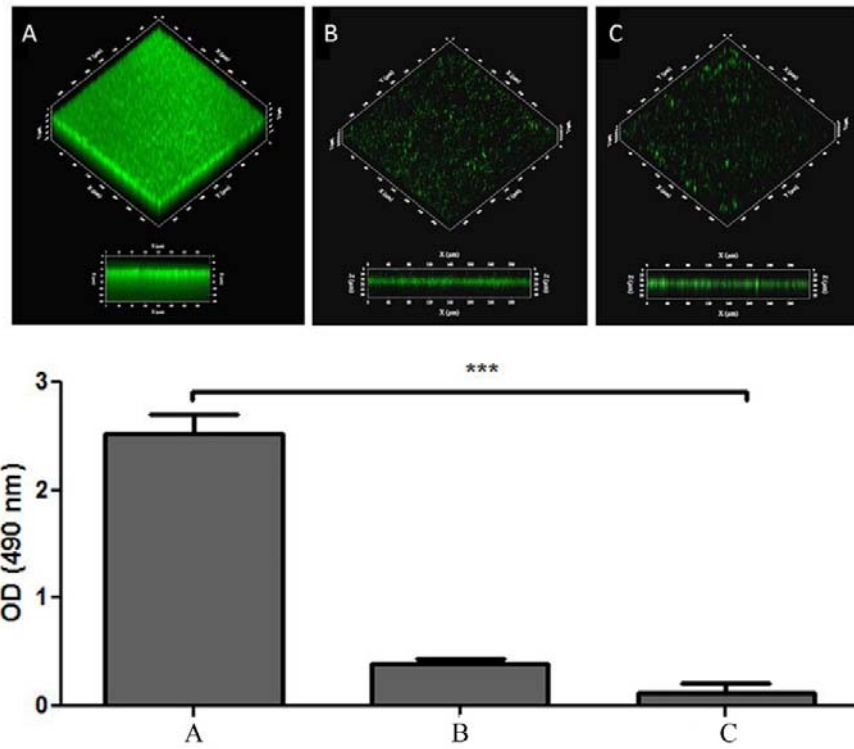


Figure 2: Biofilm formation by an isolate with a strong biofilm phenotype (*Staph. chromogenes* #104) (A) or a weak biofilm phenotype (*Staph. chromogenes* C) (B) grown as single species (A & B) or dual-species biofilms (C) and visualized by confocal laser scanning microscopy. A_{490} measurements of the microtiter-plate biofilms are displayed for reference purposes. One-way ANOVA analysis was used to obtain statistical data. *** $P < 0.001$.

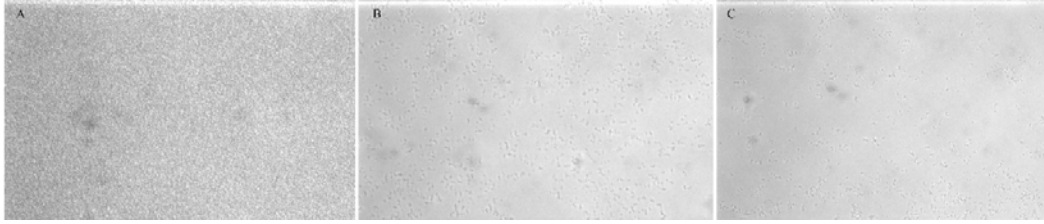


Figure 3: Microscope images of biofilms formed by an isolate with a strong biofilm phenotype (*Staph. chromogenes* #104) (A) or a weak biofilm phenotype (*Staph. chromogenes* C) (B) grown as single-species (A & B) or dual-species biofilms (C). Images were obtained after 24h of growth in a flow chamber of the BioFlux 200 microfluidic system.

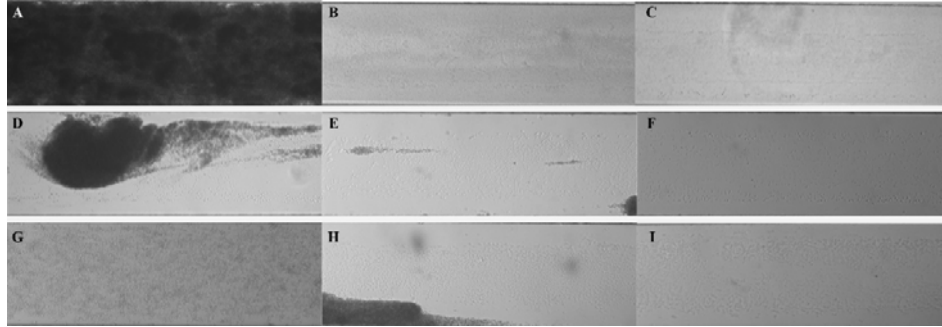


Figure 4: Microscope images of biofilms formed by isolates with a strong biofilm phenotype (*Staph. epidermidis* #120 (A), *Staph. xylosus* #113 (D) & *Staph. haemolyticus* #122 (G)) or a weak biofilm phenotype (*Staph. chromogenes* E (B), *Staph. simulans* F (E) & *Staph. simulans* H (H)) grown as single-species (A, B, D, E, G & H) or dual-species biofilms (C, F & I). Images were obtained after 24h of growth in a flow chamber of the BioFlux 200 microfluidic system.

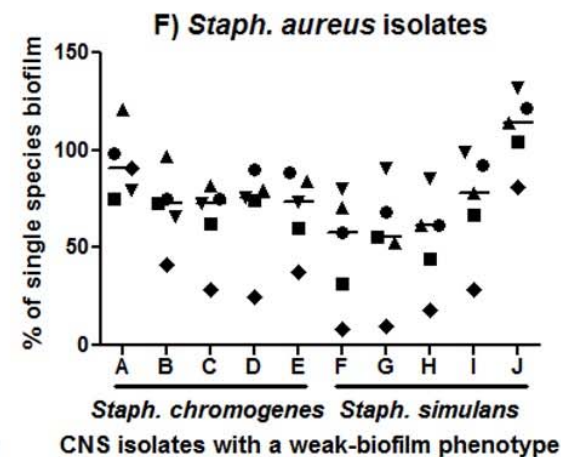
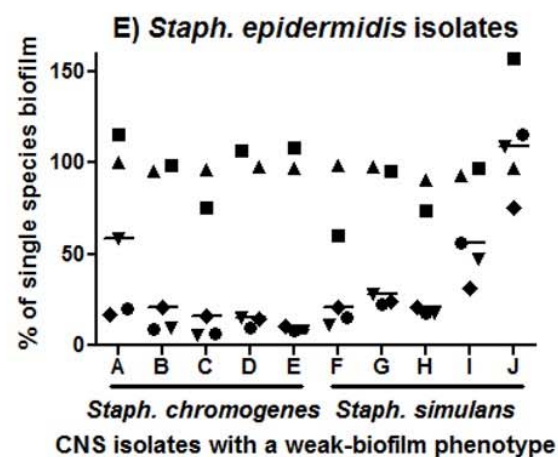
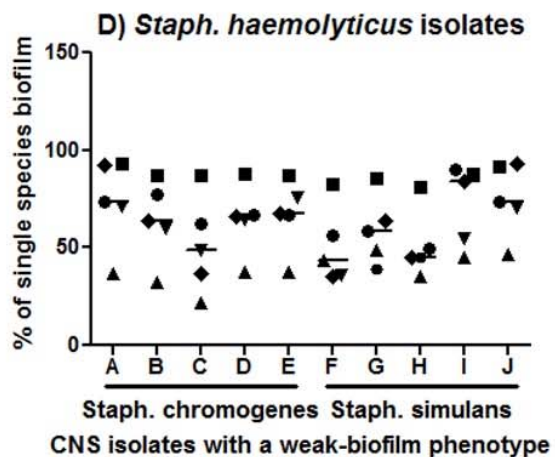
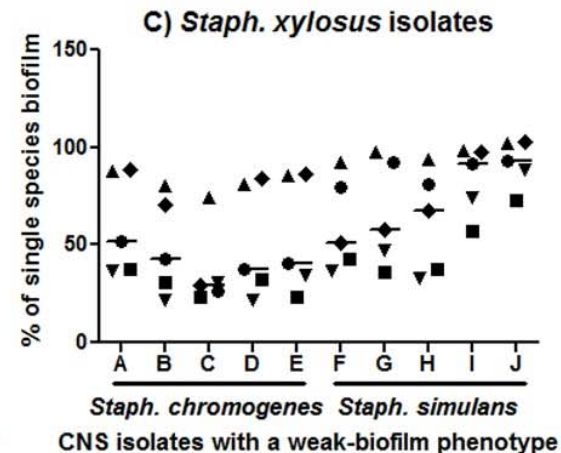
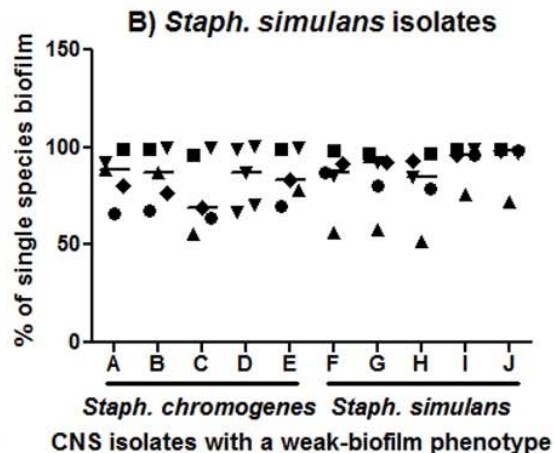
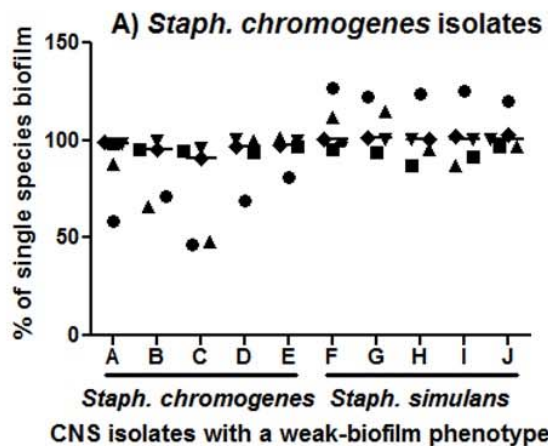


Figure 5: Biofilm dispersion by 10 *Staph. simulans* and *Staph. chromogenes* isolates with a weak biofilm phenotype (x axis) against five isolates with a strong biofilm phenotype representing the six major species: *Staph. chromogenes* (A), *Staph. simulans* (B), *Staph. xylosus* (C), *Staph. haemolyticus* (D), *Staph. epidermidis* (E) and *Staph. aureus* (F). Biofilm formation is expressed as % of the remaining biofilm compared to a single species biofilm. Each dot represents the mean of the triplicates from three independent days for each isolate. The 5 different symbols represent the 5 different isolates from each species. The bars represent the median values of each group.

Biofilm formation	Isolates with a low ability to form a biofilm										
Species/strains	<i>Staph. chromogenes</i>					<i>Staph. simulans</i>					
	4091-4213 (A)	3140-3115 (B)	1180-1665 (C)	3290-3393 (D)	4021-4986 (E)	3140-6932 (F)	4070-6023(G)	3100-0949 (H)	4081-7965 (I)	3110-0229 (J)	
Isolates with a strong ability to form a biofilm	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	4080-0059 (101)	*	**	**	**	**	*	*	*	*
		4070-0281 (102)	***	***	***	***	***	***	***	***	**
		3200-1501 (103)	*	**	**	**	**	*			
		4120-6461 (104)	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		2250-0991 (105)	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	<i>Staph. simulans</i>	3230-0284 (106)						***	***	***	**
		4170-4486 (107)									
		4080-7423 (108)	*	**	**	**	**		*		
		3130-0360 (109)						***	***	***	***
		3230-1199 (110)						***	***	***	**
	<i>Staph. xylosus</i>	4120-6492 (111)	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		4010-1170 (112)	***	***	***	***	***	***	***	***	**
		4180-2182 (113)	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		3130-0193 (114)	***	***	***	***	***	***	***	**	**
		3191-5046 (115)	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	<i>Staph. epidermidis</i>	3210-4837 (116)	***	***	***	***	***	***	***	***	*
		2201-0445 (117)									
		2141-3728 (118)									
		3210-0389 (119)	***	***	***	***	***	***	***	***	
		3210-1836 (120)	***	***	***	***	***	**	***	***	**
	<i>Staph. haemolyticus</i>	4080-1063 (121)	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		3200-1181 (122)	***	***	***	***	***	***	***	***	**
		3260-1329 (123)	***	***	***	***	***	***	***	**	*
		2170-4321 (124)	***	***	***	***	***	***	***	***	**
		3030-8428 (125)	*	*	*	*	*			*	
	<i>Staph. aureus</i>	1061-3160 (126)		*	*		*				
		2061-1859 (127)		*	**						
		1070-5001 (128)									
		1020-0186 (129)		*	*	*	*				
		1081-2464 (130)		**	***	***	***	*		*	

Supplemental Table S1: Biofilm inhibitory activity of the 10 isolates of *Staph. chromogenes* and *Staph. simulans* with a weak biofilm phenotype (top) against five isolates with a strong biofilm phenotype representing the six major species: *Staph. chromogenes* (A), *Staph. simulans* (B), *Staph. xylosus* (C), *Staph. haemolyticus* (D), *Staph. epidermidis* (E) and *Staph. aureus* (F). One-way ANOVA analysis was used to obtain statistical data. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. All experiments were performed on three independent days.

Biofilm dispersion	Isolates with a low ability to form a biofilm										
Species/strains	<i>Staph. chromogenes</i>					<i>Staph. simulans</i>					
	4091-4213 (A)	3140-3115 (B)	1180-1665 (C)	3290-3393 (D)	4021-4986 (E)	3140-6932 (F)	4070-6023(G)	3100-0949 (H)	4081-7965 (I)	3110-0229 (J)	
Isolates with a strong ability to form a biofilm	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	4080-0059 (101)									
		4070-0281 (102)									
		3200-1501 (103)									
		4120-6461 (104)									
		2250-0991 (105)									
	<i>Staph. simulans</i>	3230-0284 (106)									
		4170-4486 (107)									
		4080-7423 (108)									
		3130-0360 (109)							*		
		3230-1199 (110)			*						
	<i>Staph. xylosus</i>	4120-6492 (111)	***	***	***	***	***				
		4010-1170 (112)	*	**	**	**	**	*	*	*	
		4180-2182 (113)	***	***	***	***	***				
		3130-0193 (114)			*			*	*		
		3191-5046 (115)	***	***	***	***	***	***	***	***	
	<i>Staph. epidermidis</i>	3210-4837 (116)	***	***	***	***	***	***	**	***	
		2201-0445 (117)									
		2141-3728 (118)									
		3210-0389 (119)	***	***	***	***	***	***	***	***	**
		3210-1836 (120)		**	**	**	**	**	*	**	
	<i>Staph. haemolyticus</i>	4080-1063 (121)									
		3200-1181 (122)							*		
		3260-1329 (123)	***	***	***	***	**	**	**	***	**
		2170-4321 (124)		*	***			***	*	**	
		3030-8428 (125)		**	***	*		***	***	***	**
	<i>Staph. aureus</i>	1061-3160 (126)									
		2061-1859 (127)					**		*		
		1070-5001 (128)									
		1020-0186 (129)			*	*	**	**	*	*	
		1081-2464 (130)									

Supplemental Table S2: Biofilm dispersion activity by the 10 isolates of *Staph. chromogenes* and *Staph. simulans* with a weak biofilm phenotype (top) against five isolates with a strong biofilm phenotype representing the six major species: *Staph. chromogenes* (A), *Staph. simulans* (B), *Staph. xylosus* (C), *Staph. haemolyticus* (D), *Staph. epidermidis* (E) and *Staph. aureus* (F). One-way ANOVA analysis was used to obtain statistical data. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. All experiments were performed on three independent days.

Article 2

Characterization and nature of antibiofilm molecules produced by coagulase-negative staphylococci

Coralie Goetz^{1, 4}, Ibtissem Doghri^{1, 4}, Sneha Das¹, Audrey Corbeil¹, Pauline Bouveret¹, Francis Beaudry^{2,5}, François Malouin^{3,4} and Mario Jacques^{1,4,*}

¹Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada
J2S 2M2

²Département de biomédecine vétérinaire
Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada
J2S 2M2

³Département de biologie
Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1K 2R1

⁴Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale (Op+Lait) and
Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network,
St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2

⁵Groupe de Recherche en Pharmacologie Animale du Québec,
St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2

¹Corresponding author: Mario Jacques, Faculté de médecine vétérinaire, Université
de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2 Tel.: 450-773-8521
(ext. 8348); Fax : 450-778-8108; E-mail: mario.jacques@umontreal.ca

Implication de l'auteur dans l'article

Dans un premier temps, nous avons défini avec les autres co-auteurs de l'article le plan de ce dernier.

Ensuite, en qualité de premier auteur, j'ai établi les différents protocoles nécessaires, réalisé la majorité des expériences et rédigé le manuscrit en respectant les recommandations du journal ciblé.

L'article n'a pas encore été soumis au « Journal of bacteriology » car une déclaration d'invention a été récemment déposée au BRDV de l'Université de Montréal.

ABSTRACT

Bacterial biofilms are structured communities of bacteria cells enclosed in a self-produced polymeric matrix which can adhere to biotic or abiotic surfaces. This lifestyle allows these bacteria to survive in hostile environments, like protection from the action of antibiotics. Bacteria within biofilms are responsible for numerous infections in humans and animals including bovine mastitis. Therefore, it is important to develop new therapeutic strategies to control and treat biofilm-associated infections. Recent results obtained by our group studying mixed bacterial biofilm communities showed that some coagulase-negative staphylococci (CNS) bovine isolates producing themselves a small amount of biofilm can significantly decrease biofilm formation and increase biofilm dispersion of pathogenic staphylococci associated with bovine mastitis. However, there is a lack of information about the mechanism and effector molecule(s) involved. Therefore, the objective of this study was to investigate and characterize the antibiofilm molecule(s) produced by CNS isolates. In this context, we have prepared supernatants produced by two *Staphylococcus chromogenes* and two *Staphylococcus simulans* isolates to evaluate their effects on biofilm production of pathogenic bacterial species involved in bovine mastitis. By using a standard polystyrene microtiter plate assay, we demonstrated that four studied CNS supernatants not only have an impact on biofilms produced by pathogenic staphylococci but also on other important mastitis pathogens such as *Streptococcus* spp., *Trueperella pyogenes*, *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. The isolation and characterization of the antibiofilm molecule(s) involved was then carried out using a filtration process with membranes of different porosity as well as physicochemical and enzymatic treatments. We were then able to confirm that the activity was present in the < 3 kDa fraction of the CNS culture supernatants and that the activity was heat-resistant, protease-resistant, but sensitive to the RNase A, suggesting that the antibiofilm activity could be due, at least in part, to an RNA

molecule. In conclusion, these results confirm that some CNS have an antibiofilm activity which represents a promising new avenue in the control/treatment of biofilm-associated infections including bovine mastitis.

Key words: biofilms, coagulase-negative staphylococci, antibiofilm activity, biofilm-related infection, bovine mastitis.

INTRODUCTION

Coagulase-negative staphylococci (CNS) have traditionally been considered a commensal of humans and animals but some species and isolates are now recognized as the etiological agents of several infections including health-care related infections in human medicine or mastitis in veterinary medicine (Piette and Verschraegen, 2009; Jacques et al., 2010; Bhattacharya et al., 2015). The ability of those pathogens to persist in the host tissues for a lengthy period is extremely problematic. The escape of the bacteria from the immune system of the host and / or to the therapeutic approaches is explained by several mechanisms including biofilm formation (Barkema et al., 2006; Melchior et al., 2011; Cain, 2013). The biofilm formation is a common bacterial trait in which cells are enclosed in a self-produced matrix and attached to surfaces (Costerton et al., 1999; Jacques et al., 2010). In the coagulase-positive *Staphylococcus aureus*, the formation of biofilm is associated with chronic persistent infections but also with the loss of susceptibility to antibiotic treatments (Bhattacharya et al., 2015). For CNS, the biofilm formation also seems to intervene with the persistence in the mammary gland since biofilm formation was associated with a loss of susceptibility to biocides and antibiotics and that a strong relationship between the strength of a biofilm and days in milk was noted (Tremblay et al., 2013; Tremblay et al., 2014). Several hypotheses explain the loss of susceptibility of bacteria in biofilm to antimicrobial agents (Costerton et al., 1999; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009). First, the matrix polymer acts as a barrier and reduces or prevents the diffusion of antibiotic in biofilm. Thereby, the antibiotic concentration will not be sufficient to neutralize the targeted bacteria. Second, the polymer matrix has electrostatic charges on its surface that will bind certain antimicrobial drugs. Once again, this phenomenon will prevent an effective concentration of antibiotic to be reached within the biofilm matrix. Finally, another explanation concerns the state of bacterial cells inside the

biofilm which, because of low levels of nutrients and oxygen, will be dormant and therefore will not be efficiently affected by antibiotics. Then, those persistent cells will allow the biofilm repopulation weakened by antibiotic treatment and will lead to a chronic infection (Humphreys and Mc Bain, 2014). In addition, bacteria within a biofilm composed of multiple-species (mixed biofilm) show a decrease susceptibility to antibiotics compared to bacteria in biofilm composed of a single-species (Hall-Stoodley and Stoodley, 2009). The resistance or tolerance of bacteria within biofilms is responsible for the failure of some antibiotics, which motivates the development of new therapeutic strategies, in association or not, with the initial antibiotic treatment (Ceri et al., 2010).

Recent results obtained by our group studying biofilms composed of mixed bacterial species showed that some CNS isolates having a weak-biofilm phenotype, notably *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus simulans*, can significantly decrease biofilm formation and increase biofilm dispersion of pathogenic staphylococci associated with bovine mastitis (Goetz et al., 2017). However, the mechanisms behind biofilm formation inhibition and dispersion have yet to be characterized, and their effect on other important Gram-positive and Gram-negative mastitis pathogens, including *Streptococcus* spp., *Trueperella pyogenes*, *Klebsiella* spp., and *Escherichia coli* should also be evaluated to determine the spectrum of this activity.

Therefore, the objective of this study was to investigate and characterize the antibiofilm molecules produced by CNS isolates on the biofilm formation and dispersion of various pathogens isolated in bovine mastitis.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates and growth conditions

Isolates were obtained from the Mastitis Pathogen Culture Collection (MPCC), managed by the Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network (St-Hyacinthe, Québec, Canada; Reyher et al., 2011). Bacterial isolates used in this study are listed in Table 1. Coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Klebsiella* spp. and *Streptococcus* spp. were routinely cultured on brain heart infusion (BHI) agar and incubated for 24h at 37°C. *T. pyogenes* was cultured on BHI agar and incubated for 48h at 37°C with 5% CO₂.

Preparation of CNS supernatants

Weak biofilm producers *S. chromogenes* isolates C and E, and *S. simulans* isolates F and H, were cultured in BHI supplemented with glucose (0.25% w/v; BHIG) in 6-wells microtiter plates (Corning Costar #3516, Corning, N-Y, USA) as previously described (Goetz et al., 2017). Briefly, colonies from BHI agar were suspended in BHIG to a 0.5 McFarland standard and 9 mL were placed in one well. The plate was then incubated without agitation for 24 h at 37°C. After the incubation, the supernatant was collected, centrifuged at 4000 rpm (2800 g) for 20 min at 4°C and filter-sterilized (0.2 µm, Sartstedt Filtropur S, Nümbrecht, Germany) (Farmer et al., 2014) and stored at -80°C until use.

Biofilm Assays

1. Microtiter plate assay

1.1 Quantification by staining techniques

For biofilm formation assays, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *T. pyogenes*, *E. coli* and *Klebsiella* spp. were grown in appropriate culture media (Table 1). To

investigate the antibiofilm activity, 100 μ L of bacterial suspension were loaded with 100 μ L of sterile CNS supernatant in a 96-well microtiter plate for a total volume of 200 μ L. After 24 or 48 h of incubation (Table 1), planktonic cells were removed, and the wells were washed three times with PBS. The biofilms within the wells were air-dried and stained with 0.1% (w/v) safranin for 10 min (Tremblay et al., 2013; Goetz et al., 2017) or with 0.1% (w/v) crystal violet for 10 min (Wu et al., 2013). The stain was then dissolved in 200 μ L of the destaining solution [50% (v/v) ethanol, 50% (v/v) glacial acetic acid] and quantified by measuring the absorbance at 490 nm (A490). In each experiment, single-species biofilms complemented with sterile BHIG instead of the CNS supernatant acted as controls. Each assay was repeated on three independent days with three technical replicates on each day.

For biofilm dispersion assays, single-species biofilms were grown as described in Table 1. After 24 or 48 h incubation, planktonic cells were removed and 200 μ L of a weak-biofilm CNS supernatant were added to the wells (Table 1). For control, biofilms were further incubated with 200 μ L of BHIG with no addition of CNS supernatant. After 24 or 48 h, the biofilms were stained and quantified as described above.

1.2 Confocal laser scanning microscopy

Biofilms with or without CNS supernatant treatment were prepared as described above in 96-well microtiter plates and stained with the SYTO® 9 green fluorescent nucleic acid stain (Invitrogen, Waltham, MA, USA) or with FilmTracer™ FM 1-43® fluorescent marker (Molecular Probes; Eugene, OR, USA) as recommended by the manufacturers. The stained biofilms were visualized by confocal laser scanning microscopy (CLSM; FV1000 IX81; Olympus, Markham, ON, Canada) and images were acquired using Fluoview

software (Olympus). The biovolume of the biofilm was quantified using Image pro software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

2. Microfluidic assay

Dynamic biofilm growth was evaluated using the BioFlux 200 device (Fluxion Biosciences, South San Francisco, CA, USA) as described previously (Goetz et al., 2017). Briefly bacteria were suspended in 4 mL of prewarmed (37°C) BHIG to an optical density at 600 nm of approximately 1. The microfluidic channels were dampened with prewarmed BHIG and were inoculated by injecting the bacterial suspension into the output reservoir for 20 s at 0.5 dyne/cm². The microfluidic plate was incubated for 1 h at 37°C to allow bacterial adhesion onto the surface. Fresh prewarmed BHIG medium or CNS supernatant were added into the input reservoir and the flow of those media was initiated at 0.5 dyne/cm² for 23 h. Then, biofilms were washed by injecting phosphate-buffered saline (PBS) from the input reservoir for 20 min at 0.5 dyne/cm². Images of biofilms were obtained using a microscope equipped with a 40× objective (CKX41; Olympus), a digital camera (Retiga EX; QImaging, Surrey, BC, Canada) and the software provided with the BioFlux 200 device.

Physicochemical analysis and characterization of CNS active compounds

Different treatments of CNS supernatants were performed to determine the nature of the antibiofilm activity. CNS supernatants were first fractionated using Microcon centrifugal concentrators (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) with 3- and 10-kDa molecular weight cut-off filters. To evaluate the heat sensitivity of the active compounds, fractionated CNS supernatants (< 3kDa) were treated for 15 min at 100°C (Farmer et al., 2014). To evaluate the chemical polarity of the active compounds, the fractionated CNS

supernatants (< 3kDa) were separated using a ZEOprep 60 C₁₈ reversed phase column (Zeochem, Rütli, Switzerland). To characterize the nature of the active compounds, the fractionated supernatants (< 3kDa) were treated using various enzymes or NaOH. They were incubated 4 h at 37°C with proteinase K (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) (1mg/mL) (Giambiagi deMarval et al., 1990); 12 h at 37°C with RNase A (Sigma) (25µg/mL) or DNaseI (Sigma) (100µg/mL) (Doghri et al., 2015); 48 h at 37°C with lipase (Sigma) (2mg/mL) (Doghri et al., 2015); 30 min at 30°C with dispersin B (Kane Biotech, Winnipeg, MB, Canada) (50µg/mL) (Kaplan et al., 2014) ; 30 min at 37°C with α -amylase (Sigma) (1mg/mL) (Kalpana et al., 2012) or 1 h at 37°C with lysostaphin (Sigma) (0.1mg/mL) (Shah et al., 2004). After the incubation, enzymes were eliminated using a 3-, 10- or 50-kDa molecular weight cut-off filters (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). NaOH was also used to alkalinize (to a pH of approximately 11) the CNS fractions for 1 h at room temperature (Paharik et al., 2017).

All treated samples with associated controls were then assayed for antibiofilm activity by using the biofilm formation assays as described above. Each assay was repeated on three independent days with three technical replicates on each day.

Statistical analysis

For the microtiter plate assays, a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett post-hoc test (GraphPad Prism Version 5.03 software) was used to compare biofilm production by a bacterial isolate with a strong biofilm phenotype in the absence of treatment to the biofilm production in the presence of CNS supernatant. Differences were considered statistically significant with a $p < 0.05$.

RESULTS

Antibiofilm activity is found in *S. chromogenes* and *S. simulans* culture supernatants

Our previous study, using mixed biofilms, showed that four CNS isolates with a weak-biofilm phenotype (*S. chromogenes* C and E and *S. simulans* F and H) can inhibit biofilm formation of staphylococci associated with bovine mastitis (Goetz et al., 2017). Therefore, we decided to investigate the ability of culture supernatants produced by those CNS isolates that impact biofilm formation of staphylococci isolates with a strong biofilm phenotype. The biofilm assays revealed different profiles of activity depending of the CNS species and isolates but also depending of the CNS supernatant (Figure 1, Table S1). The biofilm formation of all *S. chromogenes*, *S. xylosum*, *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* isolates producing a strong biofilm were significantly reduced ($p < 0.05$) by the four supernatants (Fig. 1a, 1c, 1d and 1e, Table S1). A significant reduction ($p < 0.05$) in biofilm formation was also observed for some *S. aureus* isolates with a strong biofilm phenotype when grown in the presence of CNS supernatants (Fig. 1f, Supplemental table S1). We observed a stronger effect of the *S. simulans* supernatants in regard to the inhibition of *S. chromogenes* biofilm formation (Fig. 1a). Except for one the isolates (#108, Table S1), *S. simulans* biofilm formation was not affected by the tested supernatants (Fig. 1b). The antibiofilm activity previously observed in mixed biofilms (Goetz et al., 2017) is therefore present in cell-free CNS culture supernatants. Next, these results were confirmed under dynamic conditions using a microfluidic system. For example, the strong biofilm producer *S. simulans* #108 was unable to form its typical robust biofilm in the presence of the supernatants C or F from *S. chromogenes* or *S. simulans* respectively, after a 24 h incubation (Figure 2).

Dispersion of established biofilms by *S. chromogenes* and *S. simulans* supernatants

Our results revealed that the four CNS supernatants have the ability to decrease staphylococcal biofilm formation. Thus, the ability of those supernatants to disperse pre-established staphylococcal biofilms was also investigated. Overall, we observed a weaker effect of CNS supernatants on biofilm dispersion compared to that seen on biofilm formation (Figure 3 and Table S2). Noteworthy however, the integrity of the *S. epidermidis* isolates preformed biofilms were the most susceptible to CNS supernatants, particularly to *S. chromogenes* supernatants (Fig. 3d). Besides, CNS supernatants have also the ability to disperse some *S. haemolyticus*, *S. xylosus* and *S. aureus* pre-established biofilms (Fig. 3c, 3e and 3f), while *S. simulans* and *S. chromogenes* pre-established biofilms were generally not impacted by CNS supernatants (Fig. 3a and 3b). These dispersion results are in agreement with our previous observations done with mixed biofilms (Goetz et al., 2017).

Spectrum of activity of the S. chromogenes and S. simulans supernatants

Since we observed that the four CNS supernatants have the ability to inhibit biofilm formation of different staphylococcal species, we decided to investigate their effect on other important Gram-positive and Gram-negative mastitis pathogens, such as *Streptococcus* spp., *T. pyogenes*, *Klebsiella* spp., and *E. coli*. The spectrum of activity of the four CNS supernatants on biofilm formation and dispersion was also analyzed using microtiter biofilm assays (Tables 2 and 3, respectively). In general, we observed that the four supernatants significantly inhibited ($p < 0.05$) the biofilm formation of most of the Gram-positive isolates (from 12/15 to 13/15, depending of the supernatant) (Table 2). Those observations were confirmed by visualizing with a confocal microscope the biofilm formation of one isolate of each genus (*S. chromogenes* #104; *S. uberis* #131; *T. pyogenes* #143; *E. coli* #149; *K. oxytoca* #156) grown in the presence of one of the four CNS supernatants (Figure 4). In addition, the CNS supernatants have the ability to significantly

disperse ($p < 0.05$) Gram-positive preformed biofilms (from 10/15 to 14/15) and also Gram-negative biofilms (from 6/15 to 13/15) (Table 3). Overall, CNS antibiofilm activity is not restricted to other staphylococci and *S. simulans* supernatants showed a broader spectrum of activity compared to *S. chromogenes* supernatants (Tables 2 and 3).

Physicochemical properties and characterization of CNS active compounds

In order to define the nature and the characteristics of molecules involved, we first fractionated the four supernatants using 10- and 3-kDa molecular weight cut-off filters (Figure 5). The different fractions were used against one representative isolate of each staphylococci species. Results showed that the antibiofilm activity was mostly conserved in both the $< 10\text{kDa}$ and $< 3\text{kDa}$ fractions (Fig. 5a-d and 5f). The *S. haemolyticus* biofilm formation was not affected by the $< 10\text{kDa}$ and $< 3\text{kDa}$ fractions (Fig. 5e). We then performed different treatments on the $< 3\text{kDa}$ fractions which are the most purified and still active fractions (Tables 4 and 5) and evaluated their activities on the five susceptible staphylococci isolates (*S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. epidermidis*, and *S. aureus*). The CNS supernatant active compounds appear to be heat-resistant and hydrophilic (Table 4). We also demonstrated that the activity of the supernatants was not significantly impacted by proteinase K, DNase I, lipase, lysostaphin, α -amylase or NaOH (Table 5). However, the antibiofilm activity was partly or fully lost after the RNase A treatment. In addition, the active fractions have become less effective against the *S. aureus* strain after the dispersin B (Table 5).

DISCUSSION

Bacteria within biofilms constitute a serious risk to human and animal health (Hall-Stoodley et al., 2004; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Jacques et al., 2010; Percival et al., 2015). This is especially true with the staphylococci which are involved in numerous biofilm-associated infections including medical device-related infections in human medicine and bovine mastitis in veterinary medicine (Jacques et al., 2010; Hogan et al., 2015). Therefore, several studies focused on the development of new strategies against biofilm-growing bacteria (Rumbaugh and Ahmad, 2014; Chung and Toh, 2014). For example, a good knowledge of the components and the various stages of the staphylococci biofilm formation allowed the development of alternative strategies (Chung and Toh, 2014): (1) inhibition of the adhesion of the bacteria in planktonic form to a surface in order to prevent the biofilm formation; (2) disruption of the biofilm architecture during the maturation phase; (3) inhibition of intra- and intercellular signals. However, these molecules were mostly developed for applications in human medicine and, unfortunately, very little data exist on their use in veterinary medicine (Isaac et al., 2017; Goetz et al., 2016).

Recent results obtained by our group using mixed bacterial biofilms showed that four CNS bovine isolates with a weak-biofilm phenotype can significantly decrease biofilm formation and stimulate biofilm dispersion of staphylococci associated with bovine mastitis (Goetz et al., 2017). Therefore, the objective of this study was to investigate and characterize the antibiofilm molecules produced by these four CNS isolates.

We first determined that the culture supernatants of the four CNS isolates (*S. chromogenes* C and E and *S. simulans* F and H) also have the ability to impact significantly on staphylococcal biofilm formation including a MRSA isolate (Fig. 1, 2 and 3) in agreement with our previous study using mixed bacterial biofilms (Goetz et al., 2017). We

observed an inhibitory effect on biofilm formation but much less effect was noted for the dispersion of preformed biofilms (Fig. 1 and 3). Besides, no effect on bacterial adhesion to biotic or abiotic surfaces was observed (data not shown) and the inhibition of biofilm formation does not seem to be due to the inhibition of bacterial growth as shown in our previous study (Goetz et al., 2017). This type of antibiofilm property can be viewed as an advantageous characteristic since a bactericidal activity could act as a selection pressure to promote bacterial adaptation and the emergence of antibiotics resistance (Papa et al., 2013). Yet, only a limited number of studies highlight strategies targeting exclusively biofilm formation (Chung and Toh, 2014; Goetz et al., 2016).

Our results also showed that all four supernatants have a broad spectrum of activity and is not restricted to other staphylococci (Table 2 and 3). Indeed, we observed an inhibitory effect on the formation of biofilms produced by other Gram-positive bacteria (*S. uberis*, *S. dysgalactiae* and *T. pyogenes*) but also an effect on the dispersion of preformed-biofilm produced by both Gram-positive and Gram-negative bacteria (*K. oxytoca*, *K. pneumoniae* and *E. coli*) isolated from bovine mastitis. This is seen rather as an advantage, since the therapeutic alternatives proposed to prevent or treat the bovine mastitis such as bacteriocins or bacteriophages often have a narrow spectrum of activity (Tagg et al., 1976, Ravat et al., 2015). The supernatants produced by the *S. simulans* isolates showed an even broader spectrum than the supernatants produced by the *S. chromogenes* isolates suggesting that most likely more than one molecules might be involved.

In the present study, we also wanted to have more information about the CNS secreted products found in the culture supernatants responsible for the antibiofilm activity. The characterization of the four supernatants indicated that the antibiofilm activity was present in the < 3kDa fraction (Fig. 5). Furthermore, the active molecule appears to be hydrophilic, heat-resistant and sensitive to the RNase A (Table 4 and 5). Recent results

showed that the antibiofilm activity was lost in 12 of the 22 (54.5%) inhibited CNS isolates after the RNase A treatment. The enzymatic treatments also showed that the antibiofilm activity was not impacted by the proteinase K treatment. These results associated with the non-bactericidal activity demonstrate that these CNS isolates do not seem to produce bacteriocins with bactericidal effect under the conditions tested in this study. Indeed, some CNS isolated from dairy cows are known to produce bacteriocins which have an anti-bacterial activity against other mastitis pathogens (dos Santos Nascimento et al., 2005; Ceotto et al., 2010; Brito et al., 2011; Braem et al., 2014). Our results also differ from the study of Isaac et al. (2017) describing the ability of exoproducts from a commensal *S. chromogenes* to impact on the biofilm formation of staphylococci associated with bovine mastitis. Their results describe active protein related compounds with a molecular weight above 5 kDa (Isaac et al. 2017). On the other hand, we also showed that the alkalization of the active fraction does not impact on the antibiofilm activity suggesting that a quorum-sensing like autoinducing peptide (AIP) is not involved (Paharik et al., 2017). Indeed, such an AIP peptide which could modulate *agr* quorum sensing activities with an impact on biofilm formation and dispersal in *S. aureus* is labile in the presence of high pH and should be destroyed after the NaOH treatment. By contrast, we observed that the supernatants were not active against *S. aureus* after the dispersin B treatment. This difference could be explained by the fact that the composition of the extracellular matrix is different between CNS and *S. aureus*. Indeed, the Poly-beta (1,6)-N-acetyl-d-glucosamine (PNAG) targeted by the dispersin B, is not a major component of the biofilm matrix of CNS, in contrast to *S. aureus* (Tremblay et al., 2013; Arciola et al., 2015).

In conclusion, this study reported the antibiofilm activity of supernatants produced by CNS against several major pathogens of bovine mastitis. This activity seems to be, at least in part, due to an extracellular RNA molecule, which represents, to the best of our

knowledge, a molecule that has never been described as having an antibiofilm activity in the literature for the staphylococci. Few studies have been highlighted the endogenous effect of small RNAs on the biofilm formation (Chambers and Sauer, 2013; Svenningsen, 2018). For example, an overexpression by *E. coli* of the small RNA, RprA, will decrease the *csgD* synthesis and thus, the biofilm formation (Mika et al., 2012). However, there are very little studies which focus on extracellular small RNAs and their inter-species effects. And yet, a recent work demonstrated the ability of an OMV-associated small RNA produced by *P. aeruginosa* to impact on biological properties of host cells (Koeppen et al., 2016). The next step will be to extract the RNAs included in the supernatants and to perform RNA sequencing but also to identify the mechanism of action involved. Owing to the innovative nature of this compound, its impact on staphylococci isolated in human medicine should also be evaluated in future studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported in main part by Agriculture and Agri-Food Canada, and by additional contributions from Dairy Farmers of Canada, the Canadian Dairy Network and the Canadian Dairy Commission under the Agri-Science Clusters Initiative. As per the research agreement, aside from providing financial support, the funders have no role in the design and conduct of the studies, data collection and analysis or interpretation of the data. Researchers maintain independence in conducting their studies, own their data, and report the outcomes regardless of the results. The decision to publish the findings rests solely with the researchers. CG is the recipient of studentships from the NSERC-CREATE program in milk quality and from the FRQNT Op+Lait Strategic Cluster. We thank Jonathan Massé for the isolates of *Klebsiella sp.*, and Annie M. Gaudreau and Léa Rivière for their technical contribution. We also thank Frederic Berthiaume for his help with confocal laser scanning microscopy.

REFERENCES

Arciola C.R., Campoccia D., Ravaoli S., Montanaro L.: Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015, **5**:7.

Bhattacharya M., Wozniak D.J., Stoodley P., Hall-Stoodley L.: Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2015, **13**, 1499-1516.

Barkema H.W., Schukken Y.H., Zadoks R.N.: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci*, 2006, **89**, 1877-1895.

Braem G., Stijlemans B., Van Haken W., De Vliegher S., De Vuyst L., Leroy F.: Antibacterial activities of coagulase-negative staphylococci from bovine teat apex skin and their inhibitory effect on mastitis-related pathogens. *J Appl Microbiol*, 2014, **116**, 1084-1093.

Brito M. A., Somkuti G. A., Renye Jr. J. A.: Production of antilisterial bacteriocins by staphylococci isolated from bovine milk. *J Dairy Sci*, 2011, **94**, 194-200.

Cain C.L.: Antimicrobial resistance in staphylococci in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2013, **43**, 19-40.

Ceotto H., Holo H., da Costa K.F., Nascimento Jdos S., Salehian Z., Nes I.F., Bastos Mdo C.: Nukacin 3299, a lantibiotic produced by *Staphylococcus simulans* 3299 identical to nukacin ISK-1. *Vet Microbiol*, 2010, **146**, 124-31.

Ceri H., Olson M.E., Turner R.J.: Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opin Pharmacother*, 2010, **11**, 1233-1237.

Chambers J.R., Sauer K.: Small RNAs and their role in biofilm formation. *Trends Microbiol*, 2013, **21**, 39-49.

Chung P.Y., Toh Y.S.: Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathog Dis*, 2014, **70**, 231-239.

Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P.: Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 1999, **284**, 1318–1322.

Doghri I.: Interactions moléculaires entre microorganismes au sein de biofilms en milieu marin. Mise en évidence de biomolécules antibiofilm. Thèse, Université de La Rochelle, 2015.

dos Santos Nascimento J., Fagundes P.C., de Paiva Brito M.A., dos Santos K.R., do Carmo de Freire Bastos M.: Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 2005, **106**, 61-71.

Farmer J.T., Shimkevitch A.V., Reilly P.S., Mlynek K.D., Jensen K.S., Callahan M.T., Bushaw-Newton K.L., Kaplan J.B.: Environmental bacteria produce abundant and diverse antibiofilm compounds. *J Appl Microbiol*, 2014, **117**, 1663-1673.

Goetz C., Dufour S., Archambault M., Malouin F., Jacques M.: Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière: une revue bibliographique. *Revue Méd Vét*, 2016, **167**, 215-229.

Goetz C., Tremblay Y.D.N., Lamarche D., Blondeau A., Gaudreau A.M., Labrie J., Malouin F., Jacques M.: Coagulase-negative staphylococci species affect biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. *J Dairy Sci*, 2017, **100**, 6454-6464.

Giambiagi de Marval M., Mafra M.A., Penido E.G.C., Bastos M.C.F., Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol*, 1990, **136**, 1591–1599.

Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P.: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2004, **2**, 95-108.

Hall-Stoodley L., Stoodley P.: Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*, 2009, **11**, 1034-1043.

Hogan S., Stevens N.T., Humphreys H., O'Gara J.P., O'Neill E.: Current and future approaches to the prevention and treatment of staphylococcal medical device-related infections. *Curr Pharm Des*, 2015, **21**, 100-113.

Humphreys G.J., Mc Bain A.J.: An introduction to the biology of biofilm recalcitrance. *In* Percival S.L. (ed), Williams D. (ed), Randle J. (ed): *Biofilms in infection prevention and control*, Elsevier Academic Press, San Diego, 2014, 245-256.

Isaac P., Bohl L.P., Bresler M.L., Orellano M.S., Conesa A., Ferrero M.A., Porporatto C.: Commensal coagulase-negative *Staphylococcus* from the udder of healthy cows inhibits biofilm formation of mastitis-related pathogens. *Vet Microbiol*, 2017, **207**, 259-266.

Jacques M., Aragon V., Tremblay Y.D.N.: Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim Health Res Rev*, 2010, **11**, 97–121.

Kalpana B.J., Aarthi S., Pandian S.K.: Antibiofilm activity of α -amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, **167**, 1778-1794.

Kaplan J.B., Rangunath C., Velliyagounder K., Fine D.H., Ramasubbu N.: Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, **48**, 2633-2336.

Koeppen K., Hampton T.H., Jarek M., Scharfe M., Gerber S.A., Mielcarz D.W., Demers E.G., Dolben E.L., Hammond J.H., Hogan D.A., Stanton B.A.: A novel mechanism of host-pathogen interaction through sRNA in bacterial outer membrane vesicles. *PLoS Pathog*, 2016, **12**, e1005672.

Melchior M.B.: Bovine mastitis and biofilms. *In* Percival SL (ed), Knottenbelt D.C.

(ed), Cochrane C.A. (ed): Biofilms and veterinary medicine, Springer, Heidelberg, 2011, 205-222.

Mika F., Busse S., Possling A., Berkholz J., Tschowri N., Sommerfeldt N., Pruteanu M., Hengge R.: Targeting of *csgD* by the small regulatory RNA RprA links stationary phase, biofilm formation and cell envelope stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2012, **84**, 51-65.

Paharik A.E., Parlet C.P., Chung N., Todd D.A., Rodriguez E.I., Van Dyke M.J., Cech N.B., Horswill A.R.: Coagulase-negative staphylococcal strain prevents *Staphylococcus aureus* colonization and skin infection by blocking quorum sensing. *Cell Host Microbe*, 2017, **22**, 746-756.

Papa R., Artini M., Cellini A., Tilotta M., Galano E., Pucci P., Amoresano A., Selan L.: A new anti-infective strategy to reduce the spreading of antibiotic resistance by the action on adhesion-mediated virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog*, 2013, **63**, 44-53.

Percival S.L., Suleman L., Vuotto C., Donelli G.: Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol*, 2015, **64**, 323-34.

Piette A., Verschraegen G.: Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol*, 2009, **134**, 45-54.

Ravat F., Jault P., Gabard J.: Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Ann Burns Fire Disasters*, 2015, **28**, 13-20.

Rumbaugh K.P., Ahmad I.: Antibiofilm agents. From diagnosis to treatment and prevention, 497 pages, Springer, Heidelberg, 2014.

Shah A., Mond J., Walsh S.: Lysostaphin-coated catheters eradicate *Staphylococcus aureus* challenge and block surface colonization. *Antimicrob Agents*

Chemother, 2004, **48**, 2704-2707.

Svenningsen S.L.: Small RNA-Based Regulation of Bacterial Quorum Sensing and Biofilm Formation. *Microbiol Spectr*, 2018, **6**.

Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W.: Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev*, 1976, **40**, 722-756.

Tremblay Y.D.N., Lamarche D., Chever P., Haine D., Messier S., Jacques M.: Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J Dairy Sci*, 2013, **96**, 234-246.

Tremblay Y.D.N., Caron V., Blondeau A., Messier S., and Jacques M.: Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Vet Microbiol*, 2014, **172**, 511-518.

Wu, C., Labrie, J., Tremblay, Y.D.N., Haine, D., Mourez, M. and Jacques, M.: Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol*, 2013, **115**, 30-40.

Table 1: Biofilm formation conditions of the mastitis pathogens used in this study.

Bacterial Isolates	Growth Conditions	Corning Plate ID	Incubation conditions	Incubation time (h)	Staining	References
<i>Staphylococcus chromogenes</i> (n=7; #101-#105 and C and E)	Colonies from BHI agar were suspended in BHIG; 0.25% w/v to a 0.5 McFarland standard	3595	37°C	24	0.1% (w/v) safranin for 10 min	Tremblay et al., 2013 Goetz et al., 2017
<i>Staphylococcus simulans</i> (n=7; #106-#110 and F and H)						
<i>Staphylococcus xylosus</i> (n=5; #111-#115)						
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=5; #116-#120)						
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=5; #121-#125)						
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=5; #126-#130)						
<i>Streptococcus uberis</i> (n=5; #131-#135)	Colonies from BHI agar were suspended in BHIG; 0.25% w/v to a 0.5 McFarland standard	3595	37°C	24	0.1% (w/v) safranin for 10 min	This study
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (n=5; #136-#140)						

<i>Trueperella pyogenes</i> (n=5; #141-#145)	Colonies from BHI agar were suspended in BHIG 0.25% w/v to a 0.5 McFarland standard	3595	37°C, 5%CO ₂	48	0.1% (w/v) crystal violet for 10 min	This study
<i>Escherichia coli</i> (n=5; #146-#150)	Colonies from LB agar were cultured O/N at 30°C with shaking in M9G supplemented with glucose (M9G; 0.25% w/v) and this culture was diluted (1/100) in fresh M9G.	3370	30°C	24	0.1% (w/v) crystal violet for 10 min	Wu et al., 2013
<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=5; #151-#156) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=5; #157-#160)	Colonies from BHI agar were suspended in BHIG; 0.25% w/v to a 0.5 McFarland standard	3595	37°C	24	0.1% (w/v) crystal violet for 10 min	This study

Table 2: Biofilm inhibition by 4 supernatants of *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus simulans* isolates with a weak biofilm phenotype against five isolates with a strong biofilm phenotype representing six bacterial species frequently isolated in bovine mastitis.

Proportion of isolates whose biofilm formation is significantly inhibited by the indicated supernatant ($p < 0.05$)				
	<i>S. chromogenes</i>		<i>S. simulans</i>	
	C	E	F	H
<i>Streptococcus uberis</i>	5/5	5/5	5/5	5/5
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	3/5	3/5	3/5	3/5
<i>Trueperella pyogenes</i>	4/5	5/5	5/5	5/5
<i>Escherichia coli</i>	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2/5	2/5	2/5	2/5

Table 3: Biofilm dispersion by 4 supernatants of *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus simulans* isolates with a weak biofilm phenotype against five isolates with a strong biofilm phenotype representing six bacterial species frequently isolated in bovine mastitis.

	Proportion of isolates whose biofilm is significantly dispersed by the indicated supernatant ($p < 0.05$)			
	<i>S. chromogenes</i>		<i>S. simulans</i>	
	C	E	F	H
<i>Streptococcus uberis</i>	4/5	4/5	3/5	3/5
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	5/5	5/5	5/5	3/5
<i>Trueperella pyogenes</i>	5/5	4/5	4/5	4/5
<i>Escherichia coli</i>	4/5	4/5	4/5	4/5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1/5	2/5	5/5	5/5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1/5	1/5	4/5	4/5

Table 4: Physicochemical properties of fractioned coagulase-negative staphylococci supernatants (< 3kDa) against isolates with a strong biofilm phenotype representing five staphylococcal species frequently isolated in bovine mastitis (CNS and *Staphylococcus aureus*).

		Proportion of isolates whose biofilm formation is significantly inhibited ($p < 0.05$) by the indicated supernatant (fraction < 3kDa) after the specified treatment			
		<i>S. chromogenes</i>		<i>S. simulans</i>	
		C	E	F	H
Heat treatment (100°C, 15 min)	CNS	4/4	4/4	4/4	4/4
	<i>S. aureus</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
SPE (Aqueous phase)	CNS	4/4	4/4	4/4	4/4
	<i>S. aureus</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
SPE (Hydrophobic phase)	CNS	0/4	0/4	0/4	0/4
	<i>S. aureus</i>	0/1	0/1	0/1	0/1

Table 5: Characterization of fractionated coagulase-negative staphylococci supernatants (< 3kDa) against isolates with a strong biofilm phenotype representing five staphylococcal species frequently isolated in bovine mastitis (CNS and *Staphylococcus aureus*).

Proportion of isolates whose biofilm formation is significantly inhibited ($p < 0.05$) by the indicated supernatant (fraction < 3kDa) after the specified treatment					
		<i>S. chromogenes</i>		<i>S. simulans</i>	
		C	E	F	H
Protéinase K	CNS	4/4	4/4	4/4	4/4
	<i>S. aureus</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
RNase	CNS	2/4	2/4	2/4	2/4
	<i>S. aureus</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
DNase	CNS	4/4	4/4	4/4	4/4
	<i>S. aureus</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
Lipase	CNS	4/4	4/4	4/4	4/4
	<i>S. aureus</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
Dispersin B	CNS	4/4	4/4	4/4	4/4
	<i>S. aureus</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
α-amylase	CNS	4/4	4/4	4/4	4/4
	<i>S. aureus</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
Lysostaphin	CNS	4/4	4/4	4/4	4/4
	<i>S. aureus</i>	1/1	1/1	1/1	1/1
NaOH	CNS	4/4	4/4	4/4	4/4
	<i>S. aureus</i>	1/1	1/1	1/1	1/1

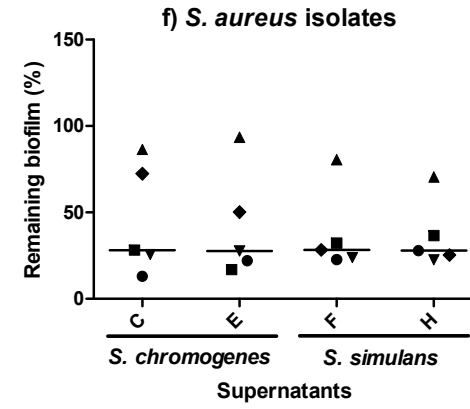
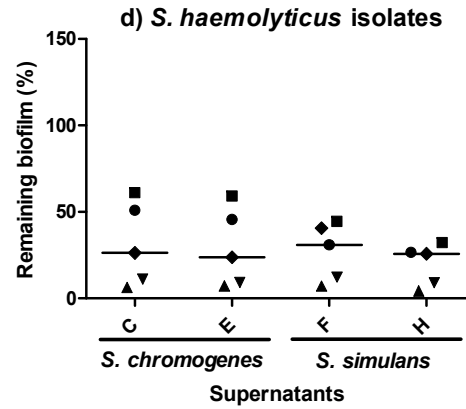
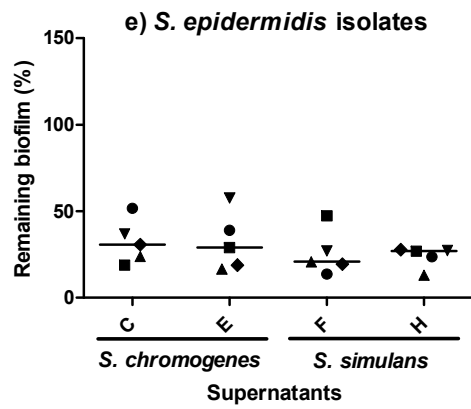
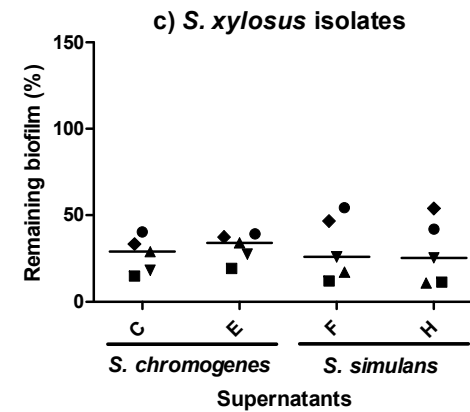
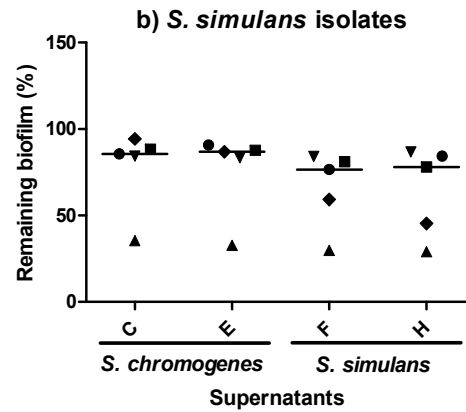
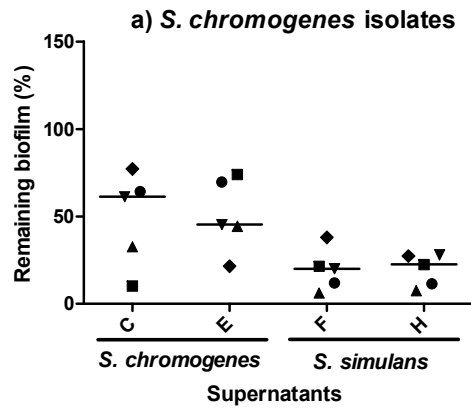


Figure 1: Activity of 4 supernatants of *Staphylococcus chromogenes* (C and E) and *Staphylococcus simulans* (F and H) isolates with a weak biofilm phenotype (x axis) on biofilm formation of five isolates with a strong biofilm phenotype representing six staphylococcal species: *S. chromogenes* (a), *S. simulans* (b), *Staphylococcus xylosus* (c), *Staphylococcus epidermidis* (d), *Staphylococcus haemolyticus* (e) and *Staphylococcus aureus* (f). Biofilm formation is expressed as % of the remaining biofilm compared to a control biofilm without coagulase-negative staphylococci supernatant. Each dot represents the mean of the triplicates from three independent days for each isolate. The 5 different symbols represent the 5 different isolates with a strong biofilm ability from each species (see Table S1). The bars represent the median values of each group. Statistical differences are reported in Table S1.

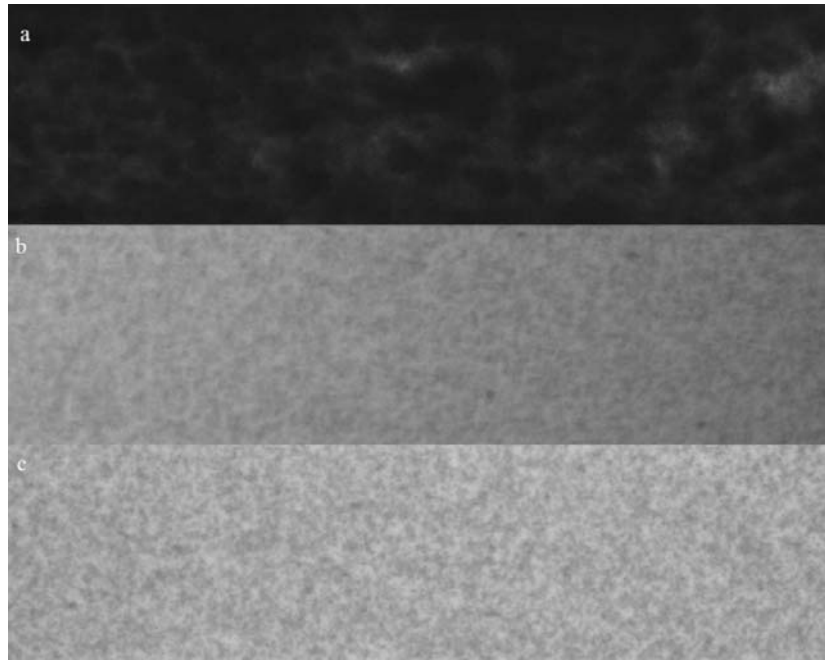


Figure 2: Microscope images of biofilms formed by a coagulase-negative staphylococcus isolate with a strong biofilm phenotype (*Staphylococcus simulans* #108) grown with BHI (a) or with *Staphylococcus chromogenes* C (b) or *S. simulans* F supernatants (c). Images were obtained after 24 h of growth in a flow chamber of the BioFlux 200 microfluidic system.

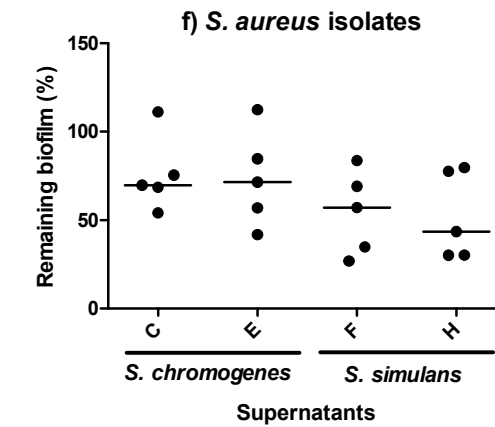
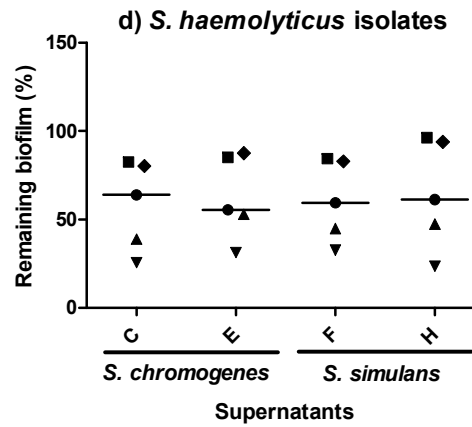
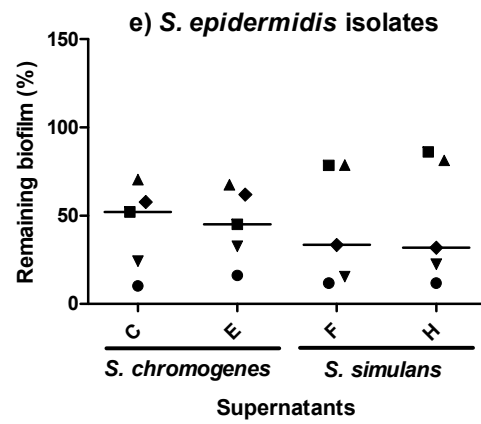
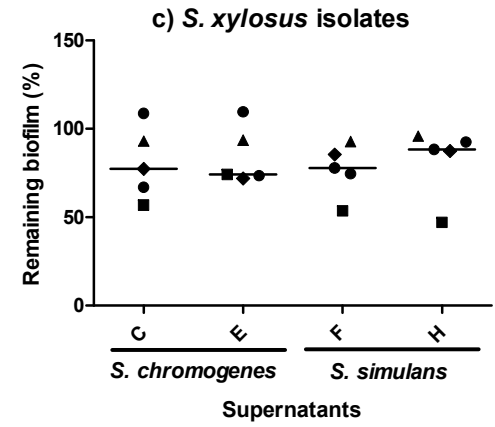
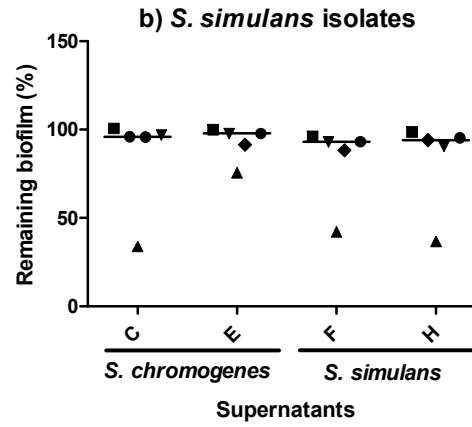
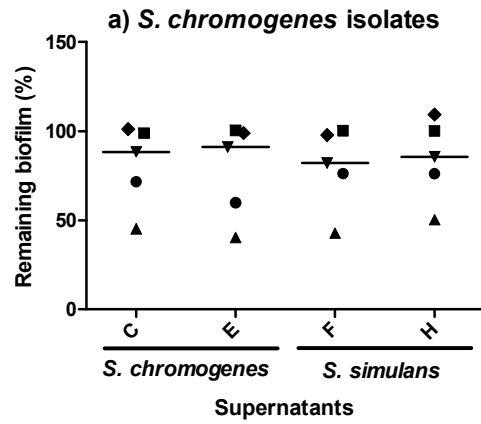


Figure 3: Activity of 4 supernatants of *Staphylococcus chromogenes* (C and E) and *Staphylococcus simulans* (F and H) isolates with a weak biofilm phenotype (x axis) on biofilm dispersion of five isolates with a strong biofilm phenotype representing six staphylococcal species: *S. chromogenes* (a), *S. simulans* (b), *Staphylococcus xylosus* (c), *Staphylococcus epidermidis* (d), *Staphylococcus haemolyticus* (e) and *Staphylococcus aureus* (f). Biofilm formation is expressed as % of the remaining biofilm compared to a control biofilm without coagulase-negative staphylococci supernatant. Each dot represents the mean of the triplicates from three independent days for each isolate. The 5 different symbols represent the 5 different isolates from each species (see Table S2). The bars represent the median values of each group. Statistical differences are reported in Table S2.

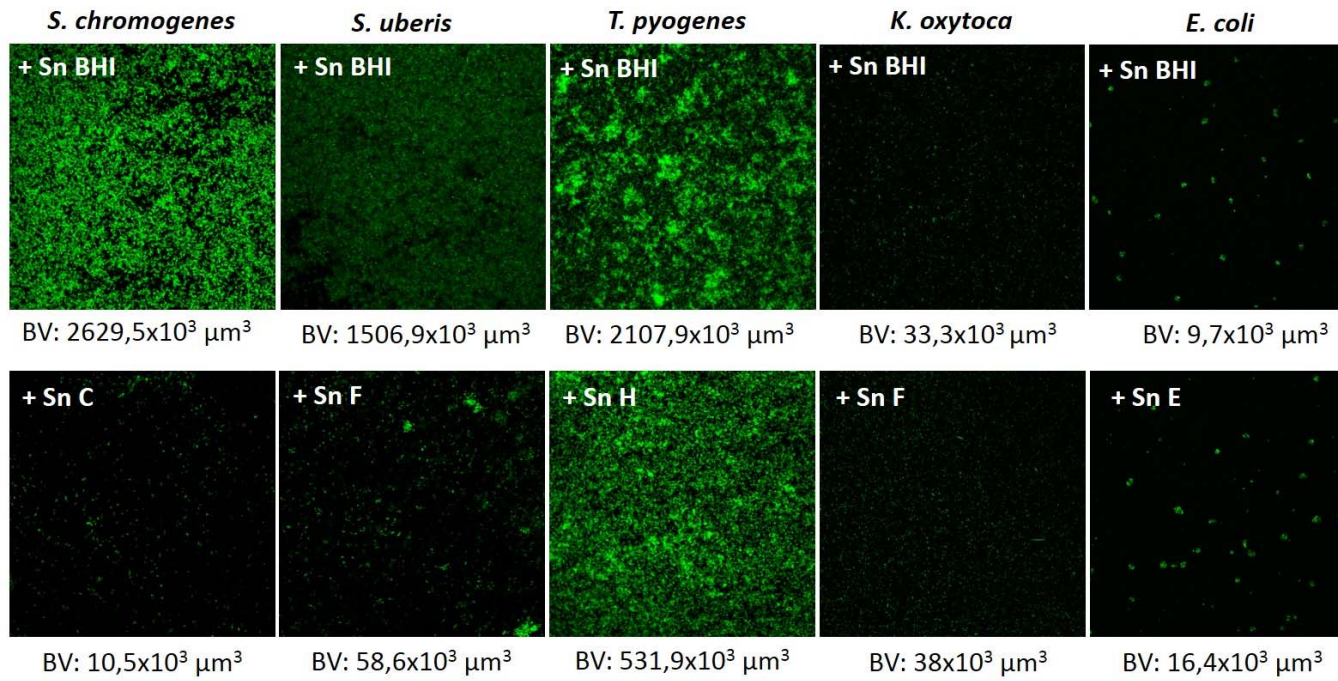


Figure 4: Visualization by confocal laser scanning microscopy of the biofilm formation by isolates with a strong biofilm phenotype (*Staphylococcus chromogenes* #104; *Streptococcus uberis* #131; *Trueperella pyogenes* #143; *Klebsiella oxytoca* #156; *Escherichia coli* #149) with or without the addition of coagulase-negative staphylococci supernatant (Sn C, Sn F, Sn H, Sn F or Sn E, respectively). The biovolume (BV) is expressed in μm³.

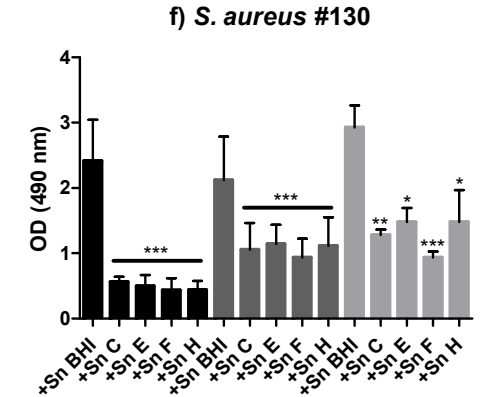
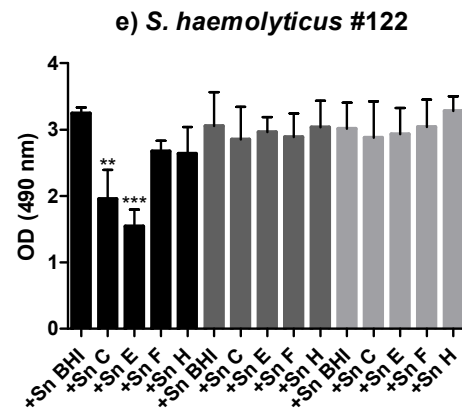
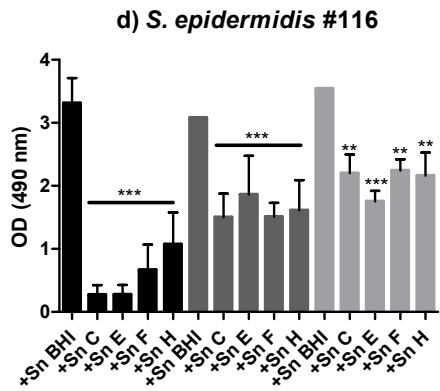
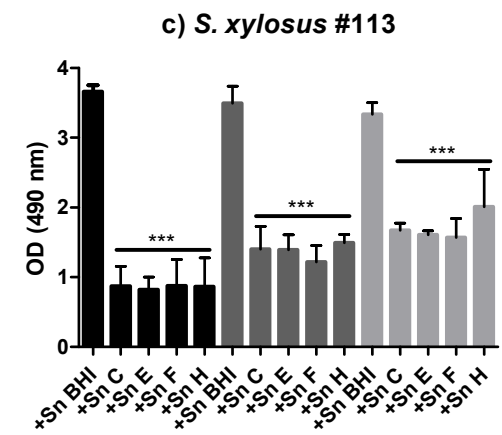
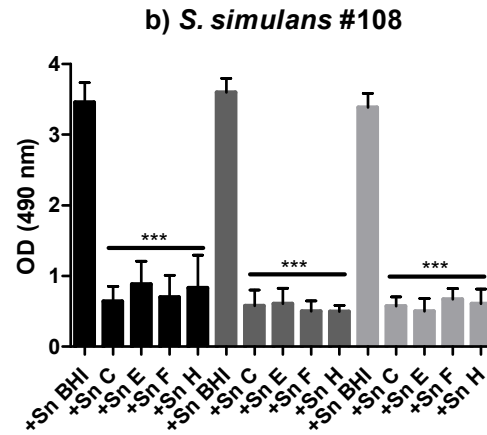
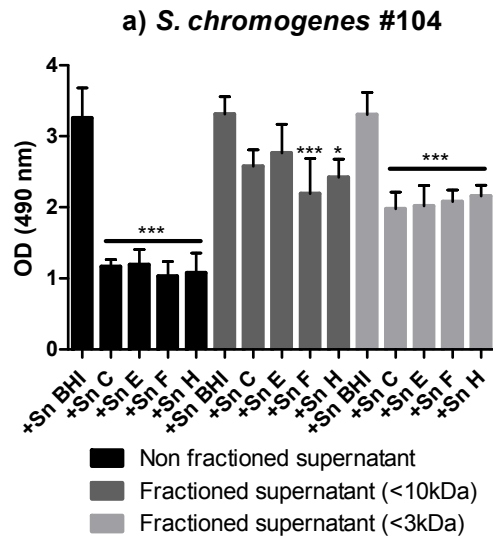


Figure 5: Biofilm inhibition by the non-fractionated supernatants (black) and the fractionated supernatants (< 10kDa: dark grey; < 3kDa: light grey) (x axis) against one isolate with a strong biofilm phenotype representing six staphylococcal species: *Staphylococcus chromogenes* (a), *Staphylococcus simulans* (b), *Staphylococcus xylosus* (c), *Staphylococcus epidermidis* (d), *Staphylococcus haemolyticus* (e) and *Staphylococcus aureus* (f). Biofilm formation is expressed by the A490 measurements. One-way ANOVA analysis was used to obtain statistical data. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Abbreviation: Sn, supernatant.

Biofilm formation		Supernatants produced by isolates with a low ability to form a biofilm				
	Species/strains	<i>S. chromogenes</i>		<i>S. simulans</i>		
		1180-1665 (C)	4021-4986 (E)	3140-6932 (F)	3100-0949 (H)	
Isolates with a strong ability to form a biofilm	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	4080-0059 (101) ●	**	*	***	***
		4070-0281 (102) ■	*		*	*
		3200-1501 (103) ▲	***	***	***	***
		4120-6461 (104) ◆	***	***	***	***
		2250-0991 (105) ▼	*	**		***
	<i>S. simulans</i>	3230-0284 (106) ●			*	
		4170-4486 (107) ■				
		4080-7423 (108) ▲	***	***	***	***
		3130-0360 (109) ◆			**	***
	3230-1199 (110) ▼					
	<i>S. xylosus</i>	4120-6492 (111) ●	**	**	*	**
		4010-1170 (112) ■	***	***	***	***
		4180-2182 (113) ▲	***	***	***	***
		3130-0193 (114) ◆	***	**	**	*
		3191-5046 (115) ▼	***	***	***	***
	<i>S. epidermidis</i>	3210-4837 (116) ●	***	***	***	***
		2201-0445 (117) ■	**	*		*
		2141-3728 (118) ▲	***	***	***	***
		3210-0389 (119) ◆	***	***	***	***
		3210-1836 (120) ▼	***	**	***	***
	<i>S. haemolyticus</i>	4080-1063 (121) ●	***	***	***	***
		3200-1181 (122) ■	**	***		
		3260-1329 (123) ▲	***	***	***	***
		2170-4321 (124) ◆	***	***	***	***
		3030-8428 (125) ▼	***	***	***	***
	<i>S. aureus</i>	1061-3160 (126) ●	***	***	***	***
		2061-1859 (127) ■	***	***	***	***
		1070-5001 (128) ▲			*	*
		1020-0186 (129) ◆		**	***	***
		1081-2464 (130) ▼ (MRSA)	***	***	***	***

Supplementary data S1: Biofilm inhibitory activity of the 4 supernatants of *S. chromogenes* and *S. simulans* isolates with a weak biofilm phenotype (top) against five isolates with a strong biofilm phenotype representing six staphylococcal species: *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. One-way ANOVA analysis was used to obtain statistical data. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. All experiments were performed on three independent days.

Biofilm dispersion		Supernatants produced by isolates with a low ability to form a biofilm				
	Species/strains	<i>S. chromogenes</i>		<i>S. simulans</i>		
		1180-1665 (C)	4021-4986 (E)	3140-6932 (F)	3100-0949 (H)	
Isolates with a strong ability to form a biofilm	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	4080-0059 (101) ●	***	***	***	***
		4070-0281 (102) ■				
		3200-1501 (103) ▲	***	***	***	***
		4120-6461 (104) ◆				
		2250-0991 (105) ▼	***	**	***	***
	<i>S. simulans</i>	3230-0284 (106) ●	***	***		***
		4170-4486 (107) ■				
		4080-7423 (108) ▲	***	***	***	***
		3130-0360 (109) ◆		*		
		3230-1199 (110) ▼			**	***
	<i>S. xylosus</i>	4120-6492 (111) ●	***	***	***	**
		4010-1170 (112) ■	***	***	***	***
		4180-2182 (113) ▲	*	*	*	
		3130-0193 (114) ◆				
		3191-5046 (115) ▼	***	***	**	**
	<i>S. epidermidis</i>	3210-4837 (116) ●	***	***	***	***
		2201-0445 (117) ■	**	**		
		2141-3728 (118) ▲	***	***	***	**
		3210-0389 (119) ◆	***	***	***	***
		3210-1836 (120) ▼	***	*	***	***
	<i>S. haemolyticus</i>	4080-1063 (121) ●	***	***	***	***
		3200-1181 (122) ■	***	**	**	
		3260-1329 (123) ▲	***	***	***	***
		2170-4321 (124) ◆	***	***	***	
		3030-8428 (125) ▼	***	***	***	***
	<i>S. aureus</i>	1061-3160 (126) ●				**
		2061-1859 (127) ■		**	***	***
		1070-5001 (128) ▲				
		1020-0186 (129) ◆	**	**	***	***
		1081-2464 (130) ▼ (MRSA)				

Supplementary data S2: Biofilm dispersion activity by the 4 supernatants of *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus simulans* isolates with a weak biofilm phenotype (top) against five isolates with a strong biofilm phenotype representing six staphylococcal species: *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. One-way ANOVA analysis was used to obtain statistical data. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. All experiments were performed on three independent days.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les SCN sont considérés comme des bactéries commensales de l'homme et de l'animal (Prescott et al., 1995; Piette et Verschraegen, 2009; Jacques et al., 2010). Cependant, certaines espèces de SCN sont également impliquées lors d'infections causées par des biofilms et notamment en médecine vétérinaire dans le cas de MB (Blowey et Edmondson, 2010). Néanmoins, certains chercheurs ont mis en évidence qu'une IIM préexistante causée par des SCN pouvait également avoir un rôle protecteur contre l'acquisition d'une nouvelle IIM (Rainard et Poutrel, 1988; Matthews et al., 1991). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cet effet bénéfique tels que l'existence de phénomènes de compétitions notamment au sein de biofilms mixtes, une réponse immunitaire déjà activée ou encore la production de substances inhibitrices telles que les bactériocines (Cangemi de Gutierrez et al., 2001; Rendueles et Ghigo, 2012).

Des résultats préliminaires réalisés dans notre laboratoire avaient mis en évidence la capacité de certaines souches de SCN produisant peu ou pas de biofilm à inhiber la production de biofilm par d'autres agents pathogènes responsables de MB.

Le but de ce projet fut donc de caractériser la ou les molécules antibiofilm produites par des souches de SCN afin de proposer une alternative aux antibiotiques dans le traitement de la MB.

Afin d'y arriver, plusieurs objectifs ont été définis : (I) sélectionner les souches de staphylocoques à coagulase négative ayant une forte activité antibiofilm; (II) élucider le mode d'action et identifier la ou les molécule(s) responsable(s) de cette activité antibiofilm; (III) déterminer le spectre d'activité de cette activité antibiofilm; (IV) mesurer l'activité *in vivo* des fractions actives des surnageants de staphylocoques à coagulase négative dans un modèle murin de mammite.

I. Sélectionner les souches de staphylocoques à coagulase négative ayant une forte activité antibiofilm.

Dans le but de sélectionner des souches de SCN ayant une forte activité antibiofilm, 30 souches de staphylocoques (cinq espèces de SCN et *S. aureus*) possédant un phénotype de biofilm fort et 10 souches de SCN (*S. chromogenes* et *S. simulans*) possédant un phénotype de biofilm faible ont été sélectionnées à partir de la collection du Réseau Canadien de Recherche sur la Mammite Bovine et la Qualité du Lait (RCRMBQL) (St-Hyacinthe, Québec, Canada; Reyher et al., 2011). Les souches de SCN ont été choisies parmi les cinq espèces principales présentes dans les fermes canadiennes (*S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* et *S. epidermidis* (Fry et al., 2014). Des souches de *S. aureus* dont une souche de *S. aureus* résistante à la méthicilline (SARM) ont également été intégrées à cette étude. En effet, *S. aureus* est un problème majeur dans les fermes laitières au Canada et notamment en raison de la difficulté à s'en débarrasser (Barkema et al., 2006; Zadoks et al., 2011). Les souches de SARM, quant à elles, représentent un problème émergent en médecine vétérinaire. En effet, des souches de SARM ont été isolées chez les animaux de compagnie ainsi que chez les animaux d'élevage (Weese, 2010; Cuny et al., 2010). Chez les bovins laitiers, l'incidence des mammites à SARM demeure néanmoins faible (Saini et al., 2012b). Cependant, la mise en évidence de SARM chez différentes espèces d'animaux est inquiétante. En effet, il a été mis en évidence dans certains pays que cela pouvait entraîner une augmentation du taux de transmission de SARM des animaux vers l'humain (Weese et al., 2010).

La production de biofilm par les souches de staphylocoques productrices fortes a été quantifiée à l'aide de plaques 96 puits en condition de biofilm simple puis comparée au biofilm produit en condition de biofilm mixte. Les résultats obtenus ont mis en évidence

que des souches de *S. simulans* et de *S. chromogenes* avaient la capacité d'inhiber de façon significative la formation de biofilms par d'autres souches de staphylocoques (Article 1). Cette inhibition a été observée pour les cinq souches testées provenant des cinq espèces majeures de SCN et de *S. aureus*. De plus, nous avons mis en évidence que quatre souches (*S. chromogenes* C et E et *S. simulans* F et H) étaient capables d'inhiber de manière significative la formation de biofilm de 80% (24/30) des souches testées. Par la suite, les résultats ont été confirmés par microscopie confocale mais aussi par une méthode dynamique, la microfluidique, qui permet de reproduire sensiblement l'environnement de la bactérie et cela grâce à l'action de forces de cisaillement produites par un flux continu de milieu de culture.

De manière générale, les souches de *S. chromogenes* semblent avoir une activité inhibitrice plus importante que les souches de *S. simulans*. De plus, les souches de *S. haemolyticus* et de *S. xylosus* semblent être plus sensibles à cet effet inhibiteur. Les différences observées sont en accord avec la littérature la plus récente qui indique que l'effet des SCN au niveau intra-mammaire semble être espèce-dépendant (Vanderhaeghen et al., 2014). Nos résultats semblent même mettre en évidence dans certains cas, un effet souche-dépendant. De ce fait, il pourrait s'avérer intéressant d'avoir recours à la génomique comparative entre des souches de staphylocoques dont le biofilm est impacté par cette activité antibiofilm et des souches dont le biofilm ne l'est pas. Cela pourrait peut-être nous permettre de mettre en évidence des cibles génétiques potentielles chez les staphylocoques (Mannala et al., 2018). De plus, le séquençage du génome entier de 441 souches de SNA de la collection du RCRMBQL a déjà été réalisé par une équipe de Calgary (Naushad et al., 2016).

Les mêmes conclusions ont été faites en essais de dispersion avec cependant un effet moins important que celui observé pour l'inhibition de la formation du biofilm. Cette

différence peut s'expliquer notamment par le fait que les facteurs et les mécanismes intervenant dans la formation et la dispersion des biofilms de staphylocoques ne sont pas les mêmes (Otto, 2013). En effet, la formation de biofilm peut par exemple être inhibée en prévenant l'adhésion des bactéries à une surface donnée alors que la dispersion de biofilm peut être induite grâce à des enzymes dégradant la matrice du biofilm (Goetz et al., 2016; Annexe 2).

II. Élucider le mode d'action et identifier la ou les molécule(s) responsable(s) de cette activité antibiofilm

Certains SCN isolés chez la vache laitière sont connus pour produire des bactériocines qui ont une activité antibactérienne contre d'autres agents pathogènes de la MB tels que les SCN, *S. aureus*, *S. uberis* et *S. agalactiae* (dos Santos Nascimento et al., 2005; Ceotto et al., 2010; Brito et al., 2011; Braem et al., 2014). Les bactériocines sont définies comme étant des peptides antimicrobiens d'origine bactériennes synthétisés par voie ribosomique et présentant une activité bactéricide contre des espèces bactériennes relativement proches (Klaenhammer, 1988). Les bactériocines produites par les SCN appartiennent majoritairement à la classe I et agissent en provoquant la formation de pores dans la membrane des cellules sensibles (Bastos et al., 2009; Heng et Tagg, 2006). Afin de nous assurer que l'inhibition de la formation de biofilm n'était pas imputable à une activité bactéricide, nous avons évalué la production de bactériocines par les souches de *S. chromogenes* C et E et *S. simulans* F et H grâce à l'utilisation de tests d'antagonisme ainsi que leur effet sur la croissance bactérienne grâce à des essais d'UFC (unité formant une colonie). Ces tests n'ont pas révélé de production de bactériocines ou d'inhibition

significative de la croissance bactérienne par nos souches de SCN dans les conditions testées (Article 1).

Nous avons également évalué s'il y avait présence d'une activité enzymatique qui pourrait être responsable de cette activité antibiofilm. Dans ce cas-là, nous avons réalisé des essais de sécrétion de protéases et de nucléases à l'aide de géloses spécifiques. Les résultats obtenus ont montré que ces activités enzymatiques ne semblaient pas être impliquées dans l'activité antibiofilm observée.

En parallèle à la recherche du mécanisme d'action impliqué dans cette activité antibiofilm, nous avons également voulu en savoir plus sur la ou les molécules impliquées. Les connaissances se rapportant aux biofilms formés par les staphylocoques ont permis le développement de molécules antibiofilm ciblant spécifiquement les étapes de formation du biofilm. La nature de ces composés demeure très variée. En effet, des protéines, des sucres ou encore des enzymes sont proposés dans la littérature comme stratégie antibiofilm (Goetz et al., 2016; Annexe 2).

Afin d'en savoir plus sur la ou les molécules responsables de l'activité antibiofilm observée au cours de l'objectif 1, nous avons voulu, dans un premier temps, vérifier si cette activité était due à la sécrétion systématique d'une molécule par les souches de SCN dans leur environnement extérieur et non pas à la présence d'autres micro-organismes dans leur environnement. Nous avons alors démontré que les surnageants de culture produits par les souches de *S. chromogenes* C et E et de *S. simulans* F et H étaient également actifs et qu'ils présentaient, comme montré en condition de biofilm mixte, une activité inhibitrice plus importante sur la formation que sur la dispersion de biofilms produits par des souches de staphylocoques (Article 2). En revanche, aucun effet sur l'adhésion a été observé et cela que ce soit sur une surface biotique (e.g. paroi bactérienne) ou abiotique (e.g. polystyrène).

La caractérisation de la ou des molécules antibiofilm en cause a ensuite été réalisée à l'aide de membranes de porosité différente et de différents traitements physico-chimiques et enzymatiques des fractions actives. Nous avons ainsi pu notamment montrer que l'activité antibiofilm était conservée dans la fraction $< 3\text{kDa}$ des surnageants et que cette fraction active était thermorésistante, hydrophile et dépendamment des souches de staphylocoques ciblées, sensible à la RNase A suggérant que l'activité antibiofilm pourrait être due à un ARN extracellulaire. De récents résultats ont d'ailleurs montré que cette activité antibiofilm était perdue contre plus de la moitié de l'ensemble des souches de staphylocoques (55%) après traitement par la RNase. Pour vérifier cette hypothèse, une extraction des ARN présents dans les fractions actives a été récemment réalisée et celle-ci a révélé que les ARN extraits inhibaient également la formation de biofilms produits par des souches de staphylocoques. De plus, une analyse préliminaire réalisée à l'aide d'un bioanalyseur a permis de déterminer que la longueur des ARN extraits était de l'ordre de 25 à 30 nucléotides et que nous étions donc en présence de petits ARN, ce qui est en corrélation avec la littérature disponible sur ce sujet (Arluison et Valverde, 2018). Il serait donc intéressant par la suite de séquencer les ARN extraits afin de constituer une librairie d'ARN dont nous pourrions obtenir les séquences dans le but de les synthétiser et de tester leur effet sur la formation de biofilms afin d'identifier l'ARN responsable de l'activité antibiofilm observée.

Afin d'en savoir plus sur le mécanisme d'action impliqué, il serait d'ailleurs pertinent de vérifier la présence de vésicules extracellulaires (exosomes) dans nos surnageants actifs. La production de ce type de vésicules a déjà été mise en évidence chez *S. aureus* ce qui nous rend optimiste quant à leur production par les SCN (Brown et al., 2015). L'isolation de vésicules extracellulaires pourrait notamment se faire à l'aide d'ultracentrifugations successives suivies d'une analyse au Nanosight et d'une observation

par microscopie électronique (Brown et al., 2015). Si nous réussissons à mettre en évidence la présence de vésicules extracellulaires dans les fractions actives de nos surnageants de SCN, cela pourrait notamment expliquer comment l'ARN responsable de cette activité antibiofilm pénètre dans la bactérie ciblée et perturbe sa capacité à former un fort biofilm. En effet, des travaux ont mis en évidence la capacité de ces acteurs essentiels dans la communication intercellulaire et notamment par le transport de petits ARN régulateurs (Chen et al., 2012; Koeppen et al., 2016). Il a notamment été mis en évidence la capacité de *Pseudomonas aeruginosa* à libérer, dans son environnement extérieur, des petits ARN contenus dans des vésicules extracellulaires qui vont cibler l'ARNm de cellules pulmonaires et bronchiques de l'hôte, ayant pour conséquences une inhibition de la synthèse d'IL-8 et une diminution de la capacité du système immunitaire innée de l'hôte à faire face à l'infection.

Nos résultats sont en accord avec d'autres études mettant aussi en avant un rôle bénéfique des souches de SCN dans le contexte de la MB (Braem et al., 2014; Isaac et al., 2017). En revanche, l'implication d'un petit ARN extracellulaire est à notre connaissance une nouveauté afin d'expliquer l'effet positif des SCN. En effet, l'effet endogène de petits ARN régulateurs dans la formation de biofilm a déjà été mise en évidence. C'est notamment le cas pour *E. coli* chez qui la surexpression d'un petit ARN, RprA, entraîne une diminution de la synthèse du régulateur transcriptionnel csgD et par ce fait une inhibition de la formation de biofilm par *E. coli* (Mika et al., 2012). En revanche, peu d'articles s'intéressent aux petits ARN extracellulaires et à leur effet exogène (Chambers and Sauer, 2013; Koeppen et al., 2016; Svenningsen, 2018; Tsatsaronis et al., 2018).

En parallèle, nous avons également observé une perte de l'activité antibiofilm de nos surnageants de SCN contre la souche de *S. aureus* résistante à la méthicilline après traitement par la dispersine B suggérant que l'activité antibiofilm pourrait aussi être due à

un oligosaccharide ciblant spécifiquement la matrice de *S. aureus*. Cela peut d'ailleurs s'expliquer par le fait que la composition de la matrice extracellulaire de *S. aureus* est différente de celle des SCN. En effet, la matrice de *S. aureus* est composée principalement de poly-beta(1,6)-N-acetyl-d-glucosamine (PNAG) alors que celle des SCN est principalement composée de protéines (Tremblay et al., 2013; Arciola et al., 2015). Les oligosaccharides sont déjà connus pour leur propriété antibiofilm. Il a notamment récemment été démontré l'activité antibiofilm de l'OligoG, un oligosaccharide ayant la capacité de perturber l'architecture de la matrice polymérique de *P. aeruginosa* (Powell et al., 2018). Un des moyens de prouver cette hypothèse serait de coupler différentes méthodes de fractionnement à de la spectrométrie de masse. Des résultats préliminaires ont d'ailleurs été réalisés afin d'identifier la ou les molécules responsables de cette activité antibiofilm en analysant les différentes fractions actives de nos surnageants par spectrométrie de masse. Malheureusement, nous avons obtenu jusqu'à ce jour trop de masses différentes et donc, trop de candidats potentiels. Une optimisation du fractionnement serait donc nécessaire afin d'obtenir une fraction peu complexe mais présentant toujours une activité antibiofilm significative. Celle-ci pourrait notamment se faire à l'aide d'une hydrolyse acide qui permettra d'isoler les sucres.

La spectrométrie de masse nous permettra peut-être également de mettre en évidence d'autres molécules impliquées dans cette activité antibiofilm. En effet, nos résultats ont aussi montré des différences d'activité entre les surnageants de *S. chromogenes* et de *S. simulans* mais également l'existence de souches de staphylocoques toujours sensibles à l'activité de nos surnageants même après les différents traitements (Article 2). Tout cela nous laisse donc à penser que d'autres molécules peuvent être impliquées, comme par exemple, un polysaccharide. En effet, les différents traitements enzymatiques utilisés au cours de ce projet tels que les traitements par la dispersine B et

par l'amylase présentent des sites de coupure spécifiques. Un des moyens de prouver cette hypothèse serait notamment de traiter les fractions actives avec du NaIO₄ afin d'hydrolyser les différents polysaccharides par clivage des liaisons C-C (Mack et al., 1996). Des tests préliminaires ont été réalisés au laboratoire mais malheureusement le protocole utilisé pour neutraliser l'excès de NaIO₄ n'est pas adapté aux souches utilisées comme contrôle dans notre étude. Une chromatographie sur couche mince couplée à des techniques de spectroscopie à résonance magnétique nucléaire pourront être utilisées afin de séparer et d'identifier les sucres présents dans les fractions actives.

III. Déterminer le spectre d'activité de cette activité antibiofilm

Nous avons mis en évidence que les surnageants de culture de deux souches de *S. chromogenes* (C et E) et de deux souches de *S. simulans* (F et H) présentaient une activité antibiofilm contre les souches de staphylocoques isolées dans des cas de MB (Article 2). Étant donné que les staphylocoques ne sont pas les seuls agents pathogènes responsables de MB (Blowey et Edmondson, 2010), nous avons voulu évaluer le spectre d'activité de nos quatre surnageants actifs. Pour cela, nous avons sélectionné cinq souches ayant une forte capacité à former des biofilms parmi les agents pathogènes les plus fréquemment isolés dans les cas de MB au Canada : *Streptococcus* spp., *T. pyogenes*, *Klebsiella* spp. et *E.coli* (Reyher et al., 2011; Melchior, 2011).

Nous avons alors pu observer que nos surnageants présentaient un spectre d'activité étendu parmi ces agents pathogènes (Article 2). En effet, les surnageants de SCN semblent inhiber la formation de biofilms produits par les bactéries à Gram positif mais également sur la dispersion de biofilms préformés par les bactéries à Gram positif mais aussi à Gram négatif. Étant donné que les facteurs et les mécanismes intervenant dans la formation et la

dispersion des biofilms bactériens ne sont pas les mêmes, on peut donc penser que l'inhibition de la formation et la dispersion impliqueraient deux mécanismes distincts en fonction des espèces. La présence d'un large spectre d'activité est d'ailleurs un avantage par rapport à d'autres alternatives thérapeutiques proposées dans le cadre de la MB tels que les bactériocines ou les bactériophages qui présentent souvent un spectre limité (Tagg et al., 1976; Ravat et al., 2015). Plus généralement, il ne semble pas y avoir à l'heure actuelle de produit disponible sur le marché démontrant une efficacité à large spectre contre les biofilms bactériens. En effet, la majorité des molécules présentées dans la littérature possèdent un spectre d'activité souvent restreint à une seule espèce bactérienne (Goetz et al., 2016; Annexe 2).

En revanche, de récents résultats ont montré que l'activité antibiofilm de nos quatre surnageants contre les souches de *Streptococcus* spp., *T. pyogenes*, *Klebsiella* spp. et *E. coli* ne semblait pas être impactée par le traitement par la RNase. Cela confirme bien que nous sommes en présence de plusieurs molécules et/ou mécanismes d'action pour nos surnageants de SCN.

D'autres travaux réalisés dans notre laboratoire ont également mis en évidence que trois de ces quatre surnageants présentaient une activité antibiofilm contre des souches de *Listeria monocytogenes* isolées dans des usines de transformation et dans des abattoirs porcins et que cette activité semblait être imputable à un effet sur la motilité de la bactérie (Annexe 3).

Par la suite, il serait donc intéressant de tester l'efficacité de ces quatre surnageants sur la formation de biofilms par des souches de staphylocoques plus ou moins résistantes à la méthicilline d'origine humaine. En effet, la formation de biofilm sur du matériel implanté (ex : cathéters) par des souches de *S. epidermidis* et de *S. aureus* constitue un problème majeur en médecine humaine et notamment en raison des limites des traitements

proposés pour s'en débarrasser (Hogan et al., 2015). En effet, si le biofilm s'est formé sur du matériel implanté, le premier geste sera de le retirer et de le remplacer mais cela augmente les risques liés à la chirurgie et les complications (Rumbaugh et Ahmad, 2014). Autre stratégie alternative, la « Lock technique » qui consiste à recouvrir le cathéter d'antibiotique à une dose 100 à 1000 fois supérieure à la CMI associé à de l'héparine afin de détruire l'effet agrégeant de la fibrine, du fibrinogène et de la fibronectine (Rumbaugh et Ahmad, 2014). Cette alternative a malheureusement comme effet d'augmenter les résistances antibiotiques.

On pourrait également tester l'efficacité de nos quatre surnageants sur d'autres agents pathogènes d'importance dans l'agro-alimentaire tels que *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus* et *Campylobacter jejuni* (Galié et al., 2018 ; Lamas et al., 2018). En effet, la formation de biofilms par ces microorganismes posent également problème dans l'industrie agro-alimentaire et notamment dans les usines de transformation laitière en raison de leur impact sur la qualité et la salubrité des produits laitiers (Teh et al., 2015). En effet, la dispersion de ces microorganismes à partir du biofilm dans le fluide laitier peut entraîner une présence de microorganismes indésirables dans le produit pouvant conduire à une perte de qualité avec une charge microbienne viable trop élevée et un risque de contamination des produits laitiers par des microorganismes pathogènes (Teh et al., 2015). Les biofilms établis sont difficiles à éliminer lors des nettoyages en place et peuvent devenir résistants aux agents d'assainissement (Teh et al., 2015). Ils peuvent également favoriser la corrosion des surfaces en acier inoxydable (Teh et al., 2015).

IV. Mesurer l'activité *in vivo* des fractions actives des surnageants de staphylocoques à coagulase négative dans un modèle murin de mammite.

Pour finir, nous avons souhaité évaluer l'activité *in vivo* de nos quatre surnageants contre une souche de SARM dans un modèle murin de mammite (Brouillette et al., 2004; Brouillette et Malouin, 2005). Pour cela, les glandes mammaires de plusieurs souris ont été inoculées simultanément avec une souche bovine de SARM ainsi qu'avec nos quatre surnageants de SCN. Les glandes ont ensuite été prélevées afin de réaliser un comptage bactérien à 16 h après l'inoculation. On a ainsi pu observer que les quatre surnageants inhibaient de façon significative la croissance bactérienne de la souche de SARM chez la souris (Annexes 4 et 5).

De manière plus intéressante, il a été observé que l'administration précoce du surnageant C permettait d'empêcher la colonisation de la glande mammaire par la souche de *S. aureus*. En parallèle, il a été observé que les surnageants induisaient chez la souris une augmentation de la réponse inflammatoire. Cette élévation semble corrélée à l'inhibition de croissance de la souche bovine de SARM. Cela est cohérent avec la littérature dans laquelle il a été démontré que la mobilisation des acteurs de la réponse inflammatoire constituait un des mécanismes par lesquels la croissance de bactéries peut être prévenue (Perdigón et al., 1986; Perdigón et al., 1988; Cangemi de Gutierrez et al., 2001). De plus, il a récemment été mis en évidence dans la littérature que les vésicules extracellulaires jouaient un rôle dans la médiation de la réponse inflammatoire chez *S. aureus* (Kim et al., 2018). En effet, il a été démontré que les vésicules extracellulaires produites par la bactérie participaient au recrutement de monocytes et cela en induisant l'activation de cellules endothéliales (Kim et al., 2018).

Il serait par la suite intéressant de vérifier que nos surnageants ne présentent pas d'effets délétères sur les cellules et notamment en testant leur toxicité sur les cellules épithéliales mammaires bovines MAC-T (Asli et al., 2017). En l'absence de toxicité cellulaire, la prochaine étape pourrait être de tester l'efficacité de nos quatre surnageants dans un modèle bovin (Ster et al., 2013).

Conclusion

Ce projet a permis de mettre en évidence l'activité antibiofilm *in vitro* de surnageants de culture issus de souches de staphylocoques contre des agents pathogènes responsables de MB. Cette activité semble être due en partie à la production d'un petit ARN extracellulaire par les souches de SCN, ce qui, à notre connaissance, n'a jamais été mis en évidence dans la littérature.

Nous n'avons malheureusement pas pu totalement élucider le ou les mécanismes d'action en cause. En revanche, des résultats préliminaires couplés à la littérature nous laissent à penser qu'un des mécanismes impliqués pourrait être le transfert horizontal de petits ARN d'une cellule donneuse (*S. chromogenes* ou *S. simulans*) vers une cellule réceptrice (SCN ou *S. aureus*) afin de cibler un régulateur transcriptionnel important dans la formation de biofilm par les staphylocoques (Figure 1).

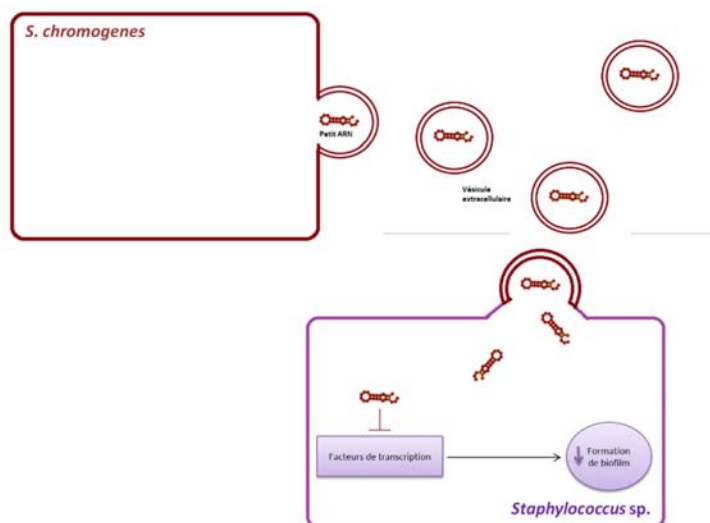


Figure 1 : Représentation schématique du mécanisme d'action hypothétique impliquant le transfert horizontal d'un petit ARN dans l'activité antibiofilm des surnageants de staphylocoques à coagulase négative.

Les surnageants étudiés semblent agir à la fois sur la formation de biofilm par des bactéries à Gram positif mais également sur la dispersion de biofilm produit par des bactéries à Gram positif et négatif. On pourrait donc penser pouvoir les utiliser dépendamment de l'agent pathogène en cause en traitement prophylactique mais également en traitement curatif.

En parallèle, ces mêmes surnageants ont présenté *in vivo* une activité anti-infectieuse contre une souche de SARM.

En conclusion, ces surnageants semblent être une alternative prometteuse aux antibiotiques dans le traitement de la MB pour prévenir et/ou traiter cette infection. Ils pourraient alors être dispensés sous différentes formulations telles qu'une suspension intramammaire ou une solution de trempage en association ou non avec d'autres produits déjà commercialisés. Cependant, des études devront être réalisées afin d'évaluer l'efficacité de ces différentes molécules ainsi que les limites liées à leur utilisation dans un contexte d'IIM chez la vache laitière.

De plus, ces surnageants pourraient également avoir de multiples applications chez l'humain, et notamment dans les cas d'infections associés aux soins où la formation de biofilms par des souches de staphylocoques et notamment de SARM est un problème majeur. Ces surnageants pourraient également être intéressants pour l'industrie agro-alimentaire, comme par exemple, dans la lutte contre *Listeria monocytogenes*.

BIBLIOGRAPHIE

Ackerman D.L., Craft K.M., Doster R.S., Weitkamp J.H., Aronoff D.M, Gaddy J.A., Townsend S.D.: Antimicrobial and antibiofilm activity of human milk oligosaccharides against *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, and *Acinetobacter baumannii*. ACS Infect Dis, 2017, **4**, 315-324.

Afifi M., Kabera F., Stryhn H., Roy J.P., Heider L.C., Godden S., Montelpare W., Sanchez J., Dufour S.: Antimicrobial-based dry cow therapy approaches for cure and prevention of intramammary infections: a protocol for a systematic review and meta-analysis. Anim Health Res Rev., 2018, **19**, 74-78.

Aghamohammadi M., Haine D., Kelton D.F., Barkema H.W., Hogeveen H., Keefe G.P., Dufour S.: Herd-Level Mastitis-Associated Costs on Canadian Dairy Farms. Front Vet Sci, 2018, **5**.

Ahmed D., Anwar A., Khan A.K., Ahmed A., Shah M.R, Khan N.A.: Size selectivity in antibiofilm activity of 3-(diphenylphosphino)propanoic acid coated gold nanomaterials against Gram-positive *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. AMB Express, 2017, **7**, 210.

Ajitkumar P., Barkema H.W., Zadoks R.N., Morck D.W., van der Meer F.J., De Buck J.: High-resolution melt analysis for species identification of coagulase-negative staphylococci derived from bovine milk. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, **75**, 227-234.

Allard M., Ster C., Jacob C.L., Scholl D., Diarra M.S., Lacasse P., Malouin F.: The expression of a putative exotoxin and an ABC transporter during bovine intramammary infection contributes to the virulence of *Staphylococcus aureus*. Vet Microbiol, 2013, **162**, 761-770.

Alves M.M., Bouchami O., Tavares A., Córdoba L., Santos C.F., Miragaia M., de Fátima Montemor M. N.: New Insights into Antibiofilm Effect of a Nanosized ZnO Coating against the Pathogenic Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, **9**, 28157-28167.

Ambler R.P.: The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 1980, **289**, 321-331.

Arciola C.R., Campoccia D., Ravaioli S., Montanaro L.: Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015, **5**.

Arluison V. and Valverde C.: *Bacterial Regulatory RNA, Methods and Protocols*, 395 pages, John M. Walker edition, Hertfordshire, 2018.

Asli A., Brouillette E., Ster C., Ghinet M.G., Brzezinski R., Lacasse P., Jacques M., Malouin F.: Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan molecules on *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *PLoS One*, 2017, **12**.

Barkema H.W., Schukken Y.H., Lam T.J., Beiboer M.L., Wilmink H., Benedictus G., Brand A.: Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J Dairy Sci*, 1998, **81**, 411-419.

Barkema H.W., Schukken Y.H., Zadoks R.N.: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci*, 2006, **89**, 1877-1895.

Barkema H.W., Green M.J., Bradley A.J., Zadoks R.N.: The role of contagious disease in udder health. *J Dairy Sci*, 2009, **92**, 4717-4729.

Barkema H.W., De Vliegher S., Piepers S., Zadoks R.N.: Herd level approach to high bulk milk somatic cell count problems in dairy cattle. *Vet Q*, 2013, **33**, 82-93.

Barnum D.A., Newbould F.H.: The use of the California Mastitis Test for the detection of bovine mastitis. *Can Vet J*, 1961, **2**, 83-90.

Bazargani M.M. and Rohloff J.: Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 2016, **61**, 156-164.

Becker K., Ballhausen B., Köck R., Kriegeskorte A.: Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the "mec alphabet" with specific consideration of mecC, a mec homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Int J Med Microbiol*, 2014, **304**, 794-804.

Becker K., Heilmann C., Peters G.: Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*, 2014, **27**, 870-926.

Becker S.C., Roach D.R., Chauhan V.S., Shen Y., Foster-Frey J., Powell A.M., Bauchan G., Lease R.A., Mohammadi H., Harty W.J., Simmons C., Schmelcher M., Camp M., Dong S., Baker J.R., Sheen T.R., Doran K.S., Pritchard D.G., Almeida R.A., Nelson D.C., Marriott I., Lee J.C., Donovan D.M.: Triple-acting lytic enzyme treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*, 2016, **6**, 25063.

Becker K.: Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. In FETSCH A. (éd): *Staphylococcus aureus*, Academic Press, Cambridge, 2017, 13-38.

Blowey R., Edmondson P.: Mastitis control in dairy herds, 256 pages, Kindle edition, Londres, 2010.

Bogdanova, K., Röderova M., Kolar M., Langova K., Dusek M., Jost P., Kubelkova K., Bostik P., Olsovska J.: Antibiofilm activity of bioactive hop compounds humulone, lupulone and xanthohumol toward susceptible and resistant staphylococci. *Res Microbiol*, 2018, **169**, 127-134.

Bradley A.J., Green M.J.: Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J Clin Microbiol*, 2001, **39**, 1845-1849.

Bradley A. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J*, 2002, **164**, 116-28.

Braem G., De Vlieghe S., Verbist B., Piessens V., Van Coillie E., De Vuyst L., Leroy F.: Unraveling the microbiota of teat apices of clinically healthy lactating dairy cows, with special emphasis on coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci*, 2013, **96**, 1499-510.

Braem G., Stijlemans B., Van Haken W., De Vlieghe S., De Vuyst L., Leroy F.: Antibacterial activities of coagulase-negative staphylococci from bovine teat apex skin and their inhibitory effect on mastitis-related pathogens. *J Appl Microbiol*, 2014, **116**, 1084-1093.

Brambilla L.Z.S., Endo E.H, Cortez D.A.G, Dias Filho B.P.: Anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA of neolignans and extract of *Piper regnellii*. *Rev Bras Farmacogn*, 2017, **27**, 112-117.

Britten A.M.: The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2012, **28**, 187-202.

Brito M. A., Somkuti G. A., Renye Jr. J. A.: Production of antilisterial bacteriocins by staphylococci isolated from bovine milk. *J Dairy Sci*, 2011, **94**, 194-200.

Brouillette E., Malouin F.: The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes Infect*, 2005, **7**, 560-568.

Brown L., Wolf J.M., Prados-Rosales R., Casadevall A.: Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol*, 2015, **13**, 620-630.

Butterworth A., Reeves N.A., Harbour D., Werrett G., Kestin S.C.: Molecular typing of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bone and joint lesions in lame broilers by random amplification of polymorphic DNA. *Poult Sci*, 2001, **80**, 1339-1343.

Bush L.M., Calmon J., Johnson C.C.: Newer penicillins and beta-lactamase inhibitors. *Infect Dis Clin North Am*, 1995, **9**, 653-686.

Cain C.L.: Antimicrobial resistance in staphylococci in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2013, **43**, 19-40.

Cameron M., Barkema H.W., De Buck J., De Vliegher S., Chaffer M., Lewis J., Keefe G.P.: Identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a direct transfer protocol. *J Dairy Sci*, 2017, **100**, 2137-2147.

Cameron M., Perry J., Middleton J.R., Chaffer M., Lewis J., Keefe G.P.: Short communication: Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and a custom reference spectra expanded database for the identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci*, 2018, **101**, 590-595.

Cangemi de Gutierrez R., Santos V., Nader-Macías M.E.: Protective effect of intranasally inoculated *Lactobacillus fermentum* against *Streptococcus pneumoniae* challenge on the mouse respiratory tract. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2001, **31**, 187-195.

Cao L.T., Wu J.Q., Xie F., Hu S.H., Mo Y.: Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 2007, **90**, 3980-3985.

Carbonnelle E., Beretti J.L., Cottyn S., Quesne G., Berche P., Nassif X., Ferroni A.: Rapid identification of *Staphylococci* isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 2007, **45**, 2156-2161.

Catry B., Van Duijkeren E., Pomba M.C., Greko C., Moreno M.A., Pyörälä S., Ruzauskas M., Sanders P., Threlfall E.J., Ungemach F., Törneke K., Munoz-Madero C., Torren-Edo J.; Scientific Advisory Group on Antimicrobials (SAGAM): Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiol Infect*, 2010, **138**, 626-644.

Ceotto H., Holo H., da Costa K.F., Nascimento Jdos S., Salehian Z., Nes I.F., Bastos Mdo C.: Nukacin 3299, a lantibiotic produced by *Staphylococcus simulans* 3299 identical to nukacin ISK-1. *Vet Microbiol*, 2010, **146**, 124-131.

Ceri H., Olson M.E., Turner R.J.: Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opin Pharmacother*, 2010,**11**, 1233-1237.

Chalasanani A.G., Roy U., Nema S.: Purification and characterisation of a novel antistaphylococcal peptide (ASP-1) from *Bacillus* sp. URID 12.1. *Int J Antimicrob Agents*, 2018, **51**, 89-97.

Chambers J.R., Sauer K.: Small RNAs and their role in biofilm formation. *Trends Microbiol*, 2013, **21**, 39-49.

Chen X., Liang H., Zhang J., Zen K., Zhang C.Y.: Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell*, 2012, **3**, 28-37.

Chu C., Wei Y., Chuang S.T., Yu C., Changchien C.H., Su Y.: Differences in virulence genes and genome patterns of mastitis-associated *Staphylococcus aureus* among goat, cow, and human isolates in Taiwan. *Foodborne Pathog Dis*, 2013, **10**, 256-262.

Chung P.Y., Toh Y.S.: Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathog Dis*, 2014, **70**, 231-239.

Chusri S., Tongrod S., Saising J., Mordmuang A., Limsuwan S., Sanpinit S., Voravuthikunchai S. P.: Antibacterial and anti-biofilm effects of a polyherbal formula and its constituents against coagulase-negative and -positive staphylococci isolated from bovine mastitis. *J Appl Anim Res*, 2016, **45**, 364-372.

Condas L.A.Z., De Buck J., Nobrega D.B., Carson D.A., Naushad S., De Vliegher S., Zadoks R.N., Middleton J.R., Dufour S., Kastelic J.P., Barkema H.W.: Prevalence of non-aureus staphylococci species causing intramammary infections in Canadian dairy herds. *J Dairy Sci*, 2017, **100**, 5592-5612.

Costa E.M., Silva S., Vicente S., Neto C., Castro P.M., Veiga M., Madureira R., Tavarina F., Pintado M.M.: Chitosan nanoparticles as alternative anti-staphylococci agents: Bactericidal, antibiofilm and antiadhesive effects. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, **79**, 221-226.

Costa G.A., Rossatto F.C.P., Medeiros A.W., Correa A.P.F., Brandelli A., Frazzon A.P.G., Motta A.S.D.: Evaluation antibacterial and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P34 against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *An Acad Bras Cienc*, 2018, **90**, 73-84.

Cuevas O., Cercenado E., Vindel A., Guinea J., Sánchez-Conde M., Sánchez-Somolinos M., Bouza E.: Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, **48**, 4240-4245.

Cuny C., Friedrich A., Kozytska S., Layer F., Nübel U., Ohlsen K., Strommenger B., Walther B., Wieler L., Witte W.: Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int J Med Microbiol*, 2010, **300**, 109-117.

Da F., Joo H.S., Cheung G.Y.C., Villaruz A.E., Rohde H., Luo X., Otto M.: Phenol-Soluble Modulin Toxins of *Staphylococcus haemolyticus*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, **7**, 206.

DANMAP: Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark, 2001. Available at: http://www.danmap.org/pdfFiles/Danmap_2001.pdf

Das M.C., Paul S., Gupta P., Tribedi P., Sarkar S., Manna D., Bhattacharjee S.: 3-Amino-4-aminoximidofurazan derivatives: small molecules possessing antimicrobial and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol*, 2016, **120**, 842-59.

Delgado S., García P., Fernández L., Jiménez E., Rodríguez-Baños M., del Campo R., Rodríguez J.M.: Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. FEMS Immunol Med Microbiol, 2011, **62**, 225-235.

De Vliegher S., Fox L.K., Piepers S., McDougall S., Barkema H.W.: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. J Dairy Sci, 2012, **95**, 1025-1040.

Des Côteaux L., La médecine des troupeaux laitiers d'hier à aujourd'hui et une projection des défis qui nous attendent au cours des prochaines années. Communication personnelle. 2015.

Dohoo I.R., Leslie K.E.: Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. Prev Vet Med, 1991, **10**, 225-237.

dos Santos Nascimento J., Fagundes P.C., de Paiva Brito M.A., dos Santos K.R., do Carmo de Freire Bastos M.: Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. Vet Microbiol, 2005, **106**, 61-71.

dos Santos Rodrigues J.B., Bezerra dos Santos Rodrigues J., de Carvalho R.J., de Souza N.T., de Sousa Oliveira K., Franco O.L., Schaffner D., de Souza E.L., Magnani M.: Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. Food Control, 2017, **73**, 1237-1246.

Duarte A.F.S., Ceotto-Vigoder H., Barrias ES., Souto-Pradón T.C.BS., Nes I.F., Bastos M.D.C.F.: Hyicin 4244, the first sactibiotic described in staphylococci, exhibits an anti-staphylococcal biofilm activity. Int J Antimicrob Agents, 2018, **51**, 349-356.

Dufour S., Dohoo I.R., Barkema H.W., Descôteaux L., Devries T.J., Reyher K.K., Roy J.P., Scholl D.T.: Epidemiology of coagulase-negative staphylococci intramammary infection in dairy cattle and the effect of bacteriological culture misclassification. J Dairy Sci, 2012a, **95**, 3110-3124.

Dufour S., Dohoo I.R., Barkema H.W., Descôteaux L., Devries T.J., Reyher K.K., Roy J.P., Scholl D.T.: Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. J Dairy Sci, 2012b, **95**, 1283-1300.

El-Sayed A., Awad W., Abdou N.E., Castañeda Vázquez H.: Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens. Int J Vet Sci Med, 2017, **5**, 89-97.

Eriksson S., van der Plas M.J.A., Mörgelin M., Sonesson A.: Antibacterial and antibiofilm effects of sodium hypochlorite against *Staphylococcus aureus* isolates derived from patients with atopic dermatitis. Br J Dermatol, 2017, **177**, 513-521.

Erskine R.J.: Vaccination strategies for mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2012, **28**, 257-270.

e Silva S.S., Carvalho J.W.P, Aires C.P, Nitschke M.: Disruption of *Staphylococcus aureus* biofilms using rhamnolipid biosurfactants. J Dairy Sci, 2017, **100**, 7864-7873.

Fairbrother J.M., Nadeau E.: Colibacillosis. In Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R., Uilenberg G.: Infectious and Parasitic Diseases of Livestock, Lavoisier, Paris, 2010, 917-945.

Fazakerley J., Nuttall T., Sales D., Schmidt V., Carter S.D., Hart C.A., McEwan N.A.: Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. Vet Dermatol, 2009, **20**, 179-184.

Federman C., Joo J., Almario J.A., Salaheen S., Biswas D.: Citrus-derived oil inhibits *Staphylococcus aureus* growth and alters its interactions with bovine mammary cells. J Dairy Sci, 2016, **99**, 3667-3674.

Federman, C., Ma C., Biswas D.: Major components of orange oil inhibit *Staphylococcus aureus* growth and biofilm formation and alter its virulence factors. J Med Microbiol, 2016, **65**, 688-95.

Fox L.K., Kirk J.H., Britten A.: *Mycoplasma* mastitis: a review of transmission and control. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2005, **52**, 153-160.

Francoz D., Wellemans V., Dupré J.P., Roy J.P., Labelle F., Lacasse P., Dufour S.: Invited review: A systematic review and qualitative analysis of treatments other than conventional antimicrobials for clinical mastitis in dairy cows. J Dairy Sci, 2017, **100**, 7751-7770.

Fratini F., Casella S., Leonardi M., Pisseri F., Ebani V.V., Pistelli L., Pistelli L.: Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. Fitoterapia, 2014, **96**, 1-7.

Fry P.R., Middleton J.R., Dufour S., Perry J., Scholl D., Dohoo I.: Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. J Dairy Sci, 2014, **97**, 4876-4885.

Galié S., García-Gutiérrez C., Miguélez E.M., Villar C.J., Lombó F.: Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. Front Microbiol, 2018, **9**

Gao, Y., Mai B., Wang A., Li M., Wang X., Zhang K., Liu Q., Wei S., Wang P.: Antimicrobial properties of a new type of photosensitizer derived from phthalocyanine against planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus aureus*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2018, **21**, 316-326.

Gardete S., Tomasz A.: Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest, 2014, **124**, 2836-2840.

Gaudreau A.M., Labrie J., Goetz C., Dufour S. and Jacques M.: Evaluation of MALDI-TOF for the identification of bacteria growing as biofilms. J Microbiol Methods, 2018, **145**, 79-81.

Gillespie B.E., Oliver S.P.: Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. J Dairy Sci, 2005, **88**, 3510-3518.

Goetz C., Dufour S., Archambault M., Malouin F. et Jacques M.: Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière: une revue bibliographique. Revue Méd Vét, 2016, **167**, 7-8, 215-229.

Gordon R.J., Lowy F.D.: Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis, 2008, **46**, 350-359.

Gowrishankar, S., Pandian S.K.: Modulation of *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) extracellular polymeric layer by marine cyclic dipeptide-cyclo(l-leucyl-l-prolyl) thwarts biofilm formation. Biochim Biophys Acta, 2017, **1859**, 1254-1262.

Guo N., Zhao X., Li W., Shi C., Meng R., Liu Z., Yu L.: The synergy of berberine chloride and totarol against *Staphylococcus aureus* grown in planktonic and biofilm cultures. J Med Microbiol, 2015, **64**, 891-900.

Halasa T., Huijps K., Østerås O., Hogeveen H.: Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. Vet Q, 2007, **29**, 18-31.

Heng, N.C.K. and Tagg, J.R.: What's in a name? Class distinction for bacteriocins. Nat Rev Microbiol, 2006, **4**.

Hogan J.S., Weiss W.P., Smith K.L., Todhunter D.A., Schoenberger P.S., Sordillo L.M.: Effects of an *Escherichia coli* J5 vaccine on mild clinical coliform mastitis. J Dairy Sci, 1995, **78**, 285-290.

Hogan S., Stevens N.T., Humphreys H., O'Gara J.P., O'Neill E.: Current and future approaches to the prevention and treatment of staphylococcal medical device-related infections. Curr Pharm Des, 2015, **21**, 100-113.

Hogan S., Zapotoczna M., Stevens N.T., Humphreys H., O'Gara J.P., O'Neill E.: Potential use of targeted enzymatic agents in the treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm-related infections. J Hosp Infect, 2017, **96**, 177-182.

Huebner J., Goldmann D.A.: Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. Annu Rev Med, 1999, **50**, 223-36.

Jacques M., Aragon V., Tremblay Y.D.: Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. Anim Health Res Rev, 2010, **11**, 97-121.

Kamaruzzaman, N.F., Chong S.Q.Y., Edmondson-Brown K.M., Ntow-Boahene W., Bardiau M., Good L.: Bactericidal and anti-biofilm effects of polyhexamethylene Biguanide in models of intracellular and biofilm of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Front Microbiol, 2017, **8**, 1518.

Keefe G.P.: *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. Can Vet J, 1997, **38**, 429-437.

Khan A.K., Ahmed A., Hussain M., Khan I.A., Ali S.A., Farooq A.D., Faizi S.: Antibiofilm potential of 16-oxo-cleroda-3, 13(14) E-diene-15 oic acid and its five new gamma-amino gamma-lactone derivatives against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. Eur J Med Chem, 2017, **138**, 480-490.

Khanal, M., Raks V., Issa R., Chernyshenko V., Barras A., Garcia Fernandez J.M., Mikhalovska L.I., Turcheniuk V., Zaitsev V., Boukherroub R., Siriwardena A., Cooper I.R., Cragg P.J., Szunerits S.: Selective antimicrobial and antibiofilm disrupting properties of functionalized diamond nanoparticles against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Part Part Syst Char, 2015, **32**, 822-830.

Klaenhammer T.R.: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie, 1988,**70**, 337-349.

Klein K., Grønnemose R.B., Alm M., Brinch K.S, Kolmos H.J, Andersen T.E.: Controlled release of plectasin nz2114 from a hybrid silicone-hydrogel material for inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm. Antimicrob Agents Chemother, 2017, **61**, e00604-17.

Kliem M., Sauer S.: The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol*, 2012, **15**, 397-402.

Kloos W.E., Bannerman T.L.: *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C. et Yolken R.H.: *Manual of clinical microbiology*. Sixth edition, ASM Press, Washington, 1995, 282-298.

Klostermann K., Crispie F., Flynn J., Ross R. P., Hill C., Meaney W.: Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: Comparison with antibiotic treatment in field trials. *J Dairy Res*, 2008, **75**, 365-373.

Koeppen K., Hampton T.H., Jarek M., Scharfe M., Gerber S.A., Mielcarz D.W., Demers E.G., Dolben E.L., Hammond J.H., Hogan D.A., Stanton B.A.: A novel mechanism of host-pathogen interaction through sRNA in bacterial outer membrane vesicles. *PLoS Pathog*, 2016, **12**, e1005672.

Koksal F., Yasar H., Samasti M.: Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiol Res*, 2009, **164**, 404-410.

Lam T.J.G.M., Olde Riekerink R.G.M., Sampimon O.C., Smith H.: Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach. *Ir Vet J*, 2009, **62**, S34–S39.

Lamas A., Regal P., Vázquez B., Miranda J.M., Cepeda A., Franco C.M.: *Salmonella* and *Campylobacter* biofilm formation: a comparative assessment from farm to fork. *J Sci Food Agric*, 2018, **98**, 4014-4032.

Larsson A, Sjöquist J.: Novel latex agglutination method with chicken anti-protein A for detection of *Staphylococcus aureus* infections. *J Clin Microbiol*, 1989, **27**, 2856-2857.

Lee J.-H., Kim Y.-G., Park J.G., Lee J.: Supercritical fluid extracts of *Moringa oleifera* and their unsaturated fatty acid components inhibit biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. Food Control, 2017, **80**, 74-82.

Le Loir Y., Baron F., Gautier M.: *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res, 2003, **2**, 63-76.

Lévesque P. : La classification des mammites. Le producteur de lait québécois, 2006, 30-33.

Li H., Goh B.N, Teh W.K., Jiang Z., Goh J.P.Z., Goh A., Wu G., Hoon S.S., Raida M., Camattari A., Yang L., O'Donoghue A.J., Dawson T.L. Jr. : Skin commensal *Malassezia globosa* secreted protease attenuates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. J Invest Dermatol, 2017, S0022-202X, 33276-1.

Liu M., Wu X., Li J., Liu L., Zhang R., Shao D., Du X.: The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *ica* operon. Food Control, 2017, **73**, 613-618.

Livermore D.M.: beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev, 1995, **8**, 557-584.

Lopes L.A.A., Dos Santos Rodrigues J.B., Magnani M., de Souza E.L., de Siqueira-Júnior J.P.: Inhibitory effects of flavonoids on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* that overexpresses efflux protein genes. Microb Pathog, 2017, **107**, 193-197.

Mack D., Haeder M., Siemssen N., Laufs R.: Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. J Infect Dis, 1996, 174, 881-884.

MacLeod, G.: The treatment of cattle by homeopathy, 148 pages, Health Science Press, Saffron Walden, Essex, Royaume-Uni, 1981.

Mannala G.K., Koettnitz J., Mohamed W., Sommer U., Lips K.S., Spröer C., Bunk B., Overmann J., Hain T., Heiss C., Domann E., Alt V.: Whole-genome comparison of high and low virulent *Staphylococcus aureus* isolates inducing implant-associated bone infections. *Int J Med Microbiol*, 2018, **308**, 505-513.

MARAN: Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2004, 2004. Available at: <http://www.cidc-lelystad.wur.nl/UK/publications/>

MARAN: Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2005, 2005. Available at: <http://www.cidc-lelystad.wur.nl/UK/publications/>

Mataraci E., Dosler S.: *In vitro* activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, **56**, 6366-6371.

McCarron J.L., Keefe G.P., McKenna S.L., Dohoo I.R., Poole D.E.: Laboratory evaluation of 3M Petrifilms and University of Minnesota Bi-plates as potential on-farm tests for clinical mastitis. *J Dairy Sci*, 2009, **92**, 2297-2305.

Melchior M.B.: Bovine mastitis and biofilms. In Percival SL (éd), Knottenbelt D.C. (éd), Cochrane C.A. (éd): *Biofilms and veterinary medicine*, Springer, Heidelberg, 2011, 205-222.

Melo T.A., Dos Santos T.F., de Almeida M.E., Junior L.A., Andrade E.F., Rezende R.P., Marques L.M., Romano C.C.: Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. *BMC Microbiol*, 2016, **16**, 250.

Merck: Antibacterial agents: Penicillins. In *The Merck veterinary manual*, ninth edition, Merck & CO, INC, Whitehouse station, 2005, 2056-2061.

Ministère de la Pêche, de l'Agriculture et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) : Règlement des producteurs de lait sur le programme Lait canadien de qualité. Loi sur la mise en marché des produits agricoles, alimentaires et de la pêche, 2014, 92-98.

Molina-Manso, D., Del-Prado G., Gómez-Barrena E., Cordero-Ampuero J., Fernandez-Roblas R., Esteban J.: Effect of different agents with potential antibiofilm activity on antimicrobial susceptibility of biofilms formed by *Staphylococcus* spp. isolated from implant-related infections. *J Antibiot*, 2016, **69**, 686-688.

Nair S., Desai S., Poonacha N., Vipra A., Sharma U.: Antibiofilm activity and synergistic inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilms by bactericidal protein P128 in combination with antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, **60**, 7280-7289.

Naushad S., Barkema H.W., Luby C., Condas L.A., Nobrega D.B., Carson D.A., De Buck J.: Comprehensive Phylogenetic Analysis of Bovine Non-*aureus* Staphylococci Species Based on Whole-Genome Sequencing. *Front Microbiol*, 2016, **20**, 1990.

Neave F.K., Dodd F.H., Kingwill R.G., Westgarth D.R.: Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *J Dairy Sci*, 1969, **52**, 696-707.

NMC National Mastitis Council: Recommended Mastitis Control Program. National Mastitis Council Inc., 2009. Madison, WI. <http://www.nmconline.org>

NORM-VET: Usage of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway, 2006. Available at:

http://www.vetinst.no/Arkiv/Zoonosesenteret/NORM_NORM-VET_2005.pdf

Oja T., San Martin Galindo P., Taguchi T., Manner S., Vuorela P.M., Ichinose K., Metsä-Ketelä M., Fallarero A.: Effective antibiofilm polyketides against *Staphylococcus aureus* from the pyranonaphthoquinone biosynthetic pathways of *Streptomyces* species. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, **59**, 6046-6052.

Okerman L., Devriese L.A., Maertens L., Okerman F., Godard C.: Cutaneous staphylococcosis in rabbits. *Vet Rec*, 1984, **114**, 313-315.

Olde Riekerink R.G., Barkema H.W., Kelton D.F., Scholl D.T.: Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci*, 2008, **91**, 1366-77.

Oliver S.P., Murinda S.E.: Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2012, **28**, 165-185.

Olson M.E., Ceri H., Morck D.W., Buret A.G, Read R.R.: Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res*, 2002, **66**, 86-92.

Otto M.: Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol*, 2012, **34**, 201-214.

Otto M.: Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med*, 2013, **64**, 175-188.

Paterson G.K., Harrison E.M., Holmes M.A.: The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 2014, **22**, 42-47.

Perdigón G., de Macias M.E., Alvarez S., Oliver G., de Ruiz Holgado A.A.: Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect Immun*, 1986, **53**, 404-410.

Perdigón G., de Macias M.E., Alvarez S., Oliver G., de Ruiz Holgado A.P.: Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology*, 1988, **63**, 17-23.

Peton V., Le Loir Y.: *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect Genet Evol*, 2014, **21**, 602-615.

Phuong N.T.M., Van Quang N., Mai T.T., Anh N.V., Kuhakarn C., Reutrakul V., Bolhuis A.: Antibiofilm activity of alpha-mangostin extracted from *Garcinia mangostana* L. against *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Med*, 2017, **10**, 1154-1160.

Picoli T., Peter C.M., Zani J.L., Waller S.B., Lopes M.G., Boesche K.N., Vargas G.D.Á., Hübner S.O., Fischer G.: Melittin and its potential in the destruction and inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine milk. *Microb Pathog*, 2017, **112**, 57-62.

Piessens V., Van Coillie E., Verbist B., Supré K., Braem G., Van Nuffel A., De Vuyst L., Heyndrickx M., De Vliegher S.: Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *J Dairy Sci*, 2011, **94**, 2933-2944.

Piette A., Verschraegen G.: Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol*, 2009, **134**, 45-54.

Pitkälä A., Haveri M., Pyörälä S., Mylly V., Honkanen-Buzalski T.: Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci*, 2004, **87**, 2433-2441.

Powell L.C., Pritchard M.F., Ferguson E.L., Powell K.A., Patel S.U., Rye P.D., Sakellakou S.M., Buurma N.J., Brilliant C.D., Copping J.M., Menzies G.E., Lewis P.D., Hill K.E., Thomas D.W.: Targeted disruption of the extracellular polymeric network of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by alginate oligosaccharides. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2018, **4**.

Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A.: *Microbiology*. second edition, 1014 pages, W.C. Brown Publishers, Washington DC, 1993.

Pyörälä S., Taponen S.: Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol*, 2009, **134**, 3-8.

Ravat F., Jault P., Gabard J.: Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Ann Burns Fire Disasters*, 2015, **28**, 13-20.

Reyher K., Dohoo I. et Scholl D. : Les bactéries de la mammite. Le producteur de lait québécois, 2010, 38-40.

Reyher K.K., Dufour S., Barkema H.W., Des Côteaux L., Devries T.J., Dohoo I.R., Keefe G.P., Roy J.P., Scholl D.T.: The National Cohort of Dairy Farms-a data collection platform for mastitis research in Canada. *J Dairy Sci*, 2011, **94**, 1616-1626.

Reyher K.K., Haine D., Dohoo I.R., Revie C.W.: Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens--a systematic review and meta-analysis. *J Dairy Sci*, 2012, **95**, 6483-6502.

Riool M., Riool M., de Breij A., de Boer L., Kwakman P.H.S., Cordfunke R.A., Cohen O., Malanovic N., Emanuel N., Lohner K., Drijfhout J.W., Nibbering P.H., Zaat S.A.J.: Controlled release of LL-37-derived synthetic antimicrobial and anti-biofilm peptides SAAP-145 and SAAP-276 prevents experimental biomaterial-associated *Staphylococcus aureus* infection. *Adv Funct Mater*, 2017, **27**, 1-11.

Roberson J. R., Warnick L. D., Moore G.: Mild to moderate clinical mastitis: Efficacy of intramammary amoxicillin, frequent milk-out, a combined intramammary amoxicillin, and frequent milk-out treatment versus no treatment. *J Dairy Sci*, 2004, **87**, 583–592.

Rose-Martel M., Kulshreshtha G., Ahferom Berhane N., Jodoin J., Hincke M.T.: Histones from avian erythrocytes exhibit antibiofilm activity against methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*, 2017, **7**, 45980.

Rovai M., Caja G., Salama AA, Jubert A, Lázaro B, Lázaro M, Leitner G. Identifying the major bacteria causing intramammary infections in individual milk samples of sheep and goats using traditional bacteria culturing and real-time polymerase chain reaction. *J Dairy Sci*, 2014, **97**, 5393-5400.

Roy J.P., DesCôteaux L., DuTremblay D., Beaudry F., Elsener J.: Efficacy of a 5-day extended therapy program during lactation with cephalixin sodium in dairy cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. *Can Vet J*, 2009, **50**, 1257-1262.

Ruegg P.L., Erskine R.J., Morin D.E. Mammary gland health. Chapter 36. Large animals internal medicine. Fifth edition. 2014, 1015-1043

Rumbaugh, K.P., Ahmad I.: *Antibiofilm agents*. Springer Series on Biofilms. 2014.

Sardi J.C.O., Polaquini C.R., Freires I.A., Galvão L.C.C., Lazarini J.G., Torrezan G.S., Regasini L.O., Rosalen P.L.: Antibacterial activity of diacetylcurcumin against *Staphylococcus aureus* results in decreased biofilm and cellular adhesion. J Med Microbiol, 2017, **66**, 816-824.

Sharma G., Raturi K., Dang S., Gupta S., Gabrani R.: Inhibitory effect of cinnamaldehyde alone and in combination with thymol, eugenol and thymoquinone against *Staphylococcus epidermidis*. J Her Med, 2017, **9**, 68-73.

Saini V., McClure J.T., Léger D., Dufour S., Sheldon A.G., Scholl D.T., Barkema H.W.: Antimicrobial use on Canadian dairy farms. J Dairy Sci, 2012a, **95**, 1209-1221.

Saini V., McClure J.T., Léger D., Keefe G.P., Scholl D.T., Morck D.W., Barkema H.W.: Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. J Dairy Sci, 2012b, **8**, 4319-4332.

Sampimon O., Barkema H.W., Berends I., Sol J., Lam T.: Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. J Dairy Res, 2009, **76**, 129-136.

Sarkar P., Acharyya S., Banerjee A., Patra A., Thankamani K., Koley H., Bag PK.: Intracellular, biofilm-inhibitory and membrane-damaging activities of nimbolide isolated from *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) against meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol, 2016, **65**, 1205-1214.

Savage E., Chothe S., Lintner V., Pierre T., Matthews T., Kariyawasam S., Miller D., Tewari D., Jayarao B.: evaluation of three bacterial identification systems for species identification of bacteria isolated from bovine mastitis and bulk tank milk samples. Foodborne Pathog Dis, 2017, **14**, 177-187.

Schalm O.W., Noorlander D.O.: Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. J Am Vet Med Asso, 1957, **130**, 199-204.

Schuch R., Khan B.K., Raz A., Rotolo J.A., Wittekind M.: Bacteriophage lysin CF-301, a potent antistaphylococcal biofilm agent. Antimicrob Agents Chemother, 2017, **61**, e02666-16.

Schukken Y.H., Wilson D.J., Welcome F., Garrison-Tikofsky L., Gonzalez R.N.: Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. Vet Res, 2003, **34**, 579-596.

Schukken Y., Chuff M., Moroni P., Gurjar A., Santisteban C., Welcome F., Zadoks R.: The "other" gram-negative bacteria in mastitis: *Klebsiella*, *Serratia*, and more. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2012, **28**, 239-256.

Sharifi A., Mohammadzadeh A., Zahraei Salehi T., Mahmoodi P.: Antibacterial, antibiofilm and antiquorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. J Appl Microbiol, 2018, **124**, 379-388.

Shrestha L., Kayama S., Sasaki M., Kato F., Hisatsune J., Tsuruda K., Koizumi K., Tatsukawa N., Yu L., Takeda K., Sugai M.: Inhibitory effects of antibiofilm compound 1 against *Staphylococcus aureus* biofilms. Microbiol Immunol, 2016, **60**, 148-59.

Singleton P., Sainsbury D.: Dictionary of microbiology and molecular biology. 2nd edition. 1993, 839-841.

Soumya K.R., Philip S., Sugathan S., Mathew J., Radhakrishnan E.K.: Virulence factors associated with Coagulase Negative Staphylococci isolated from human infections. 3 Biotech, 2017, **7**, 140.

Ster C., Allard M., Boulanger S., Lamontagne Boulet M., Mulhbacher J., Lafontaine D.A., Marsault E., Lacasse P., Malouin F.: Experimental treatment of *Staphylococcus aureus* bovine intramammary infection using a guanine riboswitch ligand analog. J Dairy Sci, 2013, **96**, 1000-1008.

Supré K., Haesebrouck F., Zadoks R.N., Vaneechoutte M., Piepers S., De Vliegher S.: Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. J Dairy Sci, 2011, **94**, 2329-2340.

Sutra L., Poutrel B.: Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol, 1994, **40**, 79-89.

Svenningsen S.L.: Small RNA-Based Regulation of Bacterial Quorum Sensing and Biofilm Formation. Microbiol Spectr, 2018, 6.

Szczuka E., Jablonska L., Kaznowski A.: Coagulase-negative staphylococci: pathogenesis, occurrence of antibiotic resistance genes and in vitro effects of antimicrobial agents on biofilm-growing bacteria. J Med Microbiol, 2016, **65**, 1405-1413.

Szczuka E., Jablonska L., Kaznowski A.: Effect of subinhibitory concentrations of tigecycline and ciprofloxacin on the expression of biofilm-associated genes and biofilm structure of *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology, 2017, **163**, 712-718.

Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W.: Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol Rev, 1976, **40**, 722-756.

Taponen S., Pyörälä S.: Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- not so different from *Staphylococcus aureus*? Vet Microbiol, 2009, **134**, 29-36.

Teh K.H., Flint S., Brooks J. and Knight G.: Biofilms in dairy industry, 263 pages, Wiley Blackwell, Chichester, 2015.

Tenhagen B.A., Köster G., Wallmann J., Heuwieser W.: Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci*, 2006, **89**, 2542-2551.

Tenover F.C.: Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control*, 2006, **34**, S3-10.

Thomas R., Soumya K.R., Mathew J., Radhakrishnan E.K.: Inhibitory effect of silver nanoparticle fabricated urinary catheter on colonization efficiency of Coagulase Negative Staphylococci. *J Photochem Photobiol B*, 2015, **149**, 68-77.

Thomas R., Mathew S., Nayana A.R., Mathews J., Radhakrishnan E.K.: Microbially and phytofabricated AgNPs with different mode of bactericidal action were identified to have comparable potential for surface fabrication of central venous catheters to combat *Staphylococcus aureus* biofilm. *J Photochem Photobiol B*, 2017, **171**, 96-103.

Tomazi T., Gonçalves J.L., Barreiro J.R., de Campos Braga P.A., Prada e Silva L.F., Eberlin M.N., dos Santos M.V.: Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 2014, **52**, 1658-1663.

Tremblay Y.D., Lamarche D., Chever P., Haine D., Messier S., Jacques M.: Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J Dairy Sci*, 2013, **96**, 234-246.

Tsatsaronis J.A., Franch-Arroyo S., Resch U., Charpentier E.: Extracellular Vesicle RNA: A Universal Mediator of Microbial Communication? *Trends Microbiol*, 2018, **26**, 401-410.

Vacca D.D. et Walsh R.A.: The antibacterial activity of an extract obtained from *Ascophyllum nodosum*. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc*, 1954, **43**, 24-26.

Vahedi M., Hosseini-Jazani N., Yousefi S., Ghahremani M.: Evaluation of anti-bacterial effects of nickel nanoparticles on biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. Iran J Microbiol, 2017, **9**, 160-168.

Vanderhaeghen W., Hermans K., Haesebrouck F., Butaye P.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. Epidemiol Infect, 2010, **138**, 606-625.

Vanderhaeghen W., Piepers S., Leroy F., Van Coillie E., Haesebrouck F., De Vliegher S.: Invited review: effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. J Dairy Sci, 2014, **97**, 5275-5293.

Vanderhaeghen W., Piepers S., Leroy F., Van Coillie E., Haesebrouck F., De Vliegher S.: Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. Vet J, 2015, **203**, 44-51.

Viguiet C., Arora S., Gilmartin N., Welbeck K., O'Kennedy R.: Mastitis detection: current trends and future perspectives. Trends Biotechnol, 2009, **27**, 486-493.

Wallace J.: Diagnostiquer la mammité. Le producteur de lait québécois, 2007, 47-49.

Wang J., Nong X.H., Zhang X.Y., Xu X.Y., Amin M., Qi S.H.: Screening of anti-biofilm compounds from marine-derived fungi and the effects of secalonic acid D on *Staphylococcus aureus* biofilm. J Microbiol Biotechnol, 2017, **27**, 1078-1089.

Weese, J.S.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. ILAR journal, 2010, **51**, 233-244.

Xu J.G., Liu T., Hu Q.P., Cao X.M.: Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. Molecules, 2016, **21**, e1194.

Yassin A.F., Hupfer H., Siering C., Schumann P.: Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1982 emend. Lehnert et al. 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. Int J Syst Evol Microbiol, 2011, **61**, 1265-1274.

Zadoks R.N., Middleton J.R., McDougall S., Katholm J., Schukken Y.H.: Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2011, **16**, 357-372.

Zhao X., Lacasse P.: Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. J Anim Sci, 2008, **86**, 57-65.

Zhen Y.H., Jin L.J., Li X.Y., Guo J., Li Z., Zhang B.J., Fang R., Xu Y.P. : Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. Vet Microbiol, 2009, **133**, 317-322.

ANNEXES

Annexe 1

Article publié en février 2018 dans Journal of Microbiological Methods

145, 79-81.

Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of bacteria growing as biofilms

A.M. Gaudreau^{1,2}, J. Labrie^{1,2}, C. Goetz^{1,2}, S. Dufour², and M. Jacques^{1,2*}

¹Groupe de recherche sur les maladies infectieuses en production animale (GREMIP)

²Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale (Op+Lait)

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,

St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2

Implication de l'auteur dans l'article:

Je suis co-auteur de l'article. J'ai notamment contribué à l'élaboration des expériences se rapportant à la formation de biofilms par les différentes espèces bactériennes et mis à disposition la plupart des souches utilisées dans cet article.

Abstract

We evaluated MALDI-TOF mass spectrometry to identify bacteria from biofilms. We compared three sample preparation procedures on biofilms grown *in vitro*. The extended direct transfer method was able to identify 13 isolates out of 18 (72%) at the species level and 15 out of 18 (83%) at the genus level.

Keywords : biofilm, identification, MALDI-TOF MS

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) has become a robust tool for microbial identification (Angeletti 2017; Singhal et al., 2015). Bacterial protein profiles obtained from intact cells or cell extracts are compared to a database of bacterial reference mass spectra for rapid identification at the genus, species and, in some cases, the subspecies level (Kliem and Sauer, 2012). The identification is typically done from fresh cultures on agar plates. The purpose of this study was to evaluate the potential of MALDI-TOF MS to identify bacteria from biofilms. Bacterial biofilms are structured clusters of bacterial cells enclosed in a self-produced polymer matrix that are attached to a biotic or abiotic surface (Costerton et al., 1999; Jacques et al., 2010). This structure protects bacteria from hostile environmental conditions. Bacteria within a biofilm can resist attack from the host immune response, and are less sensitive than planktonic cells to the action of antibiotics and disinfectants.

Various Gram-negative and Gram-positive veterinary pathogens used in previous studies by our group and known to produce biofilms *in vitro* are listed in Table 1. We first confirmed correct identification of these bacterial pathogens with the MALDI Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) equipped with the Galaxy automated target preparation system (Bruker) using overnight cultures on agar plates (Table 1). Identification from agar plates was done, in duplicates, by the extended direct transfer procedure (see below). All targets were calibrated using the Bruker IVD Bacterial Test Standard (Bruker #8290190) and the manufacturer's reference database library (MBT-Version 6- RUO 6903) was used. All bacterial isolates were above the manufacturer's cutoff of 2.0 required for a confident species-level identification, except for three coagulase-negative staphylococci (CNS) isolates. However, Cameron et al. (2017) recently

showed that reduction of the cutoff to ≥ 1.7 for species-level identification resulted in an improved typeability for CNS without reducing accuracy, in agreement with our results.

We then compared three sample preparation procedures, recommended by the manufacturer, on biofilms grown in microtiter plates. The three sample preparation procedures were: 1) direct transfer with deposition of 1 μl of matrix (10 mg α -cyano-4-hydroxycinnamic acid per ml of 50% acetonitrile, 47.5% water and 2.5% trifluoroacetic acid); 2) extended direct transfer with deposition of 1 μl of formic acid 70% and 1 μl of matrix; 3) tube extraction with ethanol, formic acid 70%, acetonitrile 100% and deposition of 1 μl of matrix (Bruker MBT Compass IVD Manuel utilisateur, Révision B, novembre 2016). Growth conditions to obtain mature biofilms for the assay are summarized in Table 1. Briefly, overnight bacterial cultures were diluted 1/100 or adjusted to a 0.5 McFarland standard in their corresponding broth and a volume (200 μL) was aliquoted in triplicate in a flat-bottom 96-well polystyrene plate and incubated at 30°C or 37°C (Tremblay et al., 2013; Wu et al., 2013). After a 24-h or 48-h incubation, the liquid medium was removed using a vacuum and the planktonic cells were removed by washing the wells thrice with phosphate-buffered saline (PBS). Bacterial biofilms present at the bottom of microtiter plates were scraped with an Eppendorf pipet tip and processed with each of these three procedures. Analyses were done in duplicates (i.e. on two independent days with different biofilm samples each time); a third independent replicate was done if divergent results were obtained after the first two analyses. Measure of agreement (Cohen kappa) between the standard agar plate extended direct transfer method and each of the sample preparation method conducted on biofilms were computed. For these, we only considered results with the same species-level identification as an agreement; results with same genus, but different species or with only a genus-level identification for one of the method were

considered as a disagreement between methods. Furthermore, we computed measures of agreement when using a score ≥ 1.7 for secure species-identification and also when using a score of ≥ 2.0 .

Our results indicate that the direct transfer procedure is not appropriate for biofilm samples as only 10 out of 18 (55%) bacterial species were correctly identified with 7 out of the 10 with a high level of confidence (i.e. scores between 2.0 and 3.0) (Table 2). The tube extraction method was slightly better and able to identify 11 isolates out of the 18 (61%) at the species level and 12 out of 18 (67%) at the genus level. However, the extended direct transfer method was able to identify 13 isolates out of the 18 (72%) at the species level and 15 out of 18 (83%) at the genus level, and with a high level of confidence for 13 of them. Scores of 0 could be due to biofilm samples that did not contain a sufficient amount of bacterial cells to generate a mass spectrum. Measures of agreement for the different methods are presented in Table 3. The extended direct transfer method yielded the highest agreement measure with a kappa of 0.55 (95% CI: 0.38, 0.72) indicating fair to substantial agreement between extended direct transfer of biofilm samples and standard agar plate extended direct transfer method.

MALDI-TOF has been used to analyze the molecular profile of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on glass and plastic surfaces at different stages of biofilm development (Pereira et al., 2015). This technology has also been used to image *Bacillus subtilis* biofilms (colonies) on agar and determine the spatial distribution of specific peptides and lipopeptides (Li et al., 2016). To the best of our knowledge this is the first report demonstrating that the MALDI Biotyper can be used to identify a bacterial species in samples prepared from a biofilm. The presence of the biofilm matrix, usually composed of polysaccharides, and/or proteins, and/or extracellular DNA, does not seem, with most of

the bacterial species tested, to interfere with the analysis when the extended direct transfer method is used.

This work was supported by Discovery grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to MJ and SD, and by a grant from the Dairy Research Cluster II (Dairy Farmers of Canada, Agriculture and Agri-Food Canada, Canadian Dairy Network, Canadian Dairy Commission) through the Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network to MJ and SD. The Bruker Biotyper was purchased through a John R. Evans Leaders Fund from the Canadian Foundation for Innovation to SD. AMG and CG are the recipient of a NSERC-CREATE in milk quality scholarship. We thank Serge Messier and Jonathan Massé for their help with the MALDI-TOF.

We have no conflicts of interest to declare.

References

- Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods* 2017;138:20-29. [https://doi: 10.1016/j.mimet.2016.09.003](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003).
- Bello-Ortí B, Deslandes V, Tremblay YD, Labrie J, Howell KJ, Tucker AW, Maskell DJ, Aragon V, Jacques M. Biofilm formation by virulent and non-virulent strains of *Haemophilus parasuis*. *Vet Res* 2014;45:104. [https://doi: 10.1186/s13567-014-0104-9](https://doi.org/10.1186/s13567-014-0104-9).
- Cameron M, Barkema HW, De Buck J, De Vliegher S, Chaffer M, Lewis J, Keefe GP. Identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using direct transfer protocol. *J Dairy Sci* 2017;100(3):2137-2147. [https://doi: 10.3168/jds.2016-12020](https://doi.org/10.3168/jds.2016-12020).
- Cherifi T, Jacques M, Quessy S, Fravallo P. Impact of nutrient restriction on the structure of *Listeria monocytogenes* biofilm grown in a microfluidic system. *Front Microbiol* 2017; 8:864. [https://doi: 10.3389/fmicb.2017.00864](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00864).
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-1322.
- Jacques M, Aragon V, Tremblay YD. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim Health Res Rev* 2010;11:97-121. [https://doi: 10.1017/S1466252310000149](https://doi.org/10.1017/S1466252310000149).
- Kliem M, Sauer S. The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol* 2012;15:397-402. [https://doi: 10.1016/j.mib.2012.02.006](https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.02.006).

- Labrie J, Pelletier-Jacques G, Deslandes V, Ramjeet M, Auger E, Nash JH, Jacques M. Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Res* 2010;41:3. [https://doi: 10.1051/vetres/2009051](https://doi.org/10.1051/vetres/2009051).
- Li B, Comi TJ, Si T, Dunham SJ, Sweedler JV. A one-step matrix application method for MALDI mass spectrometry imaging of bacterial colony biofilms. *J Mass Spectrom* 2016;51:1030-1035. [https://doi: 10.1002/jms.3827](https://doi.org/10.1002/jms.3827).
- Pereira FD, Bonatto CC, Lopes CA, Pereira AL, Silva LP. Use of MALDI-TOF mass spectrometry to analyze the molecular profile of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on glass and plastic surfaces. *Microb Pathog* 2015;86:32-37. [https://doi: 10.1016/j.micpath.2015.07.005](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.07.005).
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 2015;6:791. [https://doi: 10.3389/fmicb.2015.00791](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791).
- Tremblay YD, Lamarche D, Chever P, Haine D, Messier S, Jacques M. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J Dairy Sci* 2013;96:234-46. [https://doi: 10.3168/jds.2012-5795](https://doi.org/10.3168/jds.2012-5795).
- Wu C, Labrie J, Tremblay YD, Haine D, Mourez M, Jacques M. Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol* 2013;115:30-40. [https://doi: 10.1111/jam.12197](https://doi.org/10.1111/jam.12197).

Table 1. Bacterial isolates used in the present study, their identification scores by MALDI-TOF MS and protocols for biofilm formation in microtiter plates.

Bacterial species	Identification score obtained by MALDI-TOF^{g,h}	Protocols for biofilm formation
Gram negative		
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> S4074 ^a	2.04	Labrie et al., 2010
<i>Escherichia coli</i> 3110-0908 ^b	2.42	Wu et al., 2013
<i>Haemophilus parasuis</i> F9 ^c	2.09	Bello-Orti et al., 2014
<i>Klebsiella oxytoca</i> 1130-8317 ^b	2.23	As for <i>E. coli</i> (Wu et al., 2013) but with growth in BHI at 37°C
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1021-4985 ^b	2.23	As for <i>E. coli</i> (Wu et al., 2013) but with growth in BHI at 37°C
<i>Salmonella</i> Heidelberg STF08-453 ^d	2.37 (<i>Salmonella sp</i>)	Wu et al., 2013
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC14028 ^d	2.12 (<i>Salmonella sp</i>)	Wu et al., 2013
Gram positive		
<i>Listeria monocytogenes</i> 3C15 ^e	2.24	Cherifi et al., 2017
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 1081-2464 ^b	2.32	Tremblay et al., 2013
<i>Staphylococcus chromogenes</i> 4120-6461 ^b	2.28	Tremblay et al., 2013
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 3210-4837 ^b	1.83	Tremblay et al., 2013
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 3200-1181 ^b	1.86	Tremblay et al., 2013
<i>Staphylococcus simulans</i> 4170-4486 ^b	2.15	Tremblay et al., 2013
<i>Staphylococcus xylosus</i> 4180-2182 ^b	1.89	Tremblay et al., 2013
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> 2010-8779 ^b	2.07	As for staphylococci (Tremblay et al., 2013)
<i>Streptococcus suis</i> 735 ^f	2.46	Wu et al., 2013
<i>Streptococcus uberis</i> 3130-1435 ^b	2.27	As for staphylococci (Tremblay et al., 2013)
<i>Truperella pyogenes</i> 2060-0754 ^b	2.13	As for staphylococci (Tremblay et al., 2013) but for a 48 h incubation with 5% CO ₂

- ^a K.R. Mittal, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada.
- ^b Mastitis Pathogen Culture Collection (MPCC) of the Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network (St-Hyacinthe, QC, Canada)
- ^c V. Aragon, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.
- ^d A. Letellier, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada.
- ^e P. Fravalo, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada.
- ^f M. Gottschalk, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada.
- ^g Identification from agar plates by the extended direct transfer procedure.
- ^h Scores between 2.0 and 3.0 = high confidence, reliable identification to the species level; between 1.7 and < 2.0 = low confidence, reliable identification to the genus level; < 1.7 = no reliable identification.

Table 2. Results of MALDI-TOF MS performed on biofilm samples processed through three different sample preparation procedures.

Bacterial species	Identification (scores) ^a		
	Method 1 Direct Transfer	Method 2 Extended Direct Transfer	Method 3 Tube Extraction
Gram negative			
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	No ID (0; 0)	No ID (0; 0)	No ID (0)
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> (2.26; 2.35)	<i>E. coli</i> (2.5; 2.52)	<i>E. coli</i> (2.27)
<i>Haemophilus parasuis</i>	No ID (0; 0)	No ID (0; 0)	No ID (0)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i> (1.86; 2.2)	<i>K. oxytoca</i> (2.14) ^b	<i>K. oxytoca</i> (2.2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> (1.64; 2.39)	<i>K. pneumoniae</i> (2.45) ^b	<i>K. pneumoniae</i> (2.41)
<i>Salmonella Heidelberg</i>	No ID (0; 0)	<i>Salmonella sp</i> (1.77) ^b	No ID (0)
<i>Salmonella Typhimurium</i>	No ID (0; 0)	<i>Salmonella sp</i> (2.06; 2.15)	<i>Salmonella sp</i> (2.02) ^b
Gram positive			
<i>Listeria monocytogenes</i>	No ID (0; 0)	<i>L. monocytogenes</i> (2.15; 2.21)	No ID (0; 0)
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	<i>S. aureus</i> (2.24; 2.31)	<i>S. aureus</i> (2.04; 2.42)	<i>S. aureus</i> (2.14; 2.39)
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	<i>S. chromogenes</i> (1.45; 2.17)	<i>S. chromogenes</i> (1.53; 2.27)	<i>S. chromogenes</i> (1.73; 2.21)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i> (1.42; 1.96)	<i>S. epidermidis</i> (1.86; 2.11)	<i>S. epidermidis</i> (1.73; 1.75)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i> (1.66; 2.04)	<i>S. haemolyticus</i> (1.6; 2.1)	<i>S. haemolyticus</i> (2.12; 2.24)
<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>S. simulans</i> (1.92; 2.2)	<i>S. simulans</i> (2.15; 2.21)	<i>S. simulans</i> (1.74; 2.23)
<i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>S. xylosum</i> (1.56; 2.0)	<i>S. xylosum</i> (1.7; 1.83)	<i>S. xylosum</i> (1.62; 2.0)

<i>xylosus</i>	1.74)		1.77)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	No ID (0; 0)	<i>S. dysgalactiae</i> (2.07; 2.08)	<i>S. dysgalactiae</i> (1.71; 2.07)
<i>Streptococcus suis</i>	No ID (0; 0)	No ID (0; 0)	No ID (0; 0)
<i>Streptococcus uberis</i>	<i>S. uberis</i> (1.61) ^b	<i>S. uberis</i> (2.1; 2.41)	<i>S. uberis</i> (1.96; 2.37)
<i>Truperella pyogenes</i>	No ID (0; 0)	<i>T. pyogenes</i> (2.08) ^b	No ID (0; 0)

^a Scores between 2.0 and 3.0 = high confidence, reliable identification to the species level; between 1.7 and < 2.0 = low confidence, reliable identification to the genus level; < 1.7 = no reliable identification. Results of the duplicates are shown.

^b Identified only once out of three replicates.

Table 3. Measures of agreement (Cohen kappa) for species-level identification of various pathogens between the standard agar plate extended direct transfer method and various sample preparation methods conducted on biofilms and for different MALDI score cut-offs.

Method used on biofilm samples	Kappa	95% CI	Interpretation
MALDI score ≥ 1.7			
Direct transfer	0.36	0.20, 0.51	Fair agreement
Extended direct transfer	0.64	0.48, 0.81	Substantial agreement
Tube extraction	0.61	0.22, 0.69	Substantial agreement
MALDI score ≥ 2.0			
Direct transfer	0.25	0.11, 0.38	Fair agreement
Extended direct transfer	0.55	0.38, 0.72	Moderate agreement
Tube extraction	0.49	0.28, 0.71	Moderate agreement

Annexe 2

Mise à jour des données sur les travaux ciblant le développement de molécules antibiofilm dirigées contre les staphylocoques depuis la publication de Goetz et al. publiée en 2016.

Travail réalisé par Samar Hadj Amor,
stagiaire internationale du programme Globalink de Mitacs, été 2018.

Table 1 : Antibiofilm molecules of microbial origin

Antibiofilm molecules	Nature	Origin	Mode of Action	Spectrum of activity	References
AgNPs coated plastic catheters	Metallic nanoparticle	<i>Bacillus</i> sp.	Prevents the bacterial attachment and colonization by disorganizing bacterial cell membrane, which is caused by the interaction of NPs with cell components	<i>Staphylococcus epidermidis</i> and <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Thomas et al., 1995
Alnumycin D	Polyketide (Naphthoquinone)	<i>Streptomyces</i>	Dispersion of pre-formed biofilms	<i>Staphylococcus aureus</i>	Oja et al., 2015
Bacteriocin-like substance (BLS P34)	Peptide	<i>Bacillus</i> sp. from a fish (<i>Leporinus</i> sp.)	Eradication of pre-formed biofilm and inhibition of adhesion by reducing the metabolic activity and pore formation in cell membrane	<i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> and <i>Salmonella enteritidis</i>	Costa et al., 2018
Lysostaphin	Metallic endopeptidase	<i>Staphylococcus simulans</i>	Inhibition of biofilm formation by targeting peptidoglycans in cell wall	<i>S. aureus</i>	
Serrapeptase	Proteolytic enzyme	<i>Serratia</i> sp.	Causes cell lysis	<i>S. aureus</i>	Hogan et al., 2017

Secalonic acid D (SAD)	Chemical compound	Marine-derived Fungi	Biofilms eradication and disruption of its architecture by reducing transcriptional expression of several genes, such as <i>agr</i> , <i>isaA</i> , <i>icaA</i> , and <i>icaD</i>	<i>S. aureus</i>	Wang et al., 2017
Microbially synthesized Silver NPs MAgNPs	Biosynthesized isotropic	SJ 14 bacteria	Inhibition by fragmentation of cells: alteration in osmoregulation leading to leakage of cellular contents	<i>S. aureus</i>	Thomas et al., 2017
P128	Protein	Bacteriophage	Cleavage of the pentaglycine cross bridge of peptidoglycan resulting cell wall-degrading and eventually biofilm destruction	<i>S. aureus</i>	Nair et al., 2016
Lysin CF-301	Protein	Bacteriophage	Eradicates mature biofilms by bacteriolysis within the biofilm and the cleavage of peptidoglycan in polymeric extracellular matrix	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> and <i>Streptococcus agalactiae</i>	Schuch et al., 2017

Rhamnolipids (RL)	Glycolipid surfactant	Microbial (<i>Pseudomonas</i> spp.)	Disruption of biofilm formation via mobilization mechanism of carbohydrates and proteins, which is characterized by the reduction of interfacial tension	<i>S. aureus</i> , <i>S. enteritidis</i> and <i>L. monocytogenes</i>	e Silva et al., 2017
ASP-1	Lactone ring- containing peptide antibiotics	<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i>	Inhibiting the attachment of bacteria	<i>S. aureus</i>	Chalasani et al., 2018
Aspartyl Protease 1 (MgSAP1)	Protease	<i>Malassezia</i> <i>globose</i> (fungus)	Blocks biofilm proliferation by hydrolyzing a major virulence protein A (SpA)	<i>S. aureus</i>	Li et al., 2017
Triple-acting fusion enzymes	Peptidoglycan hydrolases (PGHs)	Bacteriophage	Digestion of bacterial peptidoglycan resulting in osmolysis and death Inhibition with a high level of specificity	<i>S. aureus</i>	Becker et al., 2016
Hyicin 4244	Bacteriocin	<i>S. haemolyticus</i>	Damaging the cell membranes and penetrating the biofilm matrix	Some species of <i>Staphylococcus</i>	Duarte et al., 2017

Table 2: Antibiofilm molecules of vegetal origin

Antibiofilm strategy	Nature	Origin	Mode of action	Spectrum of activity	References
Berberine chloride (BBR) and totarol combination	Protoberberine alkaloid	<i>Coptidis rhizoma</i>	Reducing the transcription of related genes <i>sarA</i> , <i>cidA</i> and <i>icaA</i> , as well as the synthesis of PIA and eDNA	<i>S. aureus</i>	Guo et al., 2015
	Diterpene compound	Totarol tree			
Terpene	Essential oil	<i>Coriandrum sativum</i> L.	Inhibition the of biofilm development via penetrating through fatty acyl chains of the cell membrane and altering its permeability	<i>S. aureus</i> and <i>Escherichia coli</i>	Bazargani et al., 2016
Citrus-derived oil (CDO)	Essential oil	Citrus fruit	Disrupts pre-formed biofilms	<i>S. aureus</i>	Federman et al., 2016
Citral	Terpenoid	Orange oil	Disrupt pre-formed biofilms and inhibit the adhesion by downregulating virulence genes	<i>S. aureus</i>	Federman et al., 2016
Linalool	Terpenic alcohol				

α-mangostin (AMG)	Xanthone	<i>Garcinia mangostana</i> L.	Inhibits biofilm formation on an early stage by targeting the components of the extracellular matrix such as surface proteins FnBPA	<i>S. aureus</i>	Chusri et al., 2016 Phuong et al., 2017
<i>G. mangostana</i>	Plant	Herbal	Inhibits biofilm formation by bursting the cells and causes deep craters and holes in the bacterial envelope	<i>S. epidermidis</i>	Chusri et al., 2016
Nimbolide	Terpenoid lactone	<i>Azadirachta indica</i>	Intracellular killing activity by altering the cell membrane resulting perturbation and cell lysis	<i>S. aureus</i>	Sarkar et al., 2016
Gallic acid	Trihydroxybenzoic acid	Natural vegetal	Reduction of polysaccharide production and downregulation of <i>icaA</i> and <i>icaD</i> genes transcription	<i>S. aureus</i>	Liu et al., 2017
Oregano	Essential oil	<i>Origanum vulgare</i> L.	Eradicates pre-formed biofilms on polystyrene	<i>S. aureus</i>	Dos Santos Rodrigues et al., 2017
Cinnamaldehyde	Essential oil	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Interacts with the membrane by the leakage of small ions	<i>S. epidermidis</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> and <i>E. coli</i>	Sharma et al., 2017

Myricetin, Hesperetin and Phloretin	Flavonoids in aglycone forms	Vegetal	Act as efflux inhibitors through transcriptional repression of biofilm matrix components which are essential for biofilm maturation	<i>S. aureus</i>	Lopes et al., 2017
Conocarpan	Neolignans compounds	<i>Piper regnellii</i>	Inhibition of biofilm formation and eradication of preformed biofilms by causing cellular lysis regions and biofilm detachment	<i>S. aureus</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> and <i>Leishmania amazonensis</i>	Brambilla et al., 2017
Eupomathenoid-5					
Cis-11,14-eicosadienoic acid	Unsaturated Fatty acid	<i>Moringa oleifera</i>	Anti-hemolytic activity disrupting the cell membrane	<i>S. aureus</i>	Lee et al., 2017
Chitosan nanoparticles	Natural Polymer	Chitin	Adsorption to the bacterial membrane and altering its hydrophobicity resulting in the disruption of membrane integrity	<i>S. aureus</i>	Costa et al., 2017 Asli et al., 2017
16-oxo-cleroda-3, 13(14) E-diene-15 oic acid	Clerodane diterpenoid	<i>Polyalthia longifolia var. pendula</i>	Biofilm inhibiting potential via the alteration of genes expression responsible for biofilm formation and reducing metabolic activity	<i>S. aureus</i> and <i>Streptococcus mutans</i>	Khan et al., 2017

Lupulone	Chemical compound	The hop plant <i>Humulus lupulus</i> L.	Inhibition biofilm formation by affecting the cell membrane integrity and influencing its hydrophobicity	<i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i>	Bogdanova et al., 2017
<i>Thymus daenensis</i> EO	Essential oil	Vegetal	Disruptive potential on the pre-established biofilms	<i>S. aureus</i>	Sharifi et al., 2018
<i>Satureja hortensis</i> EO			Disruptive potential on the pre-established biofilms and a QS inhibitory (QSI) activity via decreasing the expression of <i>hld</i> gene		
Supernatants of <i>Lactobacillus plantarum</i> and <i>L. fermentum</i>	Probiotic	Cocoa seeds	Inhibition of biofilm formation via modulation of the <i>ica</i> operon, by increasing <i>icaR</i> and reducing <i>icaA</i> expression leading to the inhibition of PIA production	<i>S. aureus</i>	Melo et al., 2016
Diacetylcurcumin (DAC)	Curcumin derivative	<i>Curcuma longa</i> L.	Reduces the biofilm metabolic activity	<i>S. aureus</i>	Sardi et al., 2017
Eugenol	Essential oil	Clove Buds	Destroys cell membranes and blocks the synthesis of both DNA and proteins	<i>S. aureus</i>	Xu et al., 2016

Table 3: Antibiofilm molecules of biotechnological origin

Antibiofilm strategy	Nature	Origin	Mode of action	Spectrum of activity	References
Mannose-modified NDs	Glyco-nanoparticle	Nanotechnology	Disrupting the cytoplasmic membrane of the bacteria	<i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i>	Khanal et al., 2015
Tigecycline	Glycylcycline antibiotic	Derivative of tetracycline	Eradicating pre-established biofilms	<i>S. epidermidis</i>	Szczuka et al., 2016 Szczuka et al., 2017
Hybrid catheter material loaded with plectasin NZ2114	IPN-based device	Biotechnology	Inhibition of biofilm formation and eradication of preformed biofilms	<i>S. aureus</i>	Klein et al., 2017
Ni-NPs	Metallic nanomaterial	Nanotechnology	Eradication of preformed biofilms	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i>	Vahedi et al., 2017
ZnO nanostructured flower coating	Biomaterial	Biotechnology	Penetration and disorganization of cell membrane by releasing toxic Zn ²⁺ doses, generating of ROS	<i>S. aureus</i>	Alves et al., 2017

3-propanoic acid coated (Au-LP) gold nanomaterial	Inorganic nanoparticle	Nanotechnology	Inhibiting and eradicating of biofilm formation	<i>S. aureus</i> and <i>S. mutans</i>	Ahmed et al., 2017
Polymer–lipid encapsulation matrix (PLEX) Incorporating (SAAP)-145 and SAAP-276	Synthetic peptides	Biotechnology	Prevent the biofilm formation by the permeabilization of cells cytoplasmic membrane	<i>S. aureus</i>	Riool et al., 2017

Table 4: Antibiofilm molecules of chemical synthesis origin

Antibiofilm strategy	Nature	Origin	Mode of action	Spectrum of activity	References
3-amino-4-aminoximidofurazan derivative (PI3)	Hybrid synthetic derivative	Furazan and biguanide moieties	Prevents the bacterial attachment by interfering in the bacterial motility and disrupting the accumulation of EPS	<i>S. aureus</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Das et al., 2016
Compound 1 (ABC-1)	Benzimidazole molecule	Chemical synthesis	Disrupts the cell wall-associated proteins, reduce expression of SpA gene and the production of PIA protein and eDNA	<i>S. aureus</i>	Shrestha et al., 2016
N-acetyl cysteine (NAC)	Non-essential amino acid	Chemical synthesis	Disintegration of the biofilm by breaking the disulphide bridges that bind the proteins in the extracellular matrix	<i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i>	Molina-Manso et al., 2016
Sodium hypochlorite	Chemical compound	Chemical synthesis	Eradicating established biofilms	<i>S. aureus</i>	Eriksson et al., 2017
γ-lactone	Lactone derivative	Chemical synthesis	Eradicating pre-established biofilms by reducing metabolic activity	<i>S. aureus</i>	Khan et al., 2017

ZnPcn+-PACT	Derived photosensitizer	Chemical synthesis	Damage proteins, membrane lipids and eDNA resulting in a quick death of the bacteria	<i>S. aureus</i>	Gao et al., 2018
Polyhexamethylene Biguanide (PHMB)	Cationic polymer	Chemical synthesis	Destabilize biofilm structures, by its cell penetration and DNA binding properties	<i>S. aureus</i>	Kamaruzzaman et al., 2017

Table 5: Antibiofilm molecules of natural origin

Antibiofilm strategy	Nature	Origin	Mode of action	Spectrum of activity	References
Indolicidin	Protein	Bovine neutrophils	Creates pores through the cell membranes or causes the total disintegration of the membrane structures	<i>S. aureus</i>	Mataraci et al., 2012
MgSAP1 Melittin	Protease	Honey bees venom	Causes the permeabilization of the cytoplasmic membrane, the formation of artificial pore, disruption and lysis	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i>	Picoli et al., 2017
Human Milk Oligosaccharides (HMOs)	Unconjugated complex carbohydrates	Human	Inhibition of the biofilm growth and alteration of its architecture	<i>S. agalactiae</i> , <i>S. aureus</i> and <i>Acinetobacter baumannii</i>	Ackerman et al., 2017
Histones H5	Peptide	Avian Erythrocyte	Inhibits biofilm formation by damaging bacterial cell wall components as lipoteichoic acid (LTA)	<i>S. aureus</i>	Rose-Martel et al., 2017
Cyclo (L-leucyl-L-prolyl) (CLP)	Cyclic dipeptide	Marine	Hydrolyzing extracellular polymeric matrix	<i>S. epidermidis</i>	Gowrishankar et al., 2017

Annexe 3

Counteracting bacterial motility: a promising strategy to narrow *Listeria monocytogenes* persistence in food processing industries

Ibtissem Doghri^{1,2}, Cherifi Tamazight^{1,3}, Coralie Goetz^{1,2}, François Malouin^{2,4},

Mario Jacques^{1,2}, Fravallo Philippe^{1,3*}

¹ Département de pathologie et microbiologie - Faculté de médecine vétérinaire,

Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

² Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale (Op+Lait)

³ Chaire de recherche en salubrité des viandes (CRSV)

⁴ Département de biologie - Faculté des sciences,

Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Implication de l'auteur dans l'article:

Je suis co-auteur de l'article. J'ai notamment contribué à l'élaboration des expériences se rapportant à la production de surnageants produits par les souches de staphylocoques utilisés dans cet article. L'article n'a pas encore été soumis au « Journal of Applied Microbiology » car une déclaration d'invention a été récemment déposée au BRDV de l'Université de Montréal.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes (LM) is a Gram-positive, foodborne pathogen causing listeriosis. It can form biofilms at all stages of the food-processing chain that can be a source of contamination. The current study explores *in vitro* antibiofilm efficacy of molecules of various origins. Antibiofilm dose-dependent effect was screened in microtiter plates to determine active concentrations of tomatidine, a plant extract, zinc chloride (ZnCl₂)/ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), chemical compounds, and staphylococcal exoproducts, bacterial compounds. Significant inhibitory efficacy against LM biofilm formation was evidenced using microfluidic system and confocal microscopic analyses. Active molecules were effective at an early stage of biofilms development (adhesion phase) but failed to disperse the mature biofilm of LM. This attachment defect could be mainly due to a motility disruption. Our study highlights the critical activity of the motility for initial surface attachment and, consequently, biofilm formation. Overall, obtained results, in this study, allow to consider flagellum-mediated motility as a promising molecular target to select protective strategies against biofilm colonisation by LM in food processing environment.

Key words: *Listeria monocytogenes*, biofilm, motility, antibiofilm, tomatidine, ZnCl₂, EDTA, staphylococcal exoproducts

Introduction

Numerous epidemics of listerioses caused by *Listeria monocytogenes* (LM), a Gram-positive foodborne pathogen, have occurred in industrialized countries (Hamon et al., 2006, Sofos and Geornaras, 2010). In 1981, 41 people were affected in Nova Scotia and elsewhere in Canada and this was the first demonstration that food products were directly related to the transmission of this bacterium (Schlech et al., 1983). Since then, at least 80 large outbreaks have been described worldwide. A tremendous one occurred in 2010 in which 23,150 persons were affected with a mortality rate of 23.6% (Leclercq et al., 2014). Besides these grouped cases, LM can cause numerous sporadic listeriosis and represents, the deadliest causes of foodborne diseases in developed countries (Murray et al., 2017).

This pathogen causes invasive forms of listeriosis in susceptible individuals such as pregnant women, neonates, and immunocompromised persons (Vazquez-Boland et al., 2001, Sofos and Geornaras, 2010). LM is an ubiquitous bacterium mainly found in water, soil and forage. For humans, the consumption of ready to eat (RTE) contaminated food products represents the principal transmission mode (Allerberger and Wagner, 2010). The most sensitive food products are meat based RTE, uncooked sea food and non-pasteurized cheeses (Evans and Redmond, 2014, Kleta et al., 2017).

Listeria is able to adapt itself and survive to the most constraining conditions such as low temperatures, UV radiation, low pH, and high osmolarity (Chaturongakul et al., 2008). It can form biofilms at all stages of the food-processing chain (Evans and Redmond, 2014, Cherifi et al., 2017). In fact, biofilms have been found on surfaces made of polystyrene, glass, and stainless steel (Cherifi et al., 2017, Reis-Teixeira et al., 2017). This ability makes it resistant, even with rigorous hygiene practices and more so when less

accessible niches remains, leading to the contamination of the manufactured food products (Tauxe, 2002, Chang et al., 2012).

LM has four to six peritrichous flagella per cell (Schirm et al., 2004). Flagellum-mediated motility is important for biofilm formation by several gram-negative bacteria (O'Neil and Marquis, 2006) and in the case of LM, flagella are implicated as surface adhesins in early surface attachment (Vatanyoopaisarn et al., 2000). Biofilms are surface-attached microbial communities embedded in a self-produced hydrated polymeric matrix. This external matrix is essentially composed of polysaccharides, proteins, nucleic acids, and lipids (Flemming and Wingender, 2010). This mode of growth makes bacteria cells less sensitive to conventional antibiotic treatments as well as detergents and disinfectants (Flemming and Wingender, 2010). There is a clear need to develop new strategies to control biofilm formation in food processing environments. One of the promising strategies is the discovery of new active molecules that target bacterial adhesive properties and biofilm formation without affecting bacterial viability in order to avoid the appearance of resistance following a life-threatening selective pressure. Their use may be then exclusive or combined in addition to antimicrobial treatments.

To develop such a strategy, compounds of different origins were investigated in this study. First, molecules of microbial origin were investigated. Cell free supernatants of coagulase-negative staphylococci (CNS) having themselves a weak-biofilm phenotype were used. Our group previously demonstrated the ability of these CNS to inhibit biofilm formation of other staphylococci isolates having a strong-biofilm production phenotype (Goetz et al., 2017). In addition, we evaluated the activity of tomatidine, a steroid alkaloid isolated from the tomato plants. Tomatidine has been described as an anti-virulence molecule against strains of *Staphylococcus aureus* (Mitchell et al., 2012) as well as having

the ability to potentiate the effect of aminoglycoside antibiotics against the *Bacillales* group (*Listeria*, *Bacillus* and *Staphylococcus* spp.) through inhibition of the bacterial ATP synthase and interference with energy production (Guay et al., 2018, Lamontagne Boulet et al., 2018). Such an effect was amplified against *S. aureus* small colony variants (SCVs), which are respiratory deficient forms that produce high amounts of biofilm (Mitchell et al., 2011, Mitchell et al., 2013). Finally, we investigated the antibiofilm activity of zinc chloride since some studies reported antibiofilm activity of zinc ions against pathogens such as *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* and *S. aureus* (Gu et al., 2012, Wu et al., 2013).

Therefore, the objective of this study was to test and characterize the antibiofilm activities of these compounds by evaluating their effect on bacterial motility, adhesion to surfaces, overall biofilm formation and biofilm dispersion for various strains of LM isolated from food-processing environments.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions

Four biofilm forming strains of *Listeria monocytogenes* (LM) were used in the present study (Table 1). These strains were isolated from pork slaughterhouses and cutting facilities after sanitation procedures. Five coagulase-negative staphylococci (CNS, Table 1) of bovine origin were used to generate cell-free supernatants (SNs) with an anti-biofilm activity (Goetz et al., 2017). These CNS isolates were obtained from the Mastitis Pathogen Culture Collection (MPCC) which is managed by the Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network (St-Hyacinthe, Québec, Canada; Reyher et al., 2011). Bacteria were conserved in brain heart infusion broth (BHI, Becton Dickinson and Company, USA) with the addition of 15 % glycerol at -80°C. Prior to experiments, strains were thawed and plated on blood agar for LM (Oxoid, England) and BHI agar for CNS and were cultivated in aerobic conditions at 30°C and 37°C, respectively.

Preparation of active molecules

1. Production of CNS cell-free SNs

The five CNS isolates (C, D, E, F, H) were grown in BHI supplemented with glucose (BHIG, 0.25% w/v) in 6-wells microtiter plates (Corning Costar #3516, USA) (Goetz et al., 2017). Colonies from BHI agar plates were suspended in BHIG to a 0.5 McFarland standard and 9 mL were distributed in each well of the microtiter plate. The microtiter plates were then incubated for 24 h at 37°C. After the incubation, the SNs were collected by centrifugation at 4,000 rpm for 20 min at 4°C and filter-sterilized through a 0.2-µm membrane before and stored at -80°C until use.

2. Preparation of EDTA and zinc chloride solutions

Filter sterilized ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 10 mM, pH 8.0) (Sigma Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) and zinc chloride (ZnCl₂, 100 mM) (Sigma Aldrich) stock solutions were prepared in demineralized water. EDTA was used as a positive antibiofilm control according to a study demonstrating that, used in low concentration, EDTA displayed an antibiofilm activity against *Listeria* without being antibacterial (Chang et al., 2012).

3. Preparation of tomatidine

Tomatidine (TO) (Sigma Aldrich) was solubilised in dimethylsulfoxide (DMSO) at a concentration of 4.5 mM and stored at -20°C until use.

Biofilm assays

1. Microtiter plate assay

LM isolates, used for biofilm production, were grown overnight in Tryptic Soy Broth medium with 0.6 % Yeast Extract (TSBYE) at 30°C as previously described (Cherifi et al., 2017).

Briefly, 100 µl of the overnight bacterial culture adjusted to an OD_{600nm} of 1 were suspended in 10 ml of fresh BHI. Then, 100 µl of the newly inoculated BHI were distributed into wells of 96-well microplates (Corning Costar #3595, USA). Wells were

covered with parafilm to avoid evaporation. After incubation at 30°C for 24 h, the microplate was washed three times. Then, the bacterial biofilms were stained with 150 µl of a solution of crystal violet at 0.1 % for 20 min and rinsed with ultra-pure water until the wash-liquid was clear. The absorbed crystal violet was then eluted from attached cells with 96% ethanol (200 µl / well) and the quantification was carried out by measuring the OD_{595nm}. To investigate the dose dependant effect of CNS SNs on biofilm formation, wells were inoculated with *Listeria* strains resuspended in a BHI including several SN ratios (Table 2). EDTA, zinc chloride and tomatidine were tested according to the concentrations indicated in Table 2. Biofilm formation was then performed as described above.

The protocol was slightly modified to investigate the impact on bacterial adhesion. After mixing cultures with active compounds, cells were allowed to attach for 4 hours. After this adhesion step, we operated in two different ways. The first was a direct visualization and a quantification of attached cells, as described above. The second technique consisted of washing the wells, adding fresh medium and allowing the biofilm to mature for 24 hours. Biofilms were then quantified as described above.

To study the ability to disturb or disperse mature biofilms, the following protocol was used. Biofilms were grown during 24 h in microplates, wells were then washed, and active molecules were added at the appropriate concentrations. The microtiter plate was incubated for an additional 24 h at 30°C and biofilms were quantified using crystal violet as described above.

2. Biofilm formation using a microfluidic system

Dynamic biofilm formation was followed using the BioFlux 200 system with 48-well plates (Fluxion biosciences, South San Francisco, California, USA). The protocol was adapted for LM biofilm by Cherifi et al. (2017). Briefly, cells of an overnight bacterial culture were centrifuged 20 min at 4,000 g and resuspended in fresh pre-warmed BHI medium for controls or mixed with SN, EDTA, zinc chloride and tomatidine at the same concentrations described above for the static biofilm assays (Table 2). One hundred microliters of these cultures were added to the output wells of the BioFlux plate and injected at 0.05 Pa of shear stress for 30 s into the microfluidic channels. Cells were then allowed to attach during 4 h at 30 °C without flow.

After the adhesion step, the input wells were filled with 1.25 ml of pre-warmed BHI diluted with demineralized water at 1/10 (v/v) and the 48-well plate was incubated at 30°C with a constant flow of 50 μ l / h.

Microscopic observations were performed by confocal laser scanning microscopy (CLSM; Olympus FV1000 IX81). The biofilms formed were observed by staining cells with FilmTracer™ FM 1-43® fluorescent marker (Molecular Probes; Eugene, OR, USA) as recommended by the manufacturer. The biofilm stacks were then analyzed with Image-Pro software (version 9.0; Media Cybernetics, Inc., USA) to estimate the thicknesses (μ m) and the biovolume (μ m³. μ m⁻²) of biofilms.

Antibacterial assays

1. Agar well diffusion assay

The antibacterial activity of SNs, EDTA, ZnCl₂ and tomatidine was evaluated by an agar well diffusion assay. BHI agar plates were inoculated with approximately 10⁷ cfu of the target bacterial strain. Wells were created in the agar with sterile pipet tips and filled

with 100 µl of filter-sterilized samples at the appropriate concentration (Table 2). The plates were incubated for 24 h at 30°C and clear zones of growth inhibition were measured.

2. Growth inhibition assays in broth cultures

Target bacteria grown overnight were resuspended in BHI and mixed with the antimicrobial compound solutions or SN at the appropriate concentrations. Cultures were incubated 24 h at 30°C. Growth was monitored by measuring cultures turbidity at 600nm at various time points.

Cell motility assay

Swimming assays were performed as followed. TSBYE agar plates (0.3 % of agar) were prepared by supplementing the active molecules at the selected concentrations in TSBYE. An overnight culture of LM was used for centric spot inoculation of agar plates and incubation was conducted in an upright position at 30 °C for 24 h (Sivaranjani et al., 2016).

Autoaggregation assay

The effect of active compounds on the autoaggregation of *Listeria* strains was evaluated using the method described by Gowrishankar et al. (2016). Five ml of BHI, with or without active compounds, were inoculated with overnight cell suspensions (10^7 cfu/ml) and incubated at 30 °C for 24h. Then, 0.5 ml was aspirated from the top of the cultures and optical densities were measured at 600nm (DO 1). The rest of the cultures were vortexed and optical densities were measured at 600nm (DO 2). The degree of autoaggregation was calculated as follow :

$$\% \text{ autoaggregation} = ((\text{DO } 2 - \text{DO } 1) / \text{DO } 2) \times 100$$

Statistical analyses

Each experiment was performed in independent triplicates. Statistical analyses were calculated using GraphPad Prism software (Version 5.03). Comparisons were carried out either by the Student t-test (significant if p values were < 0.05) or by using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test (set at 5%).

Results

CNS supernatants, zinc chloride, EDTA and tomatidine inhibit biofilm formation of *Listeria monocytogenes* under static conditions

The antibiofilm activity of CNS supernatants (SNs C, D, E, F and H) was assessed *in vitro* by quantifying crystal violet bound to biofilm-embedded bacterial cells. Results are shown in Fig 1A. *S. chromogenes* SN C and SN D significantly ($p < 0.05$) inhibited biofilm formation of *Listeria monocytogenes* (LM) 3C15 and 3C24, C97 and 3C24 respectively (> 50 % of inhibition, Fig 1A). *S. chromogenes* SN E and *S. simulans* sSN H significantly ($p < 0.05$) inhibited biofilm formation of LM 3C15, and C97 and 3C15 respectively (> 50 % of inhibition, Fig 1. A). Observed antibiofilm effects were dose-dependent (Fig 1.A). Formation of biofilm in strain 2A51-1 was insensitive to all CNS SNs used in this study. Tomatidine, starting from 144 μM , significantly ($p < 0.05$) inhibited biofilm formation of 3C15, C97, and 3C24 (≥ 50 % of inhibition, Fig 1B). No antibiofilm effect on strain 2A51-1 was observed with either SN or tomatidine and, on the contrary, an increase of biofilm production was observed for that LM strain in presence of SN D or tomatidine (> 30 %). Zinc chloride, used at 1000 μM , showed a significant antibiofilm activity against all *Listeria* strains (Fig 1C). In fact, it was just as effective as EDTA, the positive control (> 60 % of inhibition, Fig 1D).

Visualization of antibiofilm activities against LM grown in a microfluidic system

The inhibitory effects of screened molecules were investigated using a Bioflux system to confirm their antibiofilm effectiveness under dynamic conditions. Reductions of biofilms were observed with exposure to compounds (Fig 2A). Further, stacks analysis,

using the Image-Pro software, showed a significant reduction in the thickness and biovolume (Fig 2.B).

As observed in microtiter plates, EDTA treatment was highly effective against all LM strains tested (Fig 2.A). Biofilm thickness and biovolumes were greatly reduced (> 50 % and > 80% respectively; Fig 2A). ZnCl₂ was also very effective and especially against LM 3C15 and 3C24 (Fig 2A, 2B). Almost all the CNS SNs selected confirmed their antibiofilm activities against LM C97, 3C15 and 3C24 (Fig 2.A). Biofilm quantification values confirmed visual observations (Fig 2.B). In fact, high biovolumes and thickness decreases were obtained (>50%). An exception was observed concerning the thickness of LM 3C15 and 3C24 biofilms treated with SN C. Indeed, biovolumes were significantly reduced without any effect on the thickness average and this can be explained by non-uniform distribution of the biofilm on the surface. Tomatidine antibiofilm activity was also confirmed under these dynamic conditions. LM C97, 3C15 and 3C24 biofilms were considerably affected by the presence of tomatidine (> 80 % on biovolume and thickness, Fig 2A, 2B).

These findings clearly demonstrated that antibiofilm molecules screened in microtiter plates were also effective under the presence of shear force in a microfluidic system.

LM growth inhibition

We then examined if an antibacterial activity could be responsible for the observed reduction of LM biofilms.

Assays in broth cultures suggest that, overall, growth of all strains was not drastically affected by the SN, EDTA and ZnCl₂ molecules (Fig 3). The agar well diffusion assay confirmed the non-effectiveness of these treatments on growth (data not shown). The

only exception concerned the activity of tomatidine on the growth of LM. Indeed, a delay of growth was observed for strains LM C97, 3C15 and 3C24 during the first 7 hours of growth although the exponential phase resumed practically normally after this period of latency (Fig 3A, 3C, 3D). Strain LM C97 seemed most affected (Fig 3A) and this was confirmed by the appearance of a clear halo around the growth well on the agar plates (data not shown).

CNS supernatants, zinc chloride, EDTA and tomatidine affect bacterial adhesion and do not disturb established *Listeria* biofilms

To further analyze the antibiofilm activity, we examined the effect of these molecules on the onset of bacterial adhesion as well as on pre-established biofilms. Fig 4A clearly demonstrates that antibiofilm compounds did not exhibit any anti-adhesion activity against almost all the *Listeria* strains, except that a significant reduction of adhesion was noted after tomatidine treatment of LM C97 cells (Fig 4A). We subsequently wanted to see if there was an effect on the cells organization on the abiotic surface. Crystal violet staining of adhered cells, treated or not with antibiofilm compounds, was thus performed. Fig 4B illustrates the data for strain LM 2A51-1 (results for the other strains can be found in Supplementary data 1). An apparent modification of the cellular organization on the surface was denoted. In fact, when treated with EDTA and ZnCl₂, cells were more scattered compared to the control, where the formation of microcolonies was clearly observed (Fig 4B). Biofilm quantification of treated cells during the 4h adhesion step, clearly demonstrated that the effect occurred during the first hours of contact between bacterial cells and active compounds and was observable on the mature biofilm (Fig 4C). Indeed, the activity of all the tested molecules was expressed during the biofilm formation

process. The effect on dispersion has also been studied, and our results (Fig 4D) clearly revealed that investigated molecules didn't induce any disruption or dispersion of pre-formed biofilms except with tomatidine against LM C97, 3C15 and 3C24.

Antibiofilm molecules affect bacterial autoaggregation

Results demonstrated a significant delay in autoaggregation for many of the treatments, except SN H against LM C97 and SN E against 3C15 (Fig 5). In all the cases, tomatidine did not induce any reduction in LM autoaggregation.

Antibiofilm molecules inhibit cell motility

Molecules that showed antibiofilm activity produced visible reductions in flagella-directed swimming motility of all LM strains (Fig 6A, 6B, 6C). On the other hand, SN F that was devoid of antibiofilm activity (Fig 1A) did not induce any motility inhibition and served as a negative control for this assay (Fig 6. D). LM 2A51-1 motility, when treated with EDTA, seemed to be the only observed exception.

Discussion

Preventing the establishment of *Listeria monocytogenes* (LM) biofilms and the dispersion of mature biofilms are promising strategies for controlling the persistence of pathogens in food-processing industries (Yang et al., 2012). Consequently, in this study we investigated the efficacy of compounds from different origins to affect biofilm formation of LM strains originally, isolated from pork slaughterhouses after sanitation procedures. Compounds selection was partly based on their previously demonstrated ability to inhibit biofilm formation of other bacterial species (Chang et al., 2012, Wu et al., 2013, Goetz et al., 2017, Guay et al., 2018). The first step of this study consisted in the screening of the active molecules against LM. We, therefore, characterized antibiofilm activities in microtiter plate assays (static conditions) as well as in microfluidic chambers (dynamic conditions). LM strains showed different sensitivities to CNS culture supernatants (SNs) supplementation in a dose-dependant manner. These results suggest that CNS produce indeed exoproducts with antibiofilm activity. These results are in agreement with Goetz et al. (2017) in which the authors highlighted the inhibitory effect of these CNS strains on biofilm formation of staphylococci isolates associated with bovine mastitis. Zinc chloride and EDTA exerted interesting antibiofilm activities against of all LM strains tested. Effectiveness of zinc ions was dose dependant and 1000 μM presented the strongest antibiofilm activity. This dose is relatively high compared to the study of Wu et al. (2013) in which authors described the effectiveness of lower concentrations of zinc (0-250 μM) against different bacterial swine pathogens. Finally, tomatidine was also, in a dose dependant manner, effective to prevent biofilm formation of the used strains (except LM 2A51-1). A concentration of 144 μM was most effective against biofilm formation. These results complement work by Guay et al. (2018) which reported that although tomatidine

had no antibiotic activity on its own against prototypical *S. aureus*, *Bacillus subtilis* and LM, it was highly active against their respiratory deficient small colony variants.

To explain our results, different hypotheses have been considered according to biofilm development key steps. We first examined whether these compounds could display a growth inhibitory activity when mixed with the bacterial cells. Interestingly, except for tomatidine that delayed the exponential phase of growth, experiments highlighted the lack of such antibiotic activity for CNS SNs, zinc chloride and EDTA against free-living LM cells. These results are in agreement with other studies (Chang et al., 2012, Wu et al., 2013, Goetz et al., 2017). Up until now, few natural molecules were reported to display antibiofilm activity while being devoid of an antibacterial action. In this category, the most frequently described molecules are quorum sensing inhibitors (Estrela et al., 2009). Interestingly, the anti-virulence properties of tomatidine on *S. aureus* cells are aligned with an interference in the functions of the quorum-sensing Agr system in that species (Mitchell et al., 2012) although its principal target is energy production (Lamontagne Boulet et al., 2018). Besides, most of bacterial molecules described as anti LM are bacteriocins which are especially isolated from lactic bacteria. Crude extract of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. diacetylactis BGBU1-4 exerted an inhibitory effect on biofilm formation by inhibiting growth of LM (Cirkovic et al., 2016). *Lactobacillus sakei* CRL1862 also produces bacteriocins able to control LM biofilm formation (Perez-Ibarreche et al., 2016). A recent study, reported the antilisterial activity of a natural peptide, named Alpep7, from food-derived origin (rice bran). However, this peptide inhibited both growth and biofilm formation (Pu and Tang, 2017).

We also sought to explore the effect of our selected antibiofilm compounds on bacterial adhesion and biofilm dispersion. Therefore, we investigated the effects of these

compounds during the first 4 h of biofilm development which corresponds to the bacterial adhesion step and on mature biofilms. On one hand, results suggested that almost all compounds did not reduce directly bacterial adhesion. This observation allowed us to rule out the hypothesis of a physico-chemical action on the abiotic surface. The effect on the biotic surface has also been studied. In fact, the process of cell–cell interaction called autoaggregation depends on surface hydrophobicity of the cell (Basson et al., 2008). Thus, the observed autoaggregation reduction might be related to poor cell-cell attachment capacity and the disruption of microcolony formation. This could partially explain the antibiofilm efficacy of the active molecules. On the other hand, no dispersion of pre-established biofilms along with a destructive activity of the mature biofilm were observed. The only exception concerns the effect of tomatidine on LM C97 and this can be explained by the extended lag phase provoked by this compound.

Bacterial motility described as an important feature for attachment of cells to abiotic surfaces and the initiation of microcolonies on the surface (Lemon et al., 2007). For bacteria such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae*, flagella induce cell motility and might act as surface adhesins (O'Toole and Kolter, 1998, Pratt and Kolter, 1998, Watnick et al., 2001). LM is a motile bacteria and possesses four to six peritrichous flagella per cell (Schirm et al., 2004) and its flagellum-mediated motility seems critical for biofilm formation on abiotic surfaces (Lemon et al., 2007).

Our results have clearly brought out an inhibitory effect of all tested compounds on *Listeria* swimming motility. On the one hand, the role of flagella as surface adhesins has been described as minimal or dependent upon motility (Lemon et al., 2007). This may explain the absence of any inhibitory effect by our investigated compounds on the bacterial adhesion phase. However, other authors have established a causal relationship between

primary adhesion and bacterial motility. In fact, it was demonstrated that the cyclic dipeptide cyclo(L-leucyl-L-prolyl), isolated from the marine bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*, affected early steps of biofilm formation when used at a non antibactericidal dose (Gowrishankar et al., 2016). It is therefore obvious that other factors are important to consider in trying to explain antibiofilm activities such as cell-to-cell communication and the surfactant effect of the compounds. In several studies, the key role of LM flagellum in surface-associated biofilm was described as a generator of the necessary energy to overcome repulsive forces generated by the abiotic surface (Schirm et al., 2004, Lemon et al., 2007). This is in agreement with our microscopy results, since we denoted the absence/decrease of microcolonies on the abiotic surface when exposed to our selection of compounds as compared to that seen in our untreated controls. It seems that even if the bacteria preserve their flagella (supplementary data 2), their ability to move on the surface is hampered (supplementary data 3).

To our knowledge, very few studies reported a relation between antibiofilm activity and bacterial motility in LM in addition to the cyclic dipeptide cyclo(L-leucyl-L-prolyl) described above and that mitigates biofilm formation, virulence, and motility of LM (Gowrishankar et al., 2016). Sivaranjani et al. (2016), studied the antibiofilm activity of morin, a plant derived flavonol compound, and also established the relationship between biofilm formation and motility in LM.

Results obtained in this study, together with antilisterial recent findings, allow to consider that flagellum-mediated motility represents a promising molecular target in the fight against the persistence of LM in industrial food settings.

Conflict of interest

Authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The research was supported by a New Initiative Grant from the Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA) to PF, MJ and FM. Authors wish to thank Frédéric Berthiaume for confocal microscopy technical assistance.

References

- Allerberger, F. and M. Wagner. 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect* 16(1):16-23.
- Basson, A., L. A. Flemming, and H. Y. Chenia. 2008. Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. *Microbial Ecol* 55(1):1-14.
- Chang, Y., W. Gu, and L. McLandsborough. 2012. Low concentration of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) affects biofilm formation of *Listeria monocytogenes* by inhibiting its initial adherence. *Food Microbiol* 29(1):10-17.
- Chaturongakul, S., S. Raengpradub, M. Wiedmann, and K. J. Boor. 2008. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol* 16(8):388-396.
- Cherifi, T., M. Jacques, S. Quessy, and P. Fravallo. 2017. Impact of Nutrient Restriction on the Structure of *Listeria monocytogenes* Biofilm Grown in a Microfluidic System. *Front Microbiol* 8:864.
- Cirkovic, I., D. D. Bozic, V. Draganic, J. Lozo, T. Beric, M. Kojic, B. Arsic, E. Garalejic, S. Djukic, and S. Stankovic. 2016. Licheniocin 50.2 and Bacteriocins from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 Inhibit Biofilms of Coagulase Negative Staphylococci and *Listeria monocytogenes* Clinical Isolates. *PloS One* 11(12):e0167995.
- Estrela, A. B., M. G. Heck, and W. R. Abraham. 2009. Novel approaches to control biofilm infections. *Curr Med Chem* 16(12):1512-1530.
- Evans, E. W. and E. C. Redmond. 2014. Behavioral risk factors associated with listeriosis in the home: a review of consumer food safety studies. *J Food Prot* 77(3):510-521.

Flemming, H. C. and J. Wingender. 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8(9):623-633.

Goetz, C., Y. D. N. Tremblay, D. Lamarche, A. Blondeau, A. M. Gaudreau, J. Labrie, F. Malouin, and M. Jacques. 2017. Coagulase-negative staphylococci species affect biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. *J Dairy Sci* 100(8):6454-6464.

Gowrishankar, S., M. Sivaranjani, A. Kamaladevi, A. V. Ravi, K. Balamurugan, and S. Karutha Pandian. 2016. Cyclic dipeptide cyclo(l-leucyl-l-prolyl) from marine *Bacillus amyloliquefaciens* mitigates biofilm formation and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Pathog Dis* 74(4):ftw017.

Gu, H., D. Fan, J. Gao, W. Zou, Z. Peng, Z. Zhao, J. Ling, and R. Z. LeGeros. 2012. Effect of ZnCl₂ on plaque growth and biofilm vitality. *Arch Oral Biol* 57(4):369-375.

Guay, I., S. Boulanger, C. Isabelle, E. Brouillette, F. Chagnon, K. Bouarab, E. Marsault, and F. Malouin. 2018. Tomatidine and analog FC04-100 possess bactericidal activities against *Listeria*, *Bacillus* and *Staphylococcus* spp. *BMC Pharmacol Toxicol* 19(1):7.

Hamon, M., H. Bierne, and P. Cossart. 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* 4(6):423-434.

Kleta, S., J. A. Hammerl, R. Dieckmann, B. Malorny, M. Borowiak, S. Halbedel, R. Prager, E. Trost, A. Flieger, H. Wilking, S. Vygen-Bonnet, U. Busch, U. Messelhausser, S. Horlacher, K. Schonberger, D. Lohr, E. Aichinger, P. Lubert, A. Hensel, and S. Al Dahouk. 2017. Molecular Tracing to Find Source of Protracted Invasive Listeriosis Outbreak, Southern Germany, 2012-2016. *Emerg Infect Dis* 23(10):1680-1683.

Lamontagne Boulet, M., C. Isabelle, I. Guay, E. Brouillette, J. P. Langlois, P. E. Jacques, S. Rodrigue, R. Brzezinski, P. B. Beauregard, K. Bouarab, K. Boyapelly, P. L. Boudreault, E. Marsault, and F. Malouin. 2018. Tomatidine Is a Lead Antibiotic Molecule

That Targets *Staphylococcus aureus* ATP Synthase Subunit C. Antimicrob Agents Chemother 62(6).

Leclercq, A., C. Charlier, and M. Lecuit. 2014. Global burden of listeriosis: the tip of the iceberg. Lancet Infect Dis 14(11):1027-1028.

Lemon, K. P., D. E. Higgins, and R. Kolter. 2007. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. J Bacteriol 189(12):4418-4424.

Mitchell, G., A. Fugere, K. Pepin Gaudreau, E. Brouillette, E. H. Frost, A. M. Cantin, and F. Malouin. 2013. SigB is a dominant regulator of virulence in *Staphylococcus aureus* small-colony variants. PloS one 8(5):e65018.

Mitchell, G., M. Gattuso, G. Grondin, E. Marsault, K. Bouarab, and F. Malouin. 2011. Tomatidine inhibits replication of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis airway epithelial cells. Antimicrob Agents Chemother 55(5):1937-1945.

Mitchell, G., M. Lafrance, S. Boulanger, D. L. Seguin, I. Guay, M. Gattuso, E. Marsault, K. Bouarab, and F. Malouin. 2012. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. J Antimicrob Chemother 67(3):559-568.

Murray, R., J. Tataryn, K. Pintar, and M. K. Thomas. 2017. Estimates of the burden of illness for eight enteric pathogens associated with animal contact in Canada. Epidemiol Infect 145(16):3413-3423.

O'Neil, H. S. and H. Marquis. 2006. *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion. Infect Immun 74(12):6675-6681.

O'Toole, G. A. and R. Kolter. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol 30(2):295-304.

Perez-Ibarreche, M., P. Castellano, A. Leclercq, and G. Vignolo. 2016. Control of *Listeria monocytogenes* biofilms on industrial surfaces by the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CRL1862. *FEMS Microbiol Lett* 363(12).

Pratt, L. A. and R. Kolter. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30(2):285-293.

Pu, C. and W. Tang. 2017. The antibacterial and antibiofilm efficacies of a liposomal peptide originating from rice bran protein against *Listeria monocytogenes*. *Food Funct* 8(11):4159-4169.

Reis-Teixeira, F. B. D., V. F. Alves, and E. C. P. de Martinis. 2017. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Braz J Microbiol* 48(3):587-591.

Schirm, M., M. Kalmokoff, A. Aubry, P. Thibault, M. Sandoz, and S. M. Logan. 2004. Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with beta-O-linked N-acetylglucosamine. *J Bacteriol* 186(20):6721-6727.

Schlech, W. F., 3rd, P. M. Lavigne, R. A. Bortolussi, A. C. Allen, E. V. Haldane, A. J. Wort, A. W. Hightower, S. E. Johnson, S. H. King, E. S. Nicholls, and C. V. Broome. 1983. Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. *N Engl J Med* 308(4):203-206.

Sivaranjani, M., S. Gowrishankar, A. Kamaladevi, S. K. Pandian, K. Balamurugan, and A. V. Ravi. 2016. Morin inhibits biofilm production and reduces the virulence of *Listeria monocytogenes* - An *in vitro* and *in vivo* approach. *Int J Food Microbiol* 237:73-82.

Sofos, J. N. and I. Geornaras. 2010. Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Sci* 86(1):2-14.

Tauxe, R. V. 2002. Emerging foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 78(1-2):31-41.

Vatanyoopaisarn, S., A. Nazli, C. E. Dodd, C. E. Rees, and W. M. Waites. 2000. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Appl Environ Microbiol* 66(2):860-863.

Vazquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14(3):584-640.

Watnick, P. I., C. M. Lauriano, K. E. Klose, L. Croal, and R. Kolter. 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol* 39(2):223-235.

Wu, C., J. Labrie, Y. D. Tremblay, D. Haine, M. Mourez, and M. Jacques. 2013. Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol* 115(1):30-40.

Yang, L., Y. Liu, H. Wu, Z. Song, N. Hoiby, S. Molin, and M. Givskov. 2012. Combating biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65(2):146-157.

Table 1. Bacterial strains and culture conditions.

Strain	Origin	Reference and/or source	Culture conditions
<i>Listeria monocytogenes</i>			
<i>Listeria monocytogenes</i> C97 (LM C97)	Meat slaughter isolate	This study	Blood agar medium 30°C 24 h
<i>Listeria monocytogenes</i> 3C15 (LM 3C15)	Meat slaughter isolate	This study	
<i>Listeria monocytogenes</i> 3C24 (LM 3C24)	Meat slaughter isolate	This study	
<i>Listeria monocytogenes</i> 2A51-1 (LM 2A51-1)	Meat slaughter isolate	This study	
<i>Coagulase Negative Staphylococcus (CNS)</i>			
<i>Staphylococcus chromogenes</i> C	Bovine Mastitis	Goetz et al. 2017	BHI agar 37°C 24 h
<i>Staphylococcus chromogenes</i> D	Bovine Mastitis	Goetz et al. 2017	
<i>Staphylococcus chromogenes</i> E	Bovine Mastitis	Goetz et al. 2017	
<i>Staphylococcus simulans</i> F	Bovine Mastitis	Goetz et al. 2017	
<i>Staphylococcus simulans</i> H	Bovine Mastitis	Goetz et al. 2017	

Table 2. Concentrations used for antibiofilm assays and corresponding controls

	SN _{CNS} (C, D, E, F, H)	EDTA	ZnCl ₂	Tomatidine
Test (final concentration)	6 - 50 % (v/v)	100 μM	50 - 1000 μM	33-220 μM
Controls	BHIG	Demineralized water	Demineralized water	DMSO

Figure 1. Screening of antibiofilm activities against *Listeria monocytogenes* strains in microtiter plate. (A) CNS supernatants (SNs) antibiofilm activity. (B) Tomatidine antibiofilm activity. (C) Zinc chloride antibiofilm activity, (D) EDTA antibiofilm activity. A, B and C data were analyzed by ANOVA test and D data by a t-test, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 2. Antibiofilm activity against *Listeria monocytogenes* strains in a microfluidic system. (A) 3D representation and a side view projection. (B) Average thickness and biovolumes calculated, for each experiment, from Image Pro analyses of 10 images stacks obtained from two independent biofilms. Data were analyzed by ANOVA test, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; p < 0.001.

Figure 3. Growth curves of *Listeria monocytogenes* strains incubated or not with antibiofilm compounds. (A) Growth of LM C97. (B) Growth of LM 2A51-1. (C) Growth of LM 3C15. (D) Growth of LM 3C24.

Figure 4. Effect of active compounds on bacterial adhesion and biofilm dispersion of *Listeria monocytogenes* strains. (A) Bacterial quantification of adhered cells after a 4 h adhesion step. (B) Microscopy visualization of bacterial adhesion of LM 2A51-1 after 4 h. (C) Biofilm quantification after 24h of incubation with treatments added during the adhesion step. (D) Compounds effects on dispersion of pre-established biofilms. Data were analyzed by ANOVA test, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; p < 0.001.

Figure 5. Effect of antibiofilm compounds on *Listeria monocytogenes* autoaggregation.

Data were analyzed by ANOVA test, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; $p < 0.001$.

Figure 6. Effect of antibiofilm compounds on motility of *Listeria monocytogenes*. (A)

Effect of $ZnCl_2$ and EDTA. (B) Effect of CNS supernatants (SNs). (C) Effect of tomatidine. (D) Negative control: effect of SN F on motility of *Listeria strains*

Supplementary data 1: Microscopy visualization of bacterial adhesion of LM C97, LM 3C15 and LM 3C24

Supplementary data 2: Transmission electron microscopic analysis of LM 2A51-1.

After 24h of treatment, bacteria were fixed with a 4% glutaraldehyde solution. Then, 100 μ L of fixed bacteria (1/2 diluted in the appropriate medium) were incubated directly onto a formvar-carbon film on a 400 mesh copper grid (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) overnight in a humid chamber. The grids were then negatively stained using 2% phosphotungstic acid and visualized at 80 kV by TEM (Hitachi, model HT7700, Rexdale, ON, Canada).

Supplementary data 3: Bacterial motilities videos. Images were taken after 4h of treatment of LM cells.

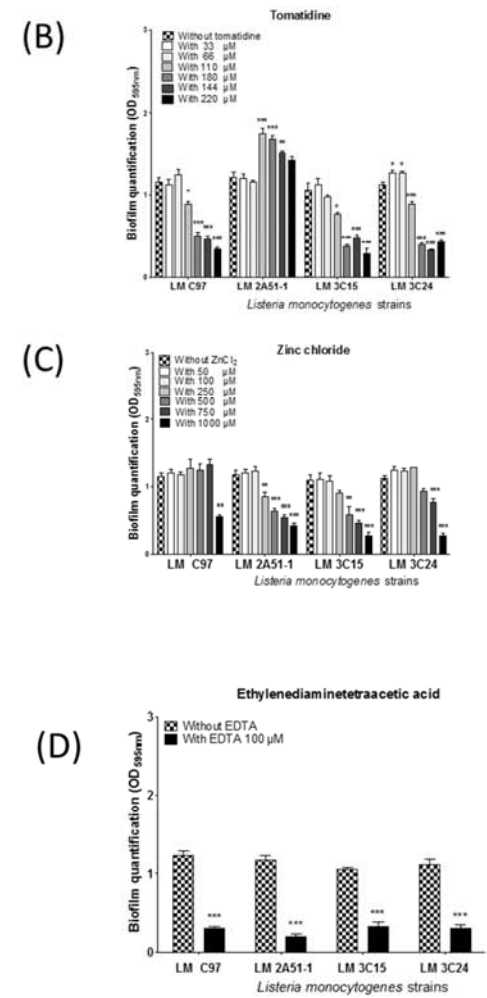
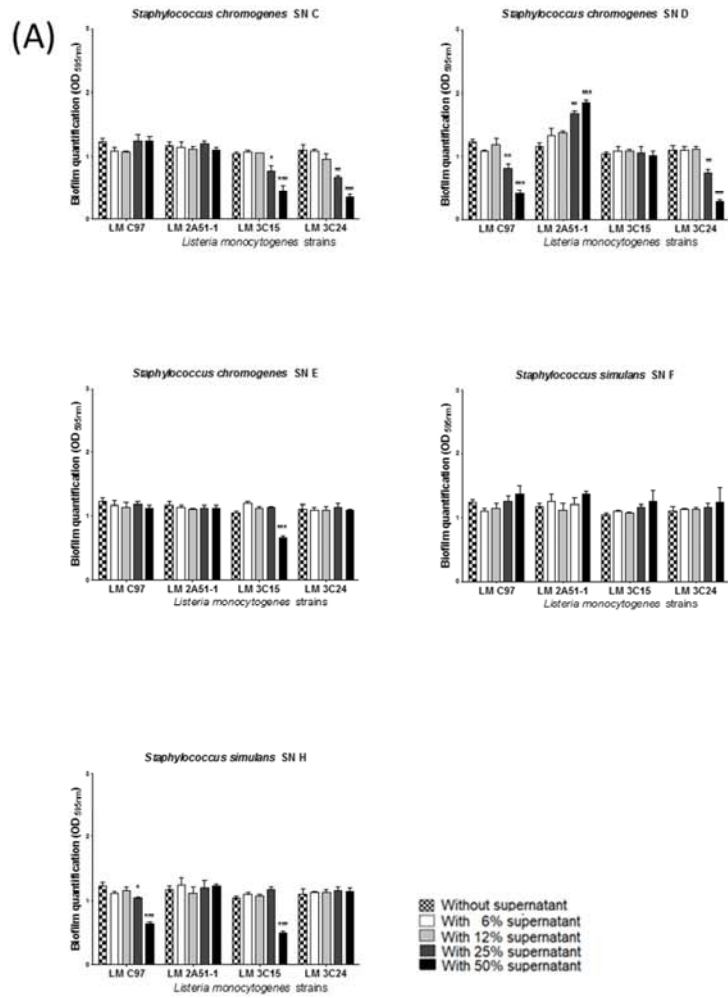
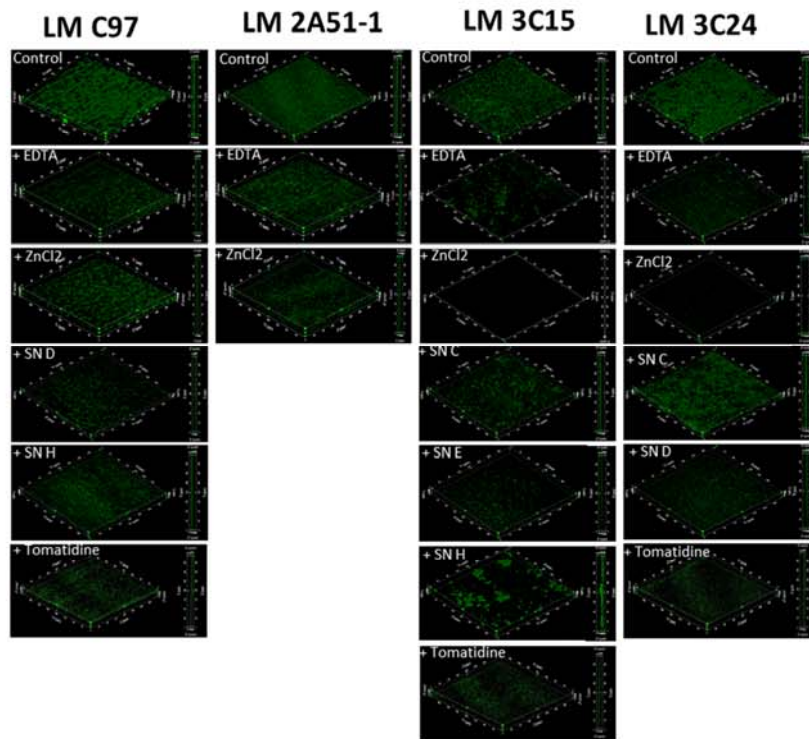


Figure 1.

(A)



(B)

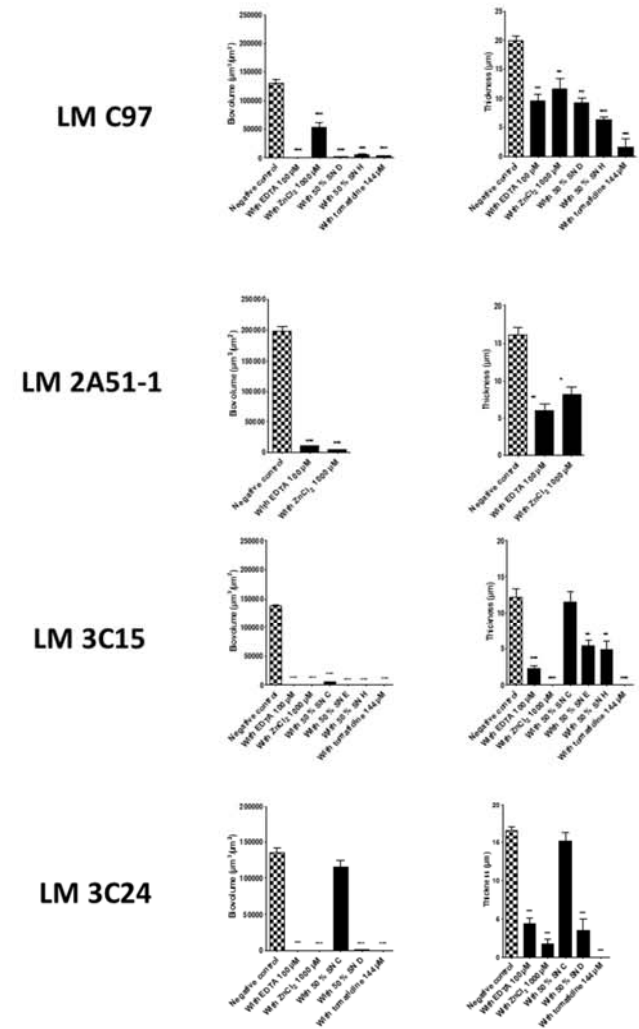


Figure 2.

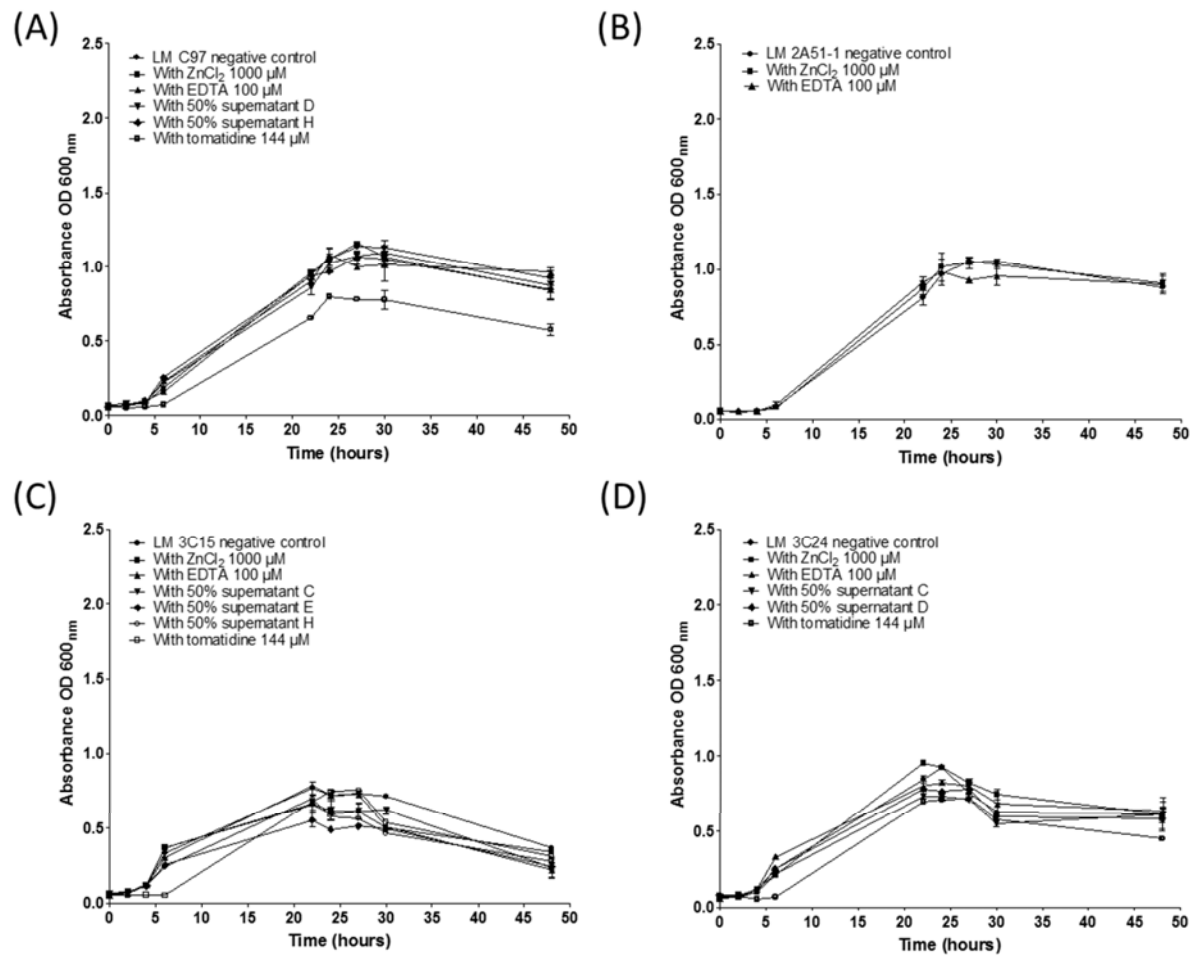
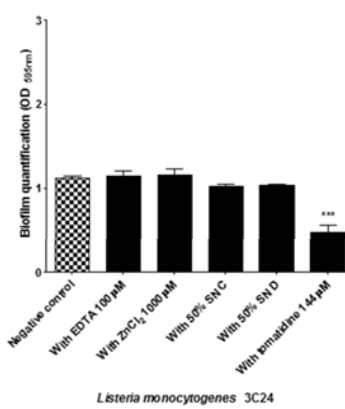
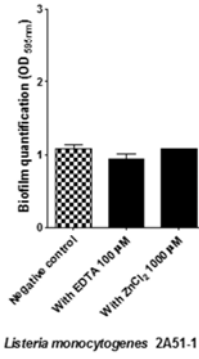
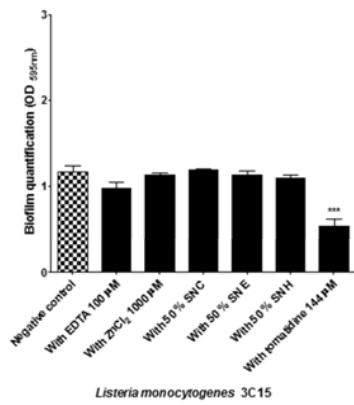
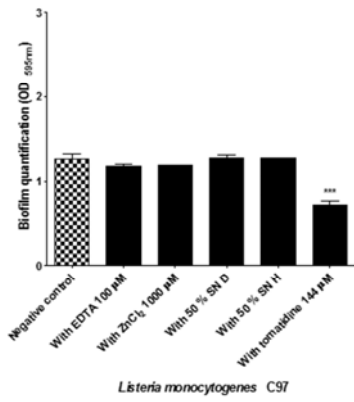


Figure 3.

(A)



(B)

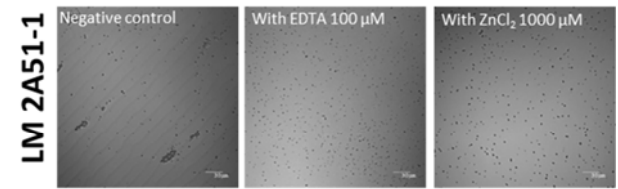


Figure 4.

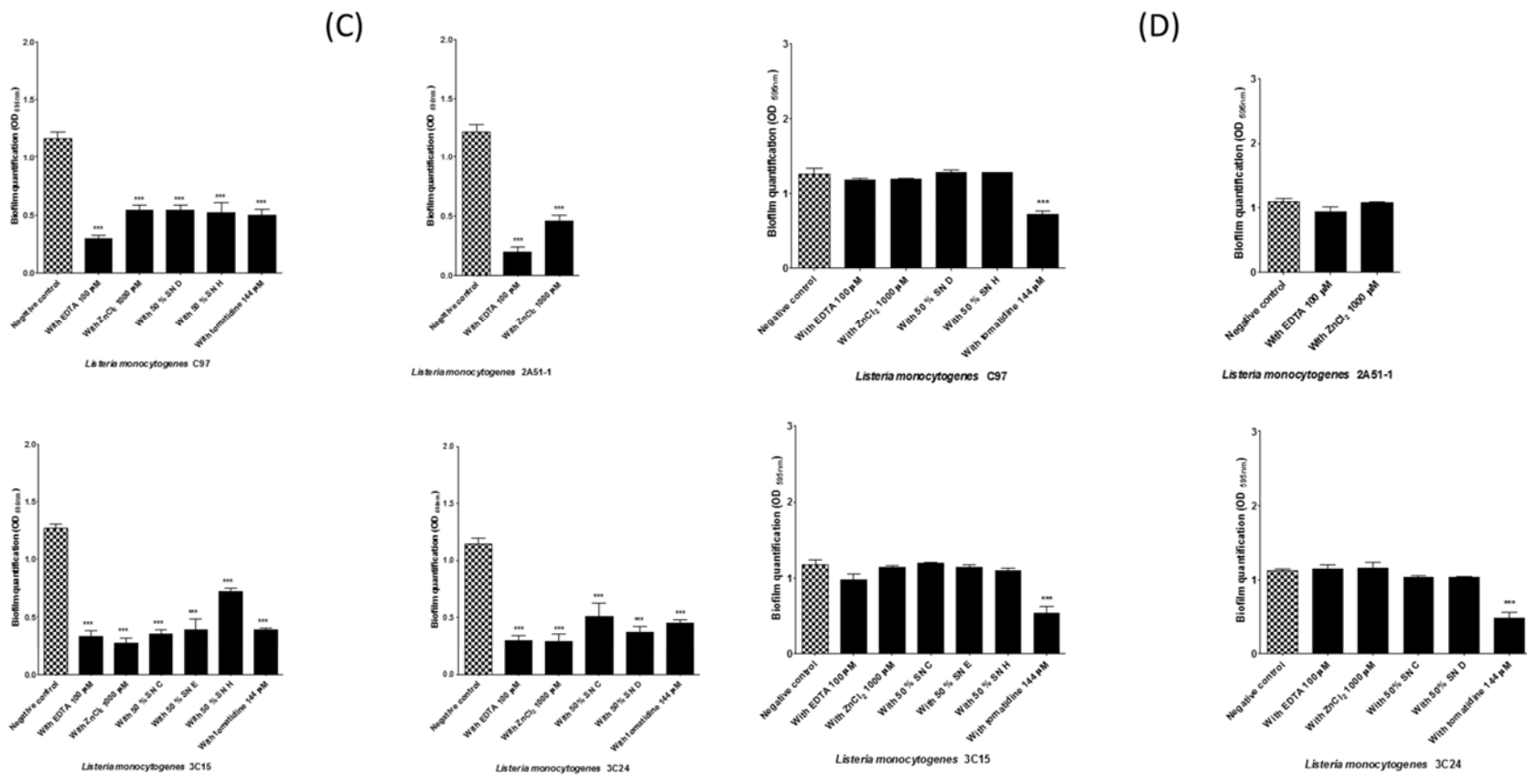


Figure 4. (suite)

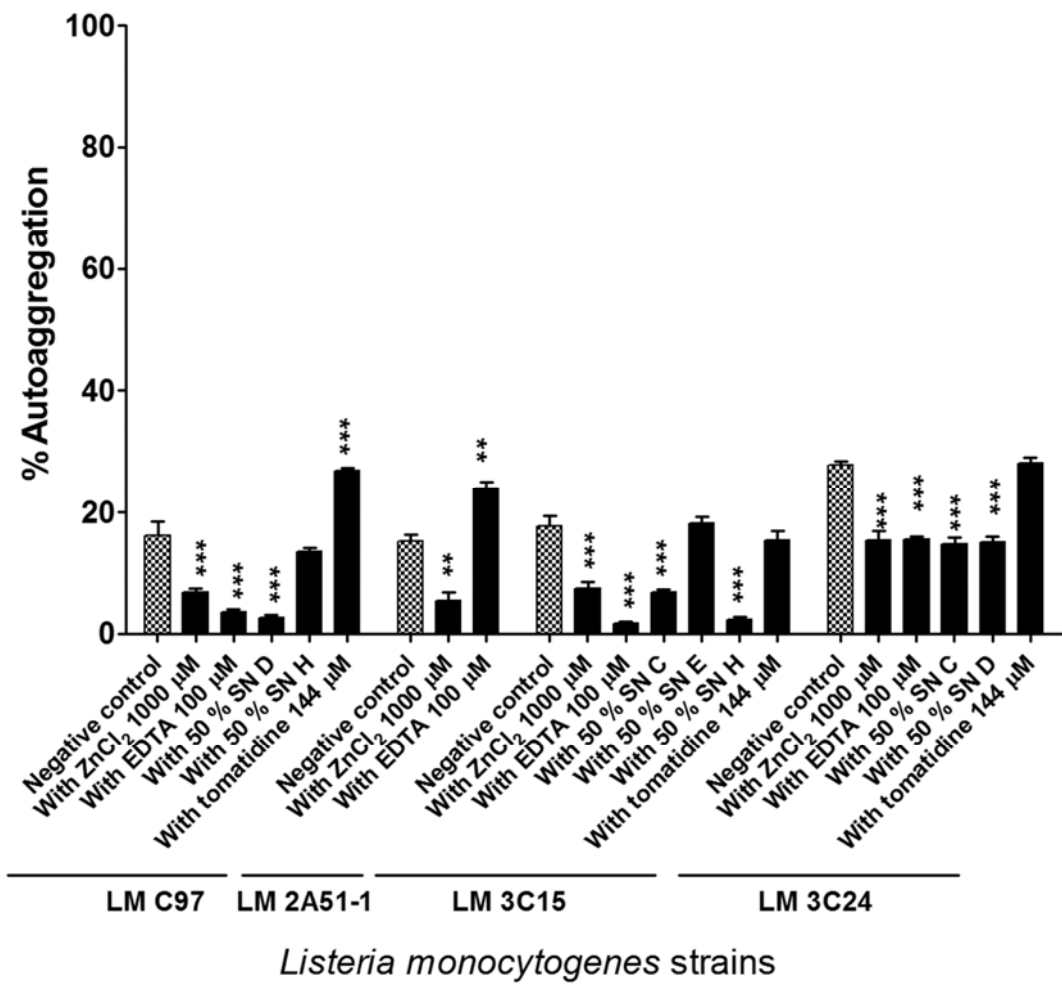


Figure 5.

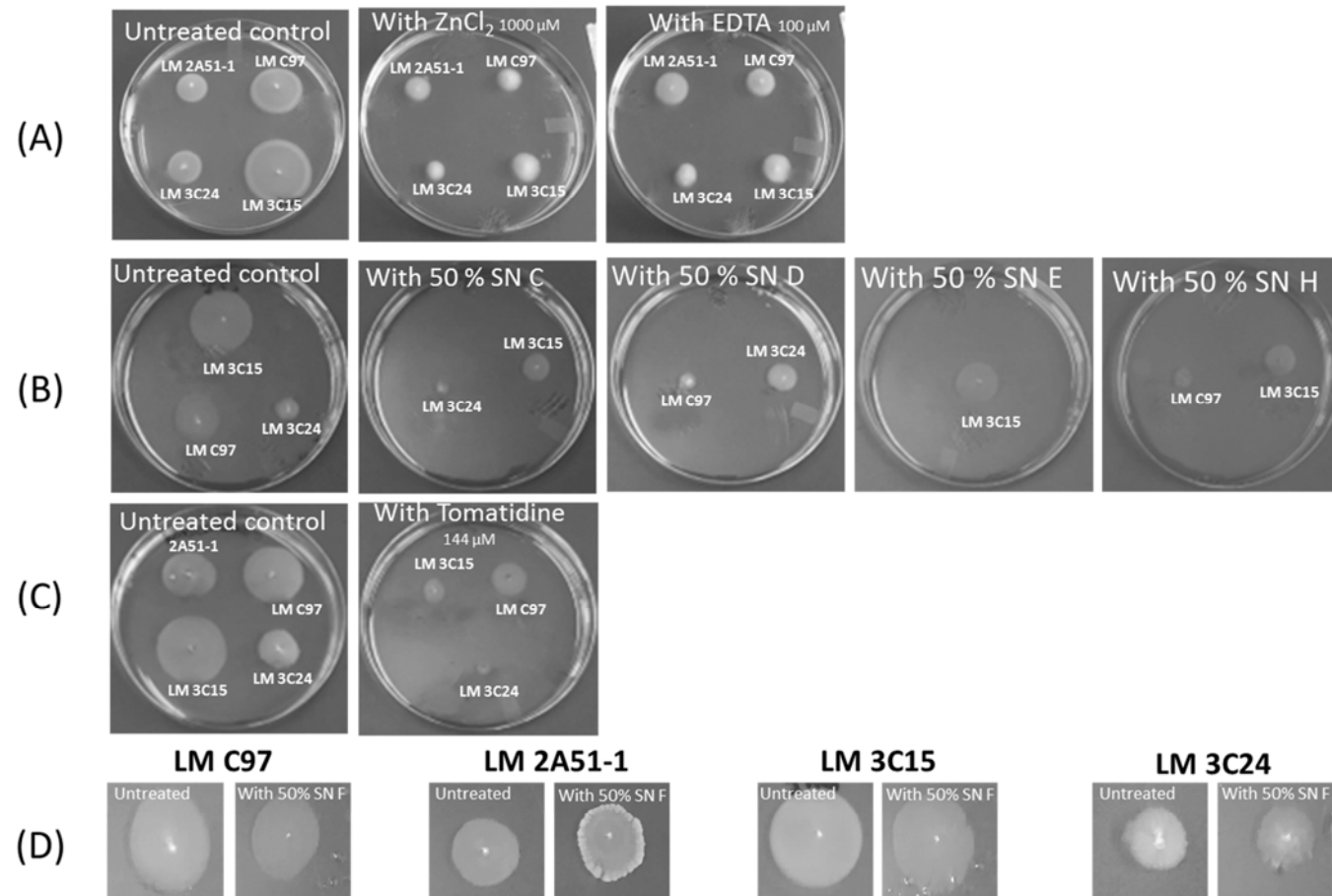
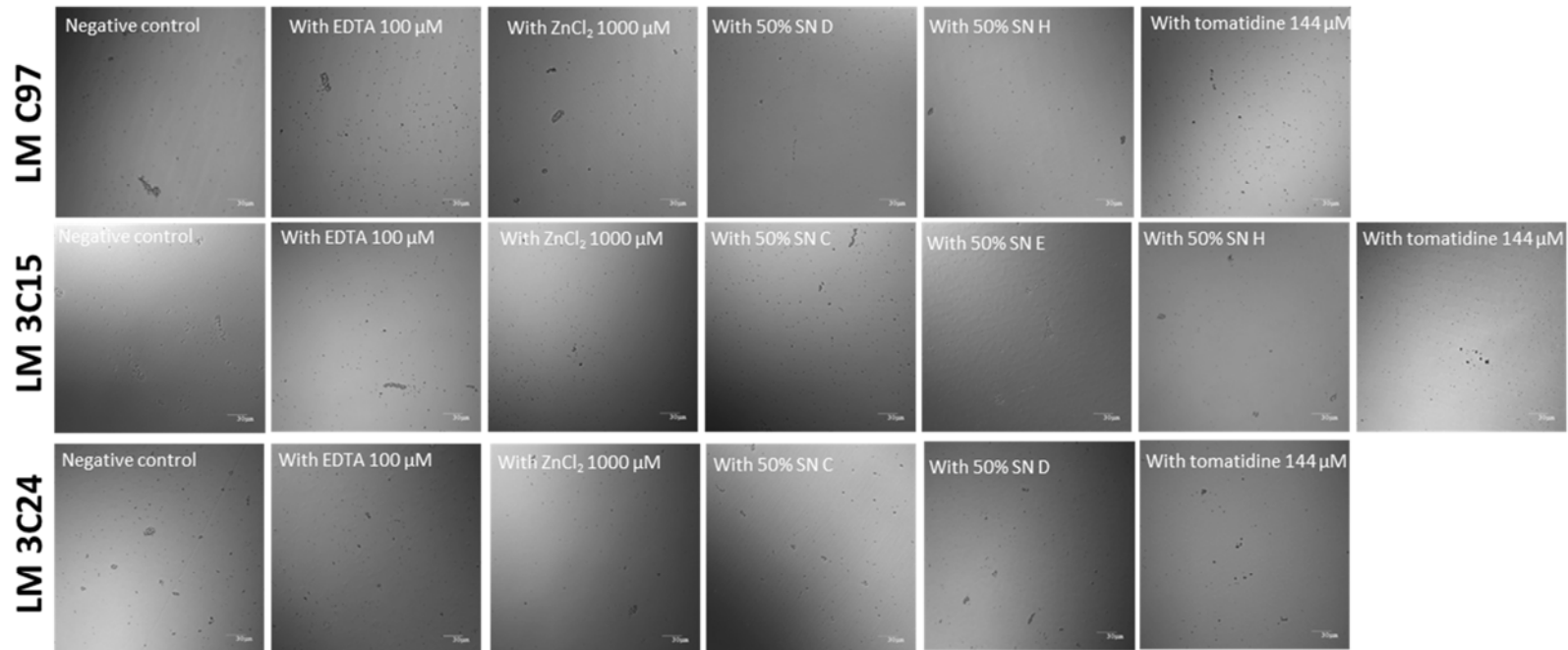
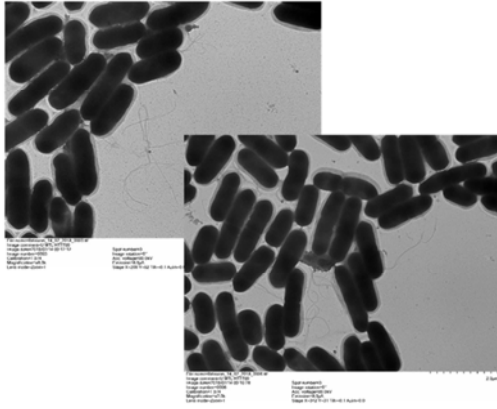


Figure 6.

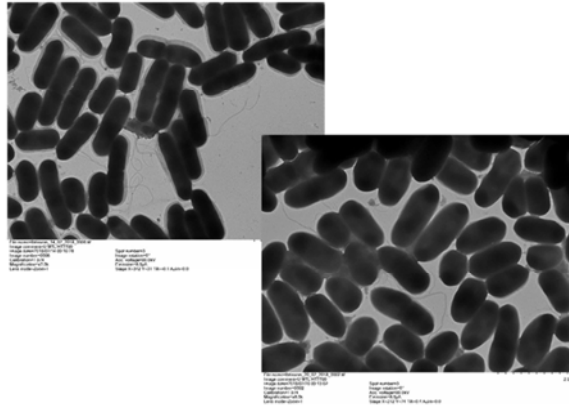


Supplementary data 1

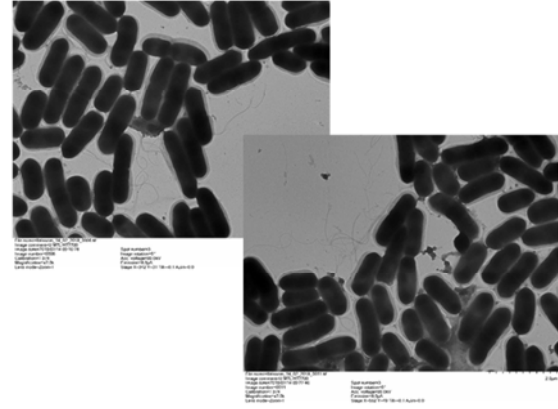
LM 2A51-1 Negative control



LM 2A51-1 with EDTA 100 μ M



LM2A51-1 with ZnCl₂ 1000 μ M



Supplementary data 2

Annexe 4

Résumé de l'affiche présentée

au congrès de l'ASM Microbe 2018, Atlanta (GA, USA), 7-11 juin 2018

Coagulase-negative Staphylococci Supernatants from Broth Cultures Prevent Intramammary Colonization by a Bovine MRSA Mastitis Strain in a Murine Model

Eric Brouillette^{¥,‡}, Coralie Goetz^{*,‡}, Mario Jacques^{*,‡}, and François Malouin^{¥,‡}

[¥]Département de biologie, Université de Sherbrooke; ^{*}Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal; [‡]Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network

Background. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are part of the normal flora in humans and are considered low virulence organisms. They are however opportunistic pathogens that frequently cause nosocomial infections. CoNS are also of clinical significance in livestock as they can provoke, among others, bovine mastitis, an inflammation of the mammary gland in dairy cattle. It has been proposed that CoNS could prevent intramammary colonization by other pathogens by a mechanism that remains to be elucidated.

Methods. The ability of CoNS supernatants obtained from broth cultures to inhibit intramammary colonization by *Staphylococcus aureus*, a major pathogen causing bovine mastitis, was assessed by using a well-characterized murine model. Mouse mammary glands were inoculated through the lactiferous duct with approximately 100 CFUs of a bovine MRSA strain (t = 0 h), and CoNS filtered supernatants were administered at the specified times by the same route. Glands were then harvested for CFU counts determination at t = 16 h post-inoculation.

Results. It was found that each culture supernatant of two strains of *Staphylococcus simulans* and two strains of *Staphylococcus chromogenes*, when administered in 100 μ L at t = 0 and 5 h, reduced *S. aureus* colonization by 3.35 to 3.84 log₁₀ ($P < 0.0001$) as compared to untreated control that yielded 8.67 log₁₀ CFU of *S. aureus*/g of gland. For comparison, the culture supernatants of *Streptococcus* species relevant to bovine mastitis were similarly tested. Supernatants from *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* had less protective effects and lowered *S. aureus* colonisation by 0.35 (NS) and 2.46 log₁₀ ($P < 0.001$), respectively. Experiments were also carried out using a filtered supernatant of *S. chromogenes* administered at different time points. Compared to saline-treated controls, the supernatant administered as a single intramammary injection (200 μ L) at t = -5, 0, or +5 h reduced the bacterial load by > 6.5 (below detection limit, $P < 0.0001$), 2.66 ($P < 0.01$) and 1.17 (NS) log₁₀ CFU/g of gland, respectively. Measurement of myeloperoxidase (MPO) activity in the mammary tissue injected with supernatants of *S. chromogenes* and *S. uberis* suggests that the extent of *S. aureus* colonization may be in part inversely correlated to the level of inflammation induced by bacterial supernatants.

Conclusion. The intramammary administration of supernatants from growth cultures of CoNS can reduce and even prevent *S. aureus* colonization in a mouse mastitis model of infection.

Character count: 2090 (2200 max – no spaces, not including title, authors and affiliations)

Keywords: coagulase-negative *staphylococci*, *Staphylococcus aureus*, bovine mastitis

Annexe 5

Affich présentée au congrès de l'ASM Microbe 2018, Atlanta (GA, USA), 7-11 juin 2018

Coagulase-Negative Staphylococci Supernatants from Broth Cultures Prevent Intramammary Colonization by a Bovine MRSA Mastitis strain in a Murine Model

*Eric Brouillette¹, Coralie Goetz², Mario Jacques² and François Malouin¹¹Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada, ²Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada.

ABSTRACT

Background. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are part of the normal flora in humans and are considered low virulence organisms. They are however opportunistic pathogens that frequently cause nosocomial infections. CoNS are also of clinical significance in livestock as they can provoke, among others, bovine mastitis, an inflammation of the mammary gland in dairy cattle. It has been proposed that CoNS could prevent intramammary colonization by other pathogens by a mechanism that remains to be elucidated. **Methods.** The ability of CoNS supernatants obtained from broth cultures to inhibit intramammary colonization by *Staphylococcus aureus*, a major pathogen causing bovine mastitis, was assessed by using a well-characterized murine model. Mouse mammary glands were inoculated through the lactiferous duct with approximately 100 CFUs of a bovine MRSA strain (t = 0 h), and CoNS filtered supernatants were administered at the specified times by the same route. Glands were then harvested for CFU counts determination at t = 16 h post-inoculation. **Results.** It was found that each culture supernatant of two strains of *Staphylococcus simulans* and two strains of *Staphylococcus chromogenes*, when administered in 100 µL at t = 0 and 5 h, reduced *S. aureus* colonization by 3.35 to 3.84 log₁₀ ($P < 0.0001$) as compared to untreated control that yielded 8.67 log₁₀ CFU of *S. aureus*/g of gland. For comparison, the culture supernatants of *Streptococcus* species relevant to bovine mastitis were similarly tested. Supernatants from *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* had less protective effects and lowered *S. aureus* colonization by 0.35 (NS) and 2.46 log₁₀ ($P < 0.001$), respectively. Experiments were also carried out using a filtered supernatant of *S. chromogenes* administered at different time points. Compared to saline-treated controls, the supernatant administered as a single intramammary injection (200 µL) at t = -5, 0, or +5 h reduced the bacterial load by > 6.5 (below detection limit, $P < 0.0001$), 2.66 ($P < 0.01$) and 1.17 (NS) log₁₀ CFU/g of gland, respectively. Measurement of myeloperoxidase (MPO) activity in the mammary tissue injected with supernatants of *S. chromogenes* and *S. uberis* suggests that the extent of *S. aureus* colonization may be in part inversely correlated to the level of inflammation induced by bacterial supernatants. **Conclusion.** The intramammary administration of supernatants from growth cultures of CoNS can reduce and even prevent *S. aureus* colonization in a mouse mastitis model of infection.

INTRODUCTION

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) and *Staphylococcus aureus* are part of the normal flora in humans and frequently cause nosocomial infections. They are also of clinical significance in livestock as they can provoke bovine mastitis, an inflammation of the mammary gland in dairy cattle. *Staphylococcus aureus* is considered a major pathogen of bovine mastitis and can cause subclinical and persistent intramammary infections (IMIs) that are difficult to treat. On the other hand, CoNS have traditionally been considered minor IMI pathogens but are increasingly recognized as emerging mastitis pathogens. CoNS can cause subclinical mastitis and, in some occasions, mild cases of clinical cases of mastitis.

It has been proposed that pre-existing IMI by CoNS have an impact on new IMI by a major pathogen like *S. aureus*. However, divergent results are found in the literature, likely revealing that the effect is probably species dependent. Actually, CoNS constitute a heterogeneous group of 48 species among whom 20 have been isolated from bovine milk. We have previously identified four CoNS isolates (*Staphylococcus chromogenes* C and E and *Staphylococcus simulans* F and I) that are able to significantly inhibit biofilm formation of staphylococcal isolates (Goetz et al., 2017). Based on this, the objective of the present study was to investigate the impact of cell-free culture supernatants produced by the four CoNS isolates on intramammary colonization by a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using a well-characterized murine model (Brouillette and Malouin, 2005).

METHODS

Preparation of bacterial mastitis isolate supernatants. *Staphylococcus chromogenes* (C and E) *Staphylococcus simulans* (I and F), *Streptococcus uberis* and *S. dysgalactiae* isolates were cultured in BHI supplemented with glucose (0.25% w/v; BHIG). Colonies from BHI agar were suspended in BHIG to a 0.5 McFarland standard and 9 mL was aliquoted in one well of 6-well plates. The plate was then incubated for 24 h at 37°C. After the incubation, supernatant was collected, centrifuged at 4000 rpm for 20 min at 4°C, filter-sterilized (0.2µm), and stored at 4°C until use.

Animal experiments: A mouse mastitis model (Brouillette et al., 2004) was used to evaluate the capacity of supernatants to reduce *S. aureus* colonization of mammary glands. Lactating mice (CD-1) were separated from their 12-14 day-old pups, anesthetized with ketamine and xylazine at 87 and 13 mg/kg of body weight. The fourth pair of glands found from the head to tail (L4 and R4 glands) was disinfected with 70% ethanol. Then, 100 µL of PBS containing ~100 bacterial CFUs of *S. aureus* MRSA bovine was slowly injected into the lactiferous duct with a 32-gauge blunt needle attached to a 1 mL syringe. Supernatants were administered as indicated. Sixteen hours after bacterial inoculation, mammary glands were harvested and homogenized. CFU counts were obtained after plating serial dilution of mammary gland homogenates on TSA. The detection limit was approximately 200 CFU per gram of mammary gland.

Myeloperoxidase (MPO) assay: Neutrophil recruitment in mammary tissues was measured by quantification of the MPO enzyme activity by the o-dianisidine-H₂O₂ method (Côté-Gravel et al., 2016). Briefly, in a 96-well microplate, 10 µL of tissue extraction supernatants were incubated with a solution of o-dianisidine hydrochloride (167 µg/mL) and 0.0005% H₂O₂ in 50 mM CTAB phosphate buffer 50 mM, pH 6.0. The MPO activity was measured kinetically with intervals of 15 s over a period of 5 min at 460 nm.

RESULTS

FIG 1. Effect of intramammary (IMAM) administration of bacterial CoNS supernatants on the colonization of the mouse mammary gland by a *S. aureus*. Filtered bacterial supernatants from growth cultures were administered (100 µL) at t = 0 and t = 5 h after IMAM inoculation of 100 CFUs of a *S. aureus* MRSA mastitis isolate. Glands were harvested 16 h post-inoculation. As controls, growth medium alone and common mastitis streptococcal species were used.

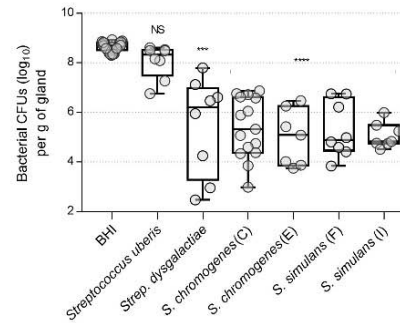


FIG 2. Neutrophil infiltration. Filtered bacterial supernatants from growth cultures were administered IMAM at t = 0 and t = 5 h, and mammary glands harvested 16 h later. Supernatants were chosen based in their differential effect on the CFU counts as shown on FIG 1.

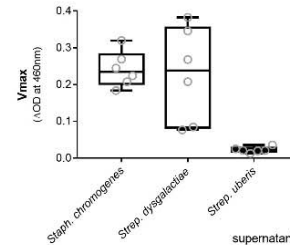
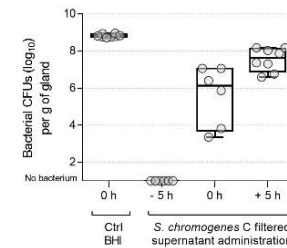


FIG 3. Effect of a CoNS supernatant administered IMAM at various times on the colonization of the mouse mammary gland by a *S. aureus*. A single injection of *S. chromogenes* (C) supernatant (200 µL) was practiced at various times in order to compare the prophylactic and therapeutic approach.



CONCLUSION

- Coagulase-negative staphylococci (CoNS) supernatants, previously chosen based on their capacity to reduce biofilm formation *in vitro* (Goetz et al., 2017), inhibit mammary gland colonization by a bovine MRSA strain in the mouse.
- The supernatants of two streptococcal mastitis isolates have a reduced capacity to inhibit colonization compared to CoNS in the murine model.
- The protective effect of CoNS supernatants (*i.e.*, the anti-colonization effect on *S. aureus*) is optimal when administered for prophylaxis.
- An inverse correlation is observed between neutrophil infiltration and the number of *S. aureus* cells recovered in tissues after 16 h of infection, suggesting that inflammation and/or stimulation of the innate immune response is responsible for the protective effect of CoNS against *S. aureus*.
- Whereas it appears that phagocyte infiltration could be the main reason for the reduce numbers of *S. aureus* found in tissue, a more complex effect provoked by the CoNS on the immune system may take place and should be investigated.

REFERENCES

- Brouillette et al., 2004. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. Vet Microbiol. 6:101-114.
- Brouillette and Malouin, 2005. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. Microbes Infect. 7:193-203.
- Côté-Gravel et al., 2016. Characterization of a virulent mutant of a genetically stable *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variant and Preliminary Assessment for Use as a Live-Attenuated Vaccine against Intramammary Infections. PLoS One. 11(11):e0165921.
- Goetz et al., 2017. Coagulase-negative staphylococci species affect biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. J Dairy Sci. 100(6):6454-6464.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Dairy Research Cluster II (Dairy Farmers of Canada, Agriculture and Agri-Food Canada, Canadian Dairy Network, Canadian Dairy Commission) through the Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network. CC is the recipient of a NSERC CREATE scholarship in milk quality and from Regroupement PRO-2N. Outcomes pour un lait de qualité optimale (Op-Lait). Op-Lait also supports the mouse model technology platform.