

CARACTÉRISATION DE L'EFFET ANTIBIOFILM ET ANTIBACTÉRIEN DU CHITOSANE SUR LES SOUCHES
DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESPONSABLES DES MAMMITES BOVINES

par

Abdelhamid Asli

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, décembre 2016

Le 16 décembre 2016

*le jury a accepté le mémoire de Monsieur Abdelhamid Asli
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur François Malouin

Directeur de recherche

Département de biologie

Professeur Mario Jacques

Codirecteur de recherche

Département de pathologie et microbiologie

Professeur Ryszard Brzezinski

Évaluateur interne

Département de biologie

Professeur Sébastien Roy

Président-rapporteur

Département de biologie

SOMMAIRE

La mammite bovine est l'inflammation des tissus internes de la glande mammaire des vaches laitières. Elle est la plupart du temps causée par l'intrusion d'agents pathogènes dans le canal du trayon de la glande mammaire causant ainsi une infection intramammaire (IIM). La mammite engendre des pertes économiques importantes pour l'industrie laitière en raison de la faible production du lait, des coûts de traitements élevés, la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait suite à leur utilisation, le rejet de lait non destiné à la consommation et les faibles taux de rendement pendant la transformation du lait en divers produits laitiers. Le développement de l'inflammation est souvent associé au degré d'exposition des glandes mammaires aux pathogènes. *Staphylococcus aureus* est le pathogène le plus souvent responsable de la mammite bovine au Canada. Il est capable de causer des infections intramammaires persistantes sous-cliniques souvent réfractaires à l'antibiothérapie. En outre, le biofilm représente un facteur de virulence clé dans la persistance de *S. aureus* pendant la mammite, car il augmente la résistance des bactéries contre les antibiotiques grâce à la matrice extracellulaire qui recouvre et protège la communauté. Le biofilm représente donc, une problématique majeure de l'industrie laitière et le besoin de nouveaux outils thérapeutiques alternatifs adressant ce facteur de virulence est très urgent.

Le chitosane est une molécule naturelle extraite de la carapace des crustacés. Elle est exploitée pour de multiples applications biologiques, y compris certaines activités antibiofilm. Dans cette étude, nous avons démontré que les formes de 2,6 kDa et 4 kDa empêchaient la production de biofilm des souches : *S. aureus* 2117 (forte productrice du biofilm) et le SARM bovin (*S. aureus* résistant à la méthicilline). Chez la souris, l'administration d'un chitosane de 2,6 kDa n'a démontré aucun effet inflammatoire comparativement au 4 kDa. Les tests de bactéricidie ont démontré que le 2,6 kDa était capable de tuer les bactéries incorporées dans les biofilms préformés d'une manière dose-réponse avec une réduction de $> 3 \log_{10}$ CFU / biofilm à la concentration de 4 mg / ml. En culture cellulaire, nous avons observé que le chitosane de 2,6 kDa pouvait empêcher la persistance du SARM bovin dans les cellules épithéliales bovines MAC-T. Les tests de combinaison sur plaque ont révélé que le 2,6 kDa produit une synergie avec les

antibiotiques de la classe des macrolides (par exemple, la tilmicosine) contre *S. aureus*, en réduisant la CMI des deux molécules par 2-8 fois. Finalement, l'administration intramammaire de 2,6 kDa, seul ($p < 0,01$) ou en combinaison avec la tilmicosine ($p < 0,0001$), a réduit la colonisation de *S. aureus* dans les glandes mammaires de notre modèle de mammite aigu murin.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, SARM bovin, biofilm, chitosane, tilmicosine, infection intramammaire (IIM).

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de recherche le Dr François Malouin, professeur à l'Université de Sherbrooke, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je lui suis également très reconnaissant pour sa disponibilité, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. Je lui adresse ma très grande gratitude car j'ai appris beaucoup de choses sous sa direction.

J'adresse également un chaleureux remerciement à mon co-directeur de recherche le Dr Mario Jacques, professeur à l'Université de Montréal, pour sa disponibilité, ses conseils avisés et son écoute, qui ont été essentiels pour la bonne réussite de ce projet.

Je tiens à exprimer également toute ma gratitude à mes conseillers de recherche : le Dr Ryszard Brzezinski et le Dr Sébastien Roy, les deux professeurs à l'Université de Sherbrooke, pour leur implication et leurs conseils tout le long du projet.

Je désire également exprimer mes remerciements aux professionnels de recherche : M. Éric Brouillette, Mme Céline Ster ainsi que tous les collègues du laboratoire, pour leurs soutiens tout au long du projet.

Je dois vivement remercier ma chère femme, pour son soutien pendant tous les moments difficiles qu'on a vécu ensemble.

Je désire également remercier les fonds de recherche du Réseau Canadien de Recherche sur la Mammite Bovine et la Qualité du Lait (RCRMBQL) pour le support financier au projet, ainsi que le Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale (Op+Lait) supporté par le FRQNT, les Fonds de Recherche du Québec, Nature et Technologies (St-Hyacinthe, Québec, Canada), pour m'avoir offert une bourse de complément salarial.

Enfin, je dois vivement remercier ma chère mère, mes chers frères et sœurs pour leur support, malgré la grande distance qui nous sépare. Je dédie particulièrement ce travail à la mémoire de mon père.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iv
REMERCIEMENTS	vi
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES	xii
CHAPITRE 1	1
INTRODUCTION	1
1.1. Mammite bovine	2
1.1.1. Mammite sous-clinique	3
1.1.2. Mammite clinique.....	4
1.2. Pathogènes impliqués dans la mammite bovine.....	4
1.3. Traitement de la mammite bovine.....	5
1.3.1. Traitement de la mammite bovine au Canada	6
1.3.2. Traitement de la mammite bovine aux États-Unis	7
1.3.3. Traitement de la mammite en Europe.....	7
1.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.4.1. Généralités.....	8
1.4.2. Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i>	9
1.4.2.1. Adhésines.....	9
1.4.2.2. Superantigènes : entérotoxines staphylococciques et la toxine TSST-1.....	11
1.4.2.3. Hémolysines ou cytotoxines	11
1.4.2.4. Biofilm des staphylocoques	12
1.4.2.4.1. Introduction	12
1.4.2.4.2. Infections liées aux biofilm de <i>S. aureus</i>	13
1.4.2.4.3. Les bases moléculaires de la formation du biofilm de <i>S. aureus</i>	13
1.4.2.4.3.1. Attachement aux surfaces abiotiques et biotiques.....	14
1.4.2.4.3.2. Maturation du biofilm.....	15

1.4.2.4.3.2.1. Mécanisme dépendant de l'opéron <i>icaADBC</i> : Adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA)	15
1.4.2.4.3.2.2. Mécanismes indépendants de l'opéron <i>icaADBC</i>	17
1.4.2.4.3.2.3. Structuration du biofilm.....	17
1.4.2.4.3.3. Dispersion du biofilm	18
1.4.2.4.4. Facteurs aidant à la formation du biofilm	18
1.4.2.4.4.1. Caractéristiques de la surface	19
1.4.2.4.4.2. Les propriétés du milieu	19
1.4.2.4.4.3. L'importance du film protéique dans la formation du biofilm	19
1.4.2.4.4.4. Les propriétés de la surface cellulaire	20
1.4.2.4.5. Quorum sensing et biofilm de <i>S. aureus</i>	20
1.4.2.4.6. Résistance du biofilm	21
1.4.2.4.7. Régulation du biofilm.....	22
1.4.2.4.8. Facteurs externes agissant sur le biofilm	24
1.5. Chitosane et ses propriétés biologiques	26
1.5.1. Généralités sur la chitine, le chitosane et ses dérivés	26
1.5.2. Production des molécules de CHOS.....	27
1.5.3. Enzymes agissant sur la chitine et le chitosane	28
1.5.3.1. Chitinases et chitosanases	28
1.5.4. La production de CHOS – la méthode enzymatique	29
1.5.4.1. Dégradation du chitosane par les chitinases de la famille 18	29
1.5.4.2. Dégradation du chitosane par les chitinases de la famille 19	29
1.5.4.3. Dégradation du chitosane par les chitosanases de la famille 46	30
1.5.5. Production de CHOS - Méthodes chimiques.....	30
1.5.5.1. L'hydrolyse acide du chitosane	30
1.5.5.2. La synthèse chimique du CHOS	31
1.6. Application du chitosane et ses dérivés.....	31
1.6.1. Effet anti-inflammatoire du chitosane	32
1.6.2. Inhibition du développement des tumeurs.....	33
1.6.3. Effet antifongique du chitosane	33
1.6.4. Effet antibactérien du chitosane	34
1.6.5. Prévention de l'adhérence bactérienne aux cellules humaines.....	35
1.6.6. Effet antibiofilm du chitosane	36

1.7. Contexte, hypothèse et objectifs de recherche	36
CHAPITRE 2	39
ARTICLE 1	39
2.1. Avant-propos	39
2.2. Contributions	39
2.3. Résumé de l'article	40
2.4. Insertion de l'article	41
ABSTRACT	42
INTRODUCTION	43
MATERIALS AND METHODS	45
RESULTS	51
DISCUSSION	66
CONCLUSION	69
ACKNOWLEDGEMENTS	70
REFERENCES	71
CHAPITRE 3	79
DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE	79
CONCLUSION GÉNÉRALE	83
BIBLIOGRAPHIE	84

LISTE DES ABREVIATIONS

Agr: *Accessory gene regulator*

AINS: Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AIP: *Auto inducing peptide*

AIS: Anti-inflammatoires stéroïdiens

ARN: Acide ribonucléique

CHOS : Chitooligosaccharides

DD : Degré de déacétylation

DP : Degré de polymérisation

GH : Glycosyl hydrolases

GlcNAc: *N-Acetyl-glucosamine*

IcaADBC: *Intercellular adhesion gene cluster ADBC*

IIM: Infection intramammaire

LMW: *Low molecular weight*

MMAM: Modèle de mammite aigue murin

MSCRAMMs: *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*

PBP: *Penicillin-binding protein*

PIA: *Polysaccharide intercellular adhesin*

PSM: *Phenol-soluble modulins*

QS: *Quorum sensing*

RCRMBQL : Réseau Canadien de Recherche sur la Mammite Bovine et la Qualité du Lait

SarA: *Staphylococcal accessory regulator*

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SCC: *Somatic cell count*

SCCmec: *Staphylococcal cassette chromosome mec*

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2- Article 1

Table 1. MICs of the various forms of chitosan against <i>S. aureus</i>	52
Table 2. Inflammation scores obtained after administration of chitosan by intramammary injection in mice.	55
Table 3. Antibiotic and chitosan (LMW 2.6 kDa) MICs in a checkerboard assay against <i>S. aureus</i> ATCC 29213.....	58

LISTE DES FIGURES

Liste des figures : CHAPITRE 1

- FIGURE 1.** Les facteurs de pathogénicité de *S. aureus*. (Tiré de Gordon et Lowy, 2008). 10
- FIGURE 2.** Les différentes phases du développement du biofilm (Tiré de Otto, 2013). 14
- FIGURE 3.** Les étapes de la biosynthèse du PIA chez *S. epidermidis* (Vuong et al, 2004)..... 16
- FIGURE 4.** Les étapes d’autoactivation d’Agr (Tiré de Novick et Geisinger, 2008). 23

Liste des figures: CHAPITRE 2 –Article

- FIGURE 1.** Antibiofilm activity of the different forms of chitosan against MRSA 1158c and the biofilm hyperproducer strain 2117.....53
- FIGURE 2.** Relative innocuity of different forms of chitosan in cows.....55
- FIGURE 3.** Effect of the LMW 2.6 kDa chitosan on LDH release from MAC-T bovine mammary epithelial cells.....56
- FIGURE 4.** Time–kill experiments showing the viability of *S. aureus* untreated (Ctrl) or in the presence of increasing concentrations of the LMW 2.6 kDa chitosan, (A) for strain MRSA1158c, and (B) for the biofilm hyperproducer strain 2117.....57
- FIGURE 5.** Viability of *S. aureus* 2117 and MRSA either untreated (CTRL) or in the presence of a sub-MIC of chitosan (LMW 2.6 kDa chitosan, CHITO) used alone or in combination with a sub-MIC of (A) erythromycin (ERY) or (B) tilmicosin (TIL) at

10 h post-inoculation.....	59
FIGURE 6. Preformed biofilms of <i>S. aureus</i> strains exposed to the LMW 2.6 kDa chitosan.....	61
FIGURE 7. Bactericidal activity of increasing concentrations of tilmicosin used alone or in combination with a fixed sub-MIC of the LMW 2.6 kDa chitosan against <i>S. aureus</i> strains embedded in preformed biofilms.....	62
FIGURE 8. Evaluation of internalization (A) and persistence (B) of the MRSA strain 1158c into MAC-T cells after exposure to the LMW 2.6 kDa chitosan used at different Concentrations	63
FIGURE 9. Efficacy of the LMW 2.6 kDa chitosan used alone or in combination with tilmicosin on <i>S. aureus</i> in a mouse mastitis model.....	65

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

La mammite bovine est définie comme étant l'inflammation des tissus internes de la glande mammaire des vaches laitières (Aitken et al, 2011). Elle est la plupart du temps causée par l'insinuation d'agent pathogène dans le canal du trayon de la glande mammaire causant une infection intramammaire (IIM). Malgré la présence de la kératine dans le canal du trayon qui bloque en quelque sorte l'entrée des bactéries pathogènes, ces dernières sont capables de pénétrer et de causer des dommages plus ou moins graves aux tissus de la glande mammaire (Capuco et al, 1994). La santé du pis des vaches demeure la grande préoccupation des producteurs laitiers, car la mammite peut engendrer des pertes colossales qui peuvent atteindre jusqu'à 400 millions de dollars par année au Canada (RCRMBQL). Sa prévalence est évaluée à 23 % chez les vaches laitières (Riekerink et al, 2008). Selon la sévérité de l'inflammation, la mammite est divisée en deux groupes : la mammite sous clinique et la mammite clinique. Les méthodes de diagnostic sont généralement différentes, car la mammite sous clinique est identifiée par la détermination du compte de cellules somatiques dans le lait (CCS), alors que la mammite clinique est identifiée par des signes cliniques qui se manifestent par des symptômes locaux au niveau du pis ou généraux sur l'ensemble de la vache (Peters et al, 2015). Riekerink et ses collaborateurs (2008) ont démontré que la mammite est causée par plusieurs pathogènes et que *Staphylococcus aureus* est l'agent infectieux le plus fréquent dans tous les échantillons du lait analysés et récoltés sur l'ensemble des dix provinces canadiennes (Riekerink et al, 2008). Il est également le pathogène le plus isolé dans les cas de mammite au Canada (Reyher et al, 2011). Cette étude a démontré que la prévalence de *S. aureus* est estimée à 2,4% en période de lactation et de 3% en période de tarissement pour la mammite sous-clinique.

Staphylococcus aureus est une bactérie versatile impliquée dans plusieurs types d'infections notamment, les infections nosocomiales et les infections des glandes mammaires (Otto et al, 2013, Reyher et al, 2011). Ce micro-organisme est capable d'exprimer plusieurs facteurs de virulence et apte à développer une résistance à la méthicilline d'où le nom de SARM

(*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline). Cette résistance est due à l'acquisition du gène *mecA* qui fait partie de la cassette chromosomique des staphylocoques (SCCmec). Le gène *mecA* code pour la protéine membranaire liant la pénicilline PBP2a et qui est caractérisée par une faible affinité pour les antibiotiques β -lactamines (Lim et al, 2002). Les facteurs de virulence de *S. aureus* appartiennent à deux groupes : les protéines de surface ou adhésines et les exoprotéines tel que les nucléases et les protéases, ainsi que les entérotoxines et la toxine du syndrome du choc toxique (TSST-1) (Bien et al, 2011). Ces facteurs sont sous le contrôle d'un système appelé quorum sensing agr (*accessory gene regulator*) (Novick et al, 2008). Ce système possède, via la molécule d'ARNIII, la capacité de réguler l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion des bactéries aux surfaces lors de la colonisation : étape de la formation du biofilm et la production des toxines lors de la dissémination. Cette étape de la production des toxines est généralement accompagnée par une réduction de la colonisation, permettant ainsi la dissémination des bactéries et la colonisation de nouveaux sites d'infections (Otto et al, 2013). Le biofilm est un facteur clé impliqué dans la persistance de *S. aureus* dans la mammite bovine (Cucarella et al, 2004). Costerton et ses collaborateurs (1999) ont définis le biofilm comme étant une communauté de cellules bactériennes attachée à des surfaces inertes ou vivantes et recouvertes par une matrice extracellulaire synthétisée par elles-mêmes. Cette matrice extracellulaire assure la protection et la cohésion des bactéries entre elles, absorbe l'eau et piège les petites particules circulantes. Elle facilite également la survie des bactéries dans des environnements hostiles où les nutriments sont limités. En outre, le biofilm diminue l'efficacité des peptides antimicrobiens, constituants principaux du système de défense épithélial inné de l'hôte, nuit à la phagocytose par les phagocytes pendant l'infection et augmente la résistance aux antibiotiques (Hoiby et al, 2010; Otto, 2012). Le biofilm représente donc, une problématique majeure de l'industrie laitière et la nécessité de nouveaux outils thérapeutiques alternatifs est très urgente.

1.1. Mammite bovine

Dans l'industrie laitière canadienne, la mammite bovine représente un problème majeur sur le plan économique à cause de la diminution de la production de lait, l'élimination du lait non consommable, des pertes de rendement pendant la transformation du lait en divers produits,

l'augmentation des coûts des traitements vétérinaires et l'abattage précoce des vaches ou la réforme hâtive (Thompson-Crispi et al, 2015). La mammite est plus souvent définie comme étant l'inflammation de la glande mammaire qui résulte suite à l'intrusion d'un agent pathogène dans l'environnement de cette glande. Ceci provoque la perturbation des barrières physiques telles que le trayon, ce qui nécessite une défense rapide de l'hôte afin de prévenir la colonisation et la génération de la maladie (Aitken et al, 2011). Riekerink et ses collaborateurs (2008) ont démontré que la mammite peut être causée par plusieurs espèces bactériennes telles que : par ordre d'importance, *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus uberis*, les staphylocoques à coagulase négatifs (SCN), *Klebsiella spp*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Enterococcus spp*, *Streptococcus spp* et les levures (Riekerink et al, 2008). L'espèce *S. aureus* peut provoquer diverses formes d'infection mammaire suivant qu'elle soit accompagnée ou non par des signes cliniques. On distingue alors : des mammites sous-cliniques où l'infection est silencieuse et sans signes cliniques apparents et les mammites cliniques accompagnées de symptômes cliniques visuels (De Vliegher et al, 2012).

1.1.1. Mammite sous-clinique

Pendant la mammite sous clinique, l'inflammation est généralement silencieuse, car elle ne présente aucun signe visuel (De Vliegher et al, 2012). Les glandes mammaires ont une apparence normale et le lait de point de vue macroscopique possède également un aspect normal. L'absence du traitement causera la propagation de la maladie dans les troupeaux et la contamination des citernes de lait et par conséquent, alourdir les pertes économiques de l'industrie laitière (Halasa et al, 2007). Sur le plan cytologique et bactériologique, la mammite sous-clinique provoque une augmentation du nombre de cellules somatiques, dont les neutrophiles, dans le lait, suite à leur migration au niveau du site d'infection (Van Oostveldt et al, 2001). D'ailleurs le compte de cellules somatiques (CCS) dans le lait représente l'un des moyens de diagnostic les plus utilisés pour vérifier l'état de la glande mammaire (Halasa et al, 2007). Lorsque le CCS est supérieur à 50 000 cellules/ml, la composition du lait change considérablement dans les quartiers du pis de la vache (Forsbäck et al, 2009). La mammite sous-clinique provoque également des changements majeurs dans la composition du lait et augmente le risque de la lipolyse et la protéolyse

(Forsbäck et al, 2009). Les bactéries à Gram positif tel que *S. aureus* sont généralement les pathogènes les plus importants de la mammite sous-clinique (Riekerink et al, 2008), alors que les bactéries environnementales telles que les entérobactéries peuvent rarement en causer.

1.1.2. Mammite clinique

Contrairement à la mammite sous-clinique, la mammite clinique est l'inflammation de la glande mammaire accompagnée par des signes cliniques. Elle peut être classée selon la sévérité de l'inflammation, en trois catégories : légère, modérée ou sévère. Pendant l'inflammation légère, l'apparition des grumeaux dans le lait représente l'unique signe clinique. Les grumeaux résultent de l'agglomération de leucocytes, des débris de tissus et de protéines. Lorsqu'il ya l'ajout d'un deuxième signe clinique, on parle alors d'un cas clinique modéré. Dans ce cas, le quartier devient chaud, enflé et douloureux, suite au blocage des conduits par les grumeaux en empêchant ainsi le drainage des alvéoles et par conséquent, il y aura moins de lait produit. La mammite clinique sévère se manifeste par la présence de toxines produites par des bactéries résidentes dans la glande mammaire. Ces toxines peuvent passer dans la circulation sanguine et provoquent une septicémie qui se manifeste par une faiblesse de la vache, des yeux creux, une anorexie et une réduction de contractilité du rumen et diarrhée (Lévesque, 2006). La mammite clinique peut être causée par des bactéries persistantes ou non persistantes. L'agent infectieux *S. aureus* est capable de résister et de persister à la phagocytose par les macrophages et les polynucléaires dans la glande mammaire en exprimant plusieurs facteurs de virulence (Sutra et Poutrel, 1994 ; Oviedo-Boyso et al, 2007). En effet, les facteurs de virulence tels que les toxines super-antigéniques, la protéine de surface A, la capsule polysaccharidique et la production de biofilm, vont lui permettre d'échapper du système immunitaire de l'hôte et développer des infections chroniques.

1.2. Pathogènes impliqués dans la mammite bovine

Plusieurs pathogènes ont le pouvoir de causer la mammite bovine. La prévalence de ces pathogènes varie alors selon le type d'infection. Riekerink et ses collaborateurs (2008) ont

analysé des échantillons de lait provenant de fermes laitières sur dix provinces canadiennes et ils ont trouvé que l'espèce *S. aureus* était le pathogène le plus fréquemment retrouvé dans tous les échantillons analysés suggérant alors que ce dernier est impliqué dans des mammites sous-cliniques (Riekerink et al, 2008). Grâce à ses protéines de surface ou les adhésines tels que la protéine A, certaines souches de *S. aureus* sont capables de s'attacher aux surfaces cellulaires et initier la première étape de la formation du biofilm (Costerton et al, 1999). Le biofilm rendra les bactéries moins susceptibles aux antibiotiques et leur permettra de persister et de coloniser l'épithélium mammaire et provoquer alors des mammites sous-cliniques persistantes (Melchior et al, 2006, 2007). Les souches de *S. aureus* ont la capacité également de s'internaliser et de se multiplier dans les cellules épithéliales (Brouillette et al, 2005). Une fois à l'intérieure, *S. aureus* exprime d'autres facteurs de virulence tels que l'alpha-hémolysine lui facilitant l'invasion et la pénétration du parenchyme mammaire (Oviedo-Boyso et al, 2007). Ces toxines peuvent se rendre à la circulation sanguine et causer une septicémie en établissant ainsi, une mammite clinique sévère (Piccinini et al, 2012). Les mammites cliniques peuvent être également causées par des pathogènes de l'environnement. En effet, des études ont démontré que certaines bactéries telles qu'*Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae* et *Streptococcus uberis* peuvent passer dans le canal du trayon lors des périodes de traite et provoquent des mammites cliniques (McDougall et al, 2007; Persson Waller et al, 2009).

1.3. Traitement de la mammite bovine

Dans l'industrie laitière, les infections intramammaires sont la cause principale de l'utilisation des antibiotiques. Par ailleurs, l'antibiothérapie demeure la stratégie principale dans le traitement des mammites cliniques. Toutefois, l'émergence de la résistance et la faible réponse des bovins aux antibiotiques développent de sérieux problèmes, car l'administration des doses inadéquates (fortes ou faibles doses) pourrait participer à l'émergence de la résistance et l'apparition des bactéries résistantes dans la chaîne alimentaire (Gomes et al, 2016). Bannerman et al (2005) ont démontré que les vaches transgéniques productrices de la lysostaphin dans leur lait ne démontraient pas de signes cliniques comparativement aux vaches normales infectées par *S.*

aureus, car la lysostaphin produite dans le lait des vaches transgéniques était capable d’agir sur les souches de *S. aureus* et par conséquent, éliminer l’infection à *S. aureus* (Wall et al, 2005).

1.3.1. Traitement de la mammite bovine au Canada

Au Canada, plusieurs modalités de traitements sont mises en place dépendamment de la sévérité de la mammite bovine, car il existe des traitements conventionnels et des traitements alternatifs. Pour les traitements conventionnels, les producteurs peuvent dans certains cas, utiliser les antibiotiques tels que : la pénicilline, les combinaisons contenant la pénicilline et la colistine, les céphalosporines (céftiofur), la tétracycline, la combinaison triméthoprim-sulfonamide et les lincosamides (pirlimycine), afin d’éliminer les signes cliniques de l’infection et bien sûr, de soulager les souffrances de la vache (Saini et al, 2012). Le traitement à la pirlimycine permettait de réduire l’infection à *S. aureus* et améliorer la guérison bactériologique 8 jours post-traitement (Gillespie et al, 2002). Par contre, l’utilisation des antibiotiques reste le dernier recours, car des résidus d’antibiotiques peuvent contaminer le lait postpartum et par conséquent, affecter la qualité du lait et la perception des consommateurs (Descôteaux, 2004). D’autres traitements conventionnels, comme les anti-inflammatoires, sont très utilisés chez les vaches touchées par la mammite clinique sévère. En effet, les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) tels que les glucocorticoïdes notamment : le dexaméthazone et l’isofluprédone peuvent réduire l’inflammation. Par contre, ils peuvent provoquer des effets indésirables tels que la faiblesse du système immunitaire et la paralysie de la vache respectivement (Descôteaux, 2004). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tel que le kétoprofen est très recommandé par la direction des médicaments vétérinaires au Canada (Descôteaux, 2004). Pour les traitements alternatifs tels que l’hydrothérapie, les traitements homéopathiques, l’utilisation des produits à base de plantes, les huiles essentielles et l’administration des vitamines peuvent être utilisées pour traiter les mammites cliniques, mais le taux de guérison ou leur efficacité demeure inconnu et non documenté (Descôteaux, 2004). La vaccination pourrait prendre sa place comme alternative des antibiotiques dans le traitement de la mammite bovine. En effet, l’immunisation avec l’ADN des protéines de surface ClfA (*clumping factor A*) et FnBP (*fibronectin binding protein*) permet de stimuler une lymphoprolifération et une réponse immunitaire humorale permettant une protection

partielle des glandes mammaires contre la mammite à *S. aureus* (Shkreta et al, 2004). L'équipe du Dr François Malouin (Université de Sherbrooke) a récemment réussi à identifier certains outils de virulence (Allard et al, 2013) en vue de produire un vaccin qui aidera au contrôle de la mammite bovine à *S. aureus* (Communiqué de presse : <https://www.usherbrooke.ca/medias/communiqués/communiqués-détails/c/31848/>. 30 Mai 2016) La vaccination contre *S. aureus* reste encore sous investigation et pourrait être applicable dans l'industrie laitière. Cependant, certains vaccins contre la mammite à coliformes sont déjà mis dans le marché canadien, notamment le vaccin J5 contre la souche *E. coli* (Dosogne et al, 2002).

1.3.2. Traitement de la mammite bovine aux États-Unis

Aux États-Unis, les mammites cliniques sont généralement traitées par deux classes d'antibiotiques approuvés par la FDA (*US Food and Drug Administration*). Ces deux classes comportent 6 ou 7 antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines tels que : (l'amoxicilline, le céftiofur, la céphapirine, la cloxacilline, l'hétacilline et la pénicilline) et un antibiotique qui appartient à la classe des lincosamides tel que la pirlimycine (Oliveira et al, 2014).

1.3.3. Traitement de la mammite en Europe

En Europe, le traitement des mammites bovines repose sur l'utilisation de plusieurs antibiotiques avec leur fréquence de citation: les pénicillines (41%), les céphalosporines de 1re et 2e génération (12%), les céphalosporines de 3e et 4e génération (11%), les aminoglycosides (10%) et les macrolides (6%) (De Briyne et al, 2014). En plus de l'antibiothérapie, la vaccination devient une alternative du traitement des infections intramammaires. En effet, une étude a démontré que l'utilisation du vaccin Startvac permettait de réduire modérément l'incidence d'une nouvelle IIM à *S. aureus* et de réduire la durée de l'infection associée à *S. aureus* et les staphylocoques à coagulase négative (Schukken et al, 2014; Landin et al, 2015). La commission européenne a mis en évidence le développement d'un nouveau traitement novateur possiblement

utile contre tous les pathogènes impliqués dans la mammite bovine incluant les bactéries résistantes aux antibiotiques tel que les SARM. Ce traitement est appelé : PanaMast (EASME). Il est composé de radicaux oxygènes, tolérables et non toxiques. Des tests préliminaires contre la mammite causée par *S. aureus* ont révélé que ce traitement démontre un taux de 70% de guérison par rapport à un taux de 5-15% de guérison en utilisant les traitements conventionnels (EASME).

1.4. *Staphylococcus aureus*

1.4.1. Généralités

Staphylococcus aureus est un agent pathogène commensale et ubiquitaire qui colonise toutes les surfaces biotiques telles que la peau, les muqueuses et les surfaces abiotiques telles que les cathéters, les implants médicaux et les trayons. Ce pathogène opportuniste est capable de causer des infections diverses notamment : les infections nosocomiales, les infections associées aux implants médicaux, les infections des plaies chroniques, les ostéomyélites, les endocardites (Otto, 2012) et les infections des glandes mammaires chez les vaches laitières (Rehyer et al, 2011). *S. aureus* est une bactérie à Gram positif, catalase positif et coagulase positif, capable de se cultiver facilement dans des milieux sélectifs contenant de fortes concentrations en sels (NaCl 7,5%) d'où le caractère halophile. Il est également capable de vivre dans les milieux usuels dont le pH et la température varient énormément. *S. aureus* est doté d'un pouvoir invasif lui permettant de s'internaliser, se multiplier et se disséminer dans l'organisme provoquant ainsi des septicémies, et un pouvoir toxique suite à la libération des entérotoxines et la toxine superantigénique TSST-1.

1.4.2. Facteurs de virulence de *S. aureus*

S. aureus est capable d'exprimer plusieurs facteurs de virulence. Sa pathogénicité se manifeste par l'expression des facteurs de surface cellulaire tels que la capsule polysaccharidique (CPs), les protéines liant la fibronectine (Fnbp) et la protéine de surface A (Spa). La capsule polysaccharidique protège les bactéries contre la phagocytose par les neutrophiles. Elle permet également d'améliorer la colonisation et la persistance bactérienne aux surfaces des muqueuses (O'Riordan et al, 2004). La protéine A empêche l'opsonisation en se fixant sur la fraction Fc des immunoglobulines (Peterson et al, 1977). La pathogénicité se manifeste également par la sécrétion de plusieurs enzymes qui lui permettent de causer des dommages sévères aux tissus vivants et favorisent l'expansion de l'infection. Ces enzymes sont principalement des exo-protéases, des ribonucléases et des lipases. En outre, *S. aureus* est capable de produire plusieurs toxines ayant la capacité de détruire les cellules immunitaires de l'hôte en produisant des pores au niveau des membranes cellulaires. Les toxines les plus connues sont les hémolysines (α - δ), les peptides PSM (phenol-soluble modulins), la leucocidine de Pantone Valentine (LPV), et la leucocidine LukE-LukD. D'autres toxines sont également secrétées par *S. aureus* telles que : les entérotoxines A-E et la toxine du choc toxique staphylococcique 1 [TSST-1] (Bien et al, 2011). Certaines souches de *S. aureus* ont également la capacité de sécréter d'autres types de toxines tels que les toxines exfoliatives (ETA and ETB) (Amagai et al, 2000) et des protéines CHIPS (*Chemotaxis Inhibitory Proteins of Staphylococci*) dont la fonction est d'inhiber le chimiotactisme des monocytes et les neutrophiles (Foster, 2005).

1.4.2.1. Adhésines

S. aureus possède plusieurs facteurs de surface cellulaire lui permettant de s'adhérer sur des surfaces et facilitant ainsi sa colonisation (Fig. 1). Ce groupe contient plusieurs facteurs tels que la capsule polysaccharidique, la staphyloxanthine et un groupe de protéines appartenant à la famille des MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Environ 90% des isolats cliniques sont capables de produire les capsules polysaccharidiques, représentés par les deux sérotypes CP5 et CP8. La fonction principale de ces

capsules est de nuire à la phagocytose des bactéries par les neutrophiles. Elles facilitent également la colonisation et la persistance bactérienne aux surfaces des muqueuses (O’Riordan et al, 2004). La staphyloxanthine est un pigment caroténoïde qui donne la couleur dorée aux bactéries et qui est impliquée dans la résistance à la phagocytose par les neutrophiles. Des études ont démontré que l’inhibition de la biosynthèse de la staphyloxanthine permettait de rendre *S. aureus* plus vulnérable au système de défense de l’hôte et par conséquent, de réduire la charge bactérienne de *S. aureus* dans le rein d’un model de souris (Song et al, 2009). Pour la famille des MSCRAMMs, les protéines telles que le facteur d’agglutination (ClfA, ClfB) (*clumping factor*), les protéines liant la fibronectine (FnbA, FnbB) (*fibronectin-binding proteins*), l’adhésion au collagène et la protéine A, jouent un rôle important dans l’attachement des bactéries aux protéines de l’hôte afin d’établir la première étape de l’infection (Lin et al, 2010). Elles sont également impliquées dans l’étape initiale de la formation de biofilm et dans le processus d’internalisation (O’Neill et al, 2007; Brouillette et al, 2003). La protéine de surface A codée par le gène *spa* permet à la bactérie d’éviter l’opsonisation en se liant sur la fraction Fc des immunoglobulines (Peterson et al, 1977).

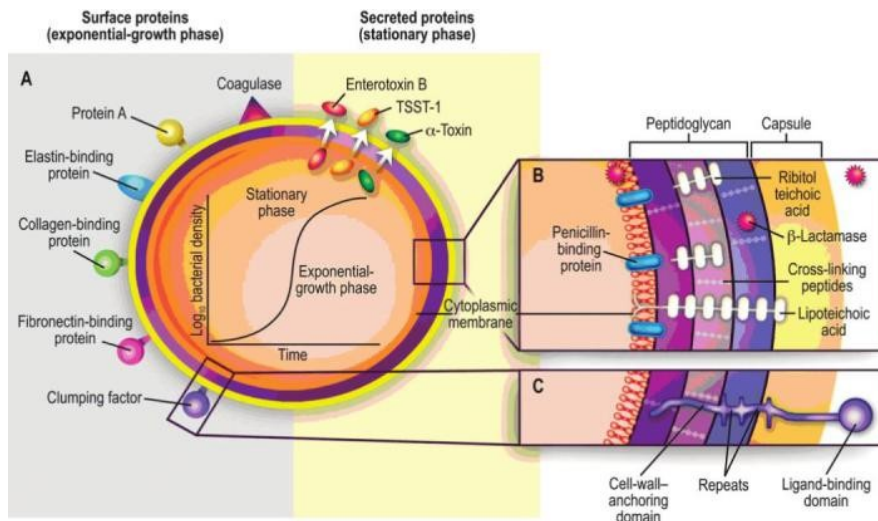


Fig.1: Les facteurs de pathogénicité de *S. aureus*. (Tiré de Gordon et Lowy, 2008).

1.4.2.2. Superantigènes : entérotoxines staphylococciques et la toxine TSST-1

Les superantigènes constituent une famille d'entérotoxines capables d'induire une variété de maladies humaines. Chez *S. aureus*, plus de 20 superantigènes différents ont été identifiés incluant les entérotoxines staphylococciques (ES), des entérotoxines ressemblant à des protéines (ES-1s) et la toxine TSST-1 (TSST-1) (Becker et al, 2003; Schlievert et al, 2007). Les superantigènes sont capables d'activer les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les macrophages et les cellules dendritiques, en liant de façon non spécifique le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II des cellules présentatrices d'antigènes à la région variable V β du récepteur des lymphocytes T (TCR) (Bernal et al, 1999). Cette liaison non spécifique va induire une libération massive de cytokines et de chimiokines de la part des deux cellules, ce qui provoque les symptômes observés du syndrome du choc toxique des staphylocoques (Bernal et al, 1999).

1.4.2.3. Hémolysines ou cytotoxines

S. aureus produit un éventail de toxines capables de former des pores sur les membranes cellulaires tels que les cytolysines (α -, β -, γ -, δ -toxine), la famille des leukocidines (leukocidine, Luk D/E, LukM et la leucocidine de Panton-Valentine (PVL)) et les phenol-soluble modulins (PSM) (Dinges et al, 2000; O'Reilly et al, 1990; Li et al, 2009). Malgré la divergence dans la structure et la spécificité de la cible telle que les leucocytes, les érythrocytes et les cellules épithéliales, ces toxines exercent des fonctions similaires sur les cellules hôtes. Elles sont capables de former des pores dans les membranes des cellules cibles et provoquer des fuites par un gonflement osmotique et de l'inflammation des cellules à des doses faibles, et la lyse cellulaire à des doses élevées. L' α -hémolysine, codée par le gène *hla*, est sécrétée sous forme d'un monomère soluble dans l'eau et qui permet d'engager les récepteurs de surface des cellules hôtes tels que les érythrocytes, les lymphocytes, les macrophages et les cellules épithéliales pour se réunir en heptamère cylindrique (1-2 nm de large) dans les membranes cellulaires (Dinges et al, 2000). La β -hémolysine est une sphingomyélinase C dont le mode d'action est d'hydrolyser la sphingomyéline présente dans la membrane des cellules hôtes (Huseby et al, 2007). Elle est

cytotoxique pour plusieurs cellules telles que : les érythrocytes, les monocytes, les neutrophiles et les lymphocytes T (Huseby et al, 2007). En outre, cette β -toxine joue le rôle de catalyseur dans la formation de la matrice nucléoprotéique dans le biofilm des staphylocoques (Huseby et al, 2010). La γ -hémolysine et la famille des leukocidines incluant la PVL, la leukocidine E/D et leukocidine M/F-PV sont des toxines à deux composantes. Chacune de ces toxines est composée de deux protéines sécrétées séparément : composante à élution lente (*Slow* (S)) et une autre à élution rapide (*Fast* (F)) (Lin et al, 2010). Ces toxines sont capables d'induire des réactions inflammatoires à différents niveaux chez le lapin (Gravet et al, 1998). La δ - toxine est un oligopeptide de 26 acides aminées capable de lyser les neutrophiles, les érythrocytes humains et d'autres cellules de mammifère via son activité amphipathique où il peut jouer le rôle de surfactant (Dinges et al, 2000). Cet oligopeptide joue également un rôle régulateur du système *Agr* (*accessory gene regulator*) qui contrôle les facteurs de virulence de *S. aureus*. La δ – toxine possède une structure similaire à celle des phenol-soluble modulins (PSM). Ces derniers sont des courts peptides, amphipathiques capables de faciliter la lyse des neutrophiles après la phagocytose (Otto, 2014).

1.4.2.4. Biofilm des staphylocoques

1.4.2.4.1. Introduction

Les staphylocoques sont des bactéries capables de s'adapter aux environnements défavorables en faisant des réparations moléculaires intracellulaires ou en formant le biofilm afin de s'y protéger. Cette dernière stratégie offre une protection accrue aux bactéries grâce à la matrice extracellulaire du biofilm. La terminologie adoptée pour décrire les bactéries sessiles ou planctoniques repose sur le fait que ces micro-organismes sont soit adhérents à une surface ou libres dans une suspension. Les bactéries sessiles peuvent s'adhérer sur des surfaces abiotiques (les matériaux inertes) ou biotiques (les tissus ou les cellules vivantes) (Dune, 2002). Toute surface naturelle ou artificielle peut être le siège d'une colonisation bactérienne avec la formation d'un biofilm. Tenant compte de ces deux aspects (surface abiotique ou biotique), Costerton et al. (1999) ont défini le biofilm comme étant une population bactérienne adhérente à

des surfaces vivantes et recouvertes par une matrice extracellulaire synthétisée par elles-mêmes. Cette matrice extracellulaire assure la protection et la cohésion des bactéries entre elles, absorbe l'eau et piège les petites particules circulantes. Elle facilite également la survie des bactéries dans des environnements hostiles où les nutriments sont limités. En outre, le biofilm diminue l'efficacité des peptides antimicrobiens, constituants principaux du système de défense épithélial inné de l'hôte, nuit à la phagocytose par les phagocytes pendant l'infection et augmente la résistance aux antibiotiques (Hoiby et al, 2010; Otto, 2012).

1.4.2.4.2. Infections liées aux biofilm de *S. aureus*

Les staphylocoques sont des pathogènes opportunistes capables de causer des infections aiguës ou chroniques. La présence de ces microbes dans la flore commensale de la peau et les muqueuses de l'homme et de l'animal leur facilite ce pouvoir infectieux (Otto, 2008). Les biofilms à *S. aureus* sont à l'origine d'infections chroniques et nosocomiales qui surviennent lors de l'insertion des implants médicaux. Ces infections sont quasiment intraitables par les antibiotiques et par conséquent, nécessitent le plus souvent un remplacement (Jones et al, 2001; von Eiff et al, 2005). Plusieurs infections associées au biofilm ont été rapportées dans la littérature tels que les infections associées aux implants médicaux, les infections des plaies chroniques, les endocardites (Archer et al, 2011) et les infections des glandes mammaires des vaches laitières ou mammite bovine (Costerton et al, 1999 ; Cucarella et al, 2004). Dans les mammites bovines, le biofilm est un facteur de virulence très important car il permet aux bactéries de persister dans les glandes mammaires et par conséquent, causer des infections chroniques. Des études antérieures ont rapporté qu'à peu près 80% des infections chroniques sont liées à des souches productrices de biofilm (Davies, 2003).

1.4.2.4.3. Les bases moléculaires de la formation du biofilm de *S. aureus*

La formation de biofilm de *S. aureus* est un processus complexe qui se passe en deux étapes essentielles : l'attachement initial des bactéries aux surfaces et la phase de maturation qui

consiste en un développement d'une communauté mature et multicouche des cellules bactériennes (Fig. 2). Ces deux phases sont différentes de point de vue physiologique et requièrent chacune des facteurs spécifiques. Finalement, le détachement ou la dispersion du biofilm permet la dissémination des bactéries et la colonisation de nouveaux sites d'infection dans le corps humain (Otto, 2008).

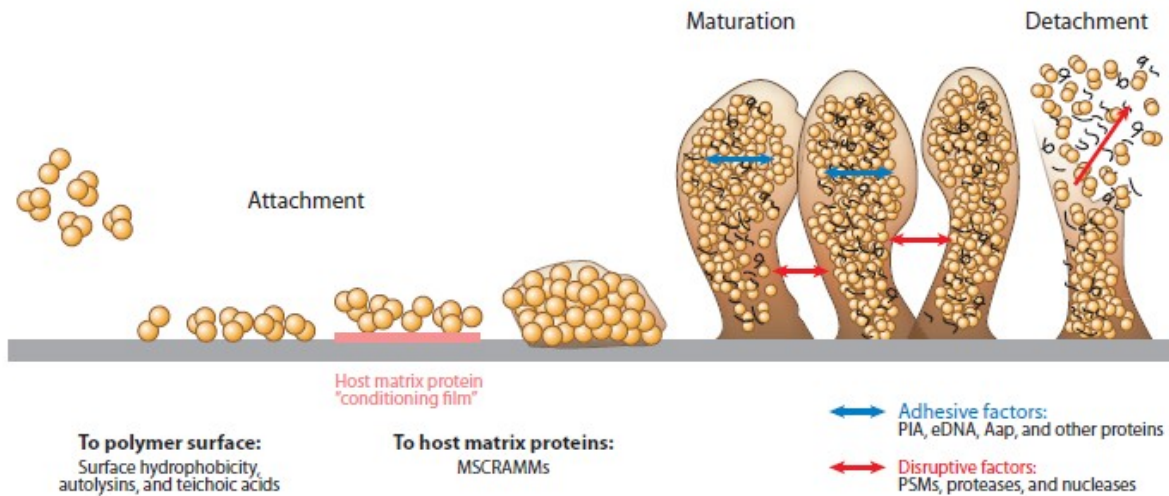


Fig. 2: Les différentes phases du développement du biofilm. (Tiré d'Otto, 2013).

1.4.2.4.3.1. Attachement aux surfaces abiotiques et biotiques

L'attachement des microorganismes aux surfaces abiotiques dépend essentiellement de la nature de ces surfaces et des propriétés de la surface cellulaire. Les interactions initiales surviennent via les forces physico-chimiques non spécifiques telles que les interactions hydrophobes, les interactions acide-base, les interactions électrostatiques, et les forces de van der Waals (Garret et al, 2008; Speranza et al, 2004). La colonisation des surfaces abiotiques par *S. aureus* repose sur la charge des acides teichoïques présents sur la surface (Gross et al, 2001). Des protéines de surface de *S. aureus* telles que la protéine Bap (*biofilm-associated protein*) (Cucarella et al, 2001) et la protéine A (Spa) (Henry-Stanley et al, 2011) sont impliquées dans l'attachement initial de *S. aureus* aux surfaces abiotiques.

S. aureus possède également la capacité de se lier de façon irréversible aux protéines du plasma humain ou celles de la matrice extracellulaire telles que le fibrinogène ou la fibronectine grâce aux adhésines protéiques de surface appartenant à la famille de MSCRAMMs (Patti et al, 1994). Cet attachement représente l'étape initiale de la formation du biofilm. Les implants médicaux sont rapidement recouverts par les protéines du plasma ou de la matrice extracellulaire de l'hôte directement après leur implantation, ce qui offre une bonne opportunité aux bactéries de *S. aureus* de s'y attacher et d'initier la formation du biofilm, d'où l'importance de ces interactions dans l'établissement d'une colonisation bactérienne (Otto, 2008).

1.4.2.4.3.2. Maturation du biofilm

La phase de maturation est généralement caractérisée par (1) l'agrégation intercellulaire qui se réalise par une variété de molécules comme les protéines d'adhésion ou le plus souvent par les exopolymères polysaccharidiques, et (2) les forces permettant la structuration du biofilm ce qui permet d'obtenir un biofilm mature dont l'apparence tridimensionnelle ressemble à des champignons contenant des canaux qui permettent l'hydratation et le drainage des nutriments pour les bactéries présentes à l'intérieur du biofilm (Otto, 2008).

1.4.2.4.3.2.1. Mécanisme dépendant de l'opéron *icaADBC* : Adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA)

Chez les staphylocoques, la principale molécule responsable de l'adhésion intercellulaire est la PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) ou la PGNA (*poly-N-acetylglucosamine*) dont l'appellation provient de sa composition chimique. L'adhésine intercellulaire polysaccharidique est un polymère formé par des résidus de N-acétyl-glucosamine partiellement déacétylés et réunis par une liaison β -1-6 (Otto et al, 2008). Ce polymère contribue à la formation de la matrice extracellulaire des staphylocoques lorsqu'il est en contact avec d'autres polymères tels que les acides teichoïques et les protéines. La déacétylation partielle des résidus de N-acétyl-glucosamine est un facteur clé dans l'agrégation intercellulaire car elle introduit des charges

positives dans le polysaccharide en libérant des groupements amines libres qui deviennent chargés au pH neutre ou acide (Vuong et al, 2004). Comme la surface bactérienne est chargée négativement par la présence des acides teichoïques, la PIA est donc capable d'attacher les bactéries entre elles par l'intermédiaire des interactions électrostatiques.

La biosynthèse du PIA s'effectue par l'intermédiaire des produits de gènes de l'opéron *icaADBC* (Fig. 3). Cet opéron a été découvert pour la première fois chez *S. epidermidis* mais il est présent également chez d'autres staphylocoques incluant *S. aureus* (Heilmann et al, 1996). L'opéron *icaADBC* comprend une N-acétyl-glucosamine transférase (*IcaA* et *IcaD*), une PIA déacétylase (*IcaB*) et un exportateur putatif du PIA (*IcaC*) (Vuong et al, 2004). La synthèse du PIA se réalise en trois étapes distinctes : (i) la protéine IcaA assure la polymérisation de la chaîne du PIA en croissance par l'ajout des résidus de N-acétyl-glucosamine provenant du précurseur UDP-GlcNAc. La transférase IcaA coopère avec la protéine IcaD pour accélérer le processus de polymérisation afin d'obtenir des oligomères d'environ 20 résidus. (ii) La chaîne de PIA en développement sera ensuite exportée à travers la membrane plasmique par la protéine transmembranaire IcaC. Cette protéine est également nécessaire à l'élongation de la chaîne; (iii) Après son exportation, la molécule de PIA sera prise en charge par une protéine attachée à la surface, IcaB, qui va permettre sa déacétylation afin d'introduire des charges positives essentielles pour son emplacement en surface et pour son activité biologique.

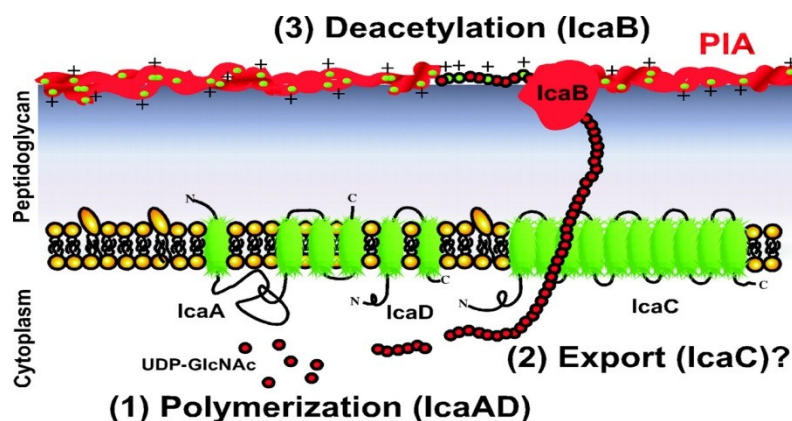


Fig. 3: Les étapes de la biosynthèse du PIA chez *S. epidermidis*. (Tiré de Vuong et al, 2004).

1.4.2.4.3.2.2. Mécanismes indépendant de l'opéron *icaADBC*

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication d'autres mécanismes de formation du biofilm indépendants de PIA chez *S. aureus*. Des chercheurs ont démontré que la protéine Bap (*biofilm associated protein*) est impliquée dans l'adhérence aux surfaces, l'agrégation intercellulaire, et dans la formation du biofilm de la souche V329 de *S. aureus* impliquée dans la mammite bovine (Cucarella et al, 2001). D'autres études ont démontré l'implication de la protéine Aap (*accumulation associated protéine*) dans la formation de biofilm chez des souches de *S. aureus* et *S. epidermidis* (Rohde et al, 2007). D'autres mécanismes *icaADBC*- indépendants de la formation du biofilm ont été découverts tels que les protéines liant la fibronectine, FnBPA et FnBPB (O'Neill et al, 2008; Vergara-Irigaray et al, 2009), les protéines de surface SasG et SasC codées par les gènes *sasG* et *sasC* respectivement (Corrigan et al, 2007; Schroeder et al, 2009) et finalement la protéine de surface A (Merino et al, 2009).

La matrice extracellulaire du biofilm peut inclure des molécules d'ADN génomique extracellulaire (eADN) provenant de la lyse bactérienne médiée par le gène *cidA*. Cette molécule d'ADN chargée négativement est capable d'interagir avec le polymère polycationique PIA. Ces deux polymères contribuent conjointement à la structuration du biofilm au cours de sa phase de maturation (Mann et al, 2009).

1.4.2.4.3.2.3. Structuration du biofilm

Un biofilm mature adopte une structure tridimensionnelle dotée d'une certaine canalisation afin d'assurer le passage des nutriments vers les cellules bactériennes situées dans les couches les plus profondes du biofilm. Le mécanisme derrière cette canalisation et la structuration du biofilm, reste moins clair que ceux qui contrôlent l'adhésion intercellulaire. Des études ont démontré que les staphylocoques utilisent des peptides surfactants appelés : PSM (Phenol-soluble modulins) sous contrôle du quorum sensing dans la structuration du biofilm (Otto, 2008; Otto, 2014). Mehlin et collaborateurs ont décrit les PSM comme étant une classe de peptides possédant des propriétés pro-inflammatoires chez *S. epidermidis* (Mehlin et al, 1999). Tous les

PSMs sont dotés d'un caractère amphiphile et peuvent être divisés en deux sous-classes : les α -PSM dont la longueur est de ~ 20 acides aminés et les β -PSMs avec une longueur de $\sim 40-45$ acides aminés. Les peptides β -PSMs jouent un rôle très important dans le développement et la structuration du biofilm chez *S. epidermidis* (Otto, 2008).

1.4.2.4.3.3. Dispersion du biofilm

La dispersion du biofilm joue un rôle primordial dans les infections associées aux biofilm telles que les infections chroniques (Yarwood et Schlievert, 2003). Le mécanisme principal de détachement du biofilm chez *S. aureus* consiste en la production d'exoprotéines notamment des protéases et des nucléases ou des surfactants comme les phenol-soluble modulins (PSM) qui dégradent les différentes composantes de la matrice extracellulaire du biofilm. Ces agents de dégradation sont sous contrôle du système Agr qui est exprimé pendant la phase stationnaire de la croissance bactérienne. D'autres facteurs intrinsèques ou externes peuvent participer à la dispersion du biofilm tels les gènes de régulations *sarA* et l'opéron *xerC* (Atwood et al, 2016) et certaines molécules telles que le chitosane (Orgaz et al, 2011), les lectines (Klein et al, 2015) ou certaines enzymes telles que les alginate lyases (Iampana et al, 2013) ainsi que certaines conditions environnementales comme l'indisponibilité de source d'énergie comme le glucose dans le milieu extracellulaire (Boles et Horswill, 2011; McDougald et al, 2012).

1.4.2.4.4. Facteurs aidant à la formation du biofilm

Plusieurs facteurs peuvent influencer la formation du biofilm tels que les caractéristiques de la surface qui sera le siège de l'attachement des bactéries, les caractéristiques du milieu et les propriétés de la surface des cellules ainsi que les forces s'exerçant dans le milieu aqueux (la dynamique du fluide) (Donlan, 2002).

1.4.2.4.4.1. Caractéristiques de la surface

Les interactions entre la paroi cellulaire bactérienne et les surfaces sont principalement influencées par les forces électrostatiques d'attraction ou de répulsion et par les forces de van der Waals. Cependant, d'autres interactions non spécifiques peuvent être mises en place pour influencer l'attachement des bactéries aux surfaces telles que les forces d'hydratation, les forces stériques et les interactions hydrophobes. Hamadi et al (2009) ont démontré que les micro-organismes sont capables de se fixer plus facilement sur des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le téflon et les surfaces en plastique, que sur des matériaux hydrophiles (Hamadi et al, 2009), ce qui influence grandement leur taux d'attachement. D'autres chercheurs ont démontré l'importance de la rugosité de la surface dans l'attachement des bactéries. En effet, la colonisation est beaucoup plus facile sur des surfaces rugueuses (Katsikogiani et Missirlis, 2004). Ceci revient au fait que les forces répulsives sont plus faibles et la présence d'aspérités peut élargir la surface de fixation (Donlan, 2002).

1.4.2.4.4.2. Les propriétés du milieu

Mahami et Adu-Gyamfi (2011) ont démontré que les propriétés chimiques du milieu aqueux telles que la température, le pH, les forces ioniques ainsi que la disponibilité des nutriments influencent énormément l'adhésion des bactéries aux surfaces.

1.4.2.4.4.3. L'importance du film protéique dans la formation du biofilm

Les protéines qui recouvrent les implants médicaux lorsqu'ils sont en contact direct avec un fluide comme le sang, favorisent grandement la formation de biofilm. C'est comme le cas du fibrinogène, la fibronectine, le collagène et d'autres. (Katsikogiani et Missirlis, 2004; von Eiff et al, 2005).

1.4.2.4.4. Les propriétés de la surface cellulaire

L'hydrophobicité de la surface des cellules bactériennes joue un rôle très important dans la liaison des bactéries aux surfaces mais également entre les bactéries elles-mêmes. Les bactéries hydrophobes auront plus de facilité à enlever le film d'eau les séparant des surfaces à coloniser et elles établiront aisément le contact avec ces surfaces comparativement aux bactéries hydrophiles (Doyle, 2000; Donlan, 2002).

S. aureus possède plusieurs protéines de surface qui interviennent dans le processus d'attachement appelées adhésines et qui font partie de la classe des MSCRAMMs (Patti et al, 1994; Otto, 2012). Ces adhésines permettent la liaison spécifique des bactéries aux surfaces mais également aux composants du tissu de l'hôte. Parmi ces molécules, il y a les protéines liant la fibronectine FnBPA et FnBPB (*fibronectin-binding protein A et B*) (Greene et al, 1995; Vaudaux et al, 1995), la protéine liant le fibrinogène (*Clumping factor A ou ClfA*), la protéine liant le collagène (*Cna*) ainsi que la protéine liant l'élastine (*EbpS ou Elastin binding Protein*) (Foster et Hook, 1998). D'autres protéines de surface chez *S. aureus* peuvent également avoir un rôle dans l'attachement tel que la protéine Eap (*Extracellular adherence protein*) (Harraghy et al, 2003), Ebh (*Extracellular matrix binding homologue protein*) (Clarcke et al, 2002) et Emp (*Extracellular matrix binding protein*) (Hussain et al, 2001).

1.4.2.4.5. Quorum sensing et biofilm de *S. aureus*

Chez *S. aureus*, la production des protéines de surface se déroule pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne alors que les exoprotéines sont produites au cours de la phase stationnaire. Lorsque la densité cellulaire est faible (faible activité du système Agr au début d'une infection), la bactérie exprime des facteurs protéiques de la famille des MSCRAMMs et d'autres adhésines aptes à promouvoir l'attachement et l'accumulation du biofilm. Par contre, à une forte densité cellulaire (forte activité du système Agr), la bactérie régule négativement via la molécule d'ARN III, l'expression des gènes codant pour les facteurs de colonisation, et régule positivement l'expression d'une variété de toxines (telles que α -toxine, δ -toxine, et TTSS-1) et la

sécrétion d'enzymes (telles que les protéases, lipases, hyaluronidases, et les nucléases) qui sont impliquées dans la destruction des tissus et/ou dans le détachement du biofilm (Heilmann et Götz, 2010). Les adhésines bactériennes sont très importantes dans les premières étapes de la formation du biofilm alors que la δ -hémolysine exercerait une action négative dans la maturation de la structure du biofilm grâce à ses propriétés détergentes. Les protéases extracellulaires diminuent les biofilms en dégradant les protéines contenues dans la matrice extracellulaire (Novick et Geisinger, 2008; Martí et al, 2009). Ainsi, la répression du système Agr favorise largement la formation du biofilm alors que son induction dans un biofilm établi promeut le détachement du biofilm (Boles et Horswill, 2008).

1.4.2.4.6. Résistance du biofilm

L'antibiothérapie habituellement efficace sur les bactéries planctoniques se révèle souvent moins efficace sur des structures organisées en biofilm (Stewart et Costerton, 2001). Certaines hypothèses sont émises afin d'expliquer les mécanismes de résistance des biofilm aux antibiotiques. La première hypothèse repose sur l'environnement spécifique du biofilm, dont les régions les plus profondes, riches en acides et pauvres en nutriments et en oxygène, pourraient diminuer l'efficacité de l'antibiotique. La deuxième hypothèse repose sur la notion de la barrière physique qui pourrait expliquer la pénétration lente et incomplète de certains antibiotiques. Enfin, la troisième hypothèse s'appuie sur les modifications phénotypiques observées dans certains biofilms, car les bactéries qui se trouvent à l'intérieur du biofilm, sont capables d'exprimer activement certaines gènes dont le rôle est d'altérer l'enveloppe cellulaire, les cibles moléculaires et la sensibilité aux antibiotiques (Steward et Costerton, 2001; Tenke et al, 2012). Certaines études ont montré également que les biofilms de *S. aureus* jouent un rôle important dans l'évasion du système immunitaire de l'hôte via la résistance des bactéries aux cellules phagocytaires (Hall-Stoodley et Stoodley, 2009; Thurlow et al, 2011).

1.4.2.4.7. Régulation du biofilm

L'expression des gènes qui codent pour les molécules impliquées dans la formation du biofilm de *S. aureus* et leur virulence est gérée par un ensemble de régulations qui répondent aux facteurs environnementaux extérieurs (nutriments, force ionique, pH, température) ainsi qu'à des signaux de communication intercellulaire (quorum sensing). Chez *S. aureus*, ces voies de signalisation sont maniées par deux principaux régulateurs transcriptionnels, *Agr* et *SarA* (*staphylococcal accessory regulator*), activés chacun à des phases de croissance différentes des biofilms.

Le gène *sarA* est activé pendant la phase précoce de la formation du biofilm afin d'exprimer les gènes codants pour les protéines de surface, impliquées dans l'adhésion cellulaire et l'agrégation intercellulaire (Valle et al, 2003 ; Beenken et al, 2003 ; O'Neill et al, 2007). Le gène *sarA* contrôle l'expression d'environ 120 gènes (Dunman et al, 2001), y compris le système *agr* (Novick, 2003). Des mutations au niveau du gène régulateur *sarA* provoquent une réduction significative de la formation du biofilm chez *S. aureus* (Valle et al, 2003 ; Beenken et al, 2003). Le deuxième régulateur transcriptionnel est *agr*. C'est un gène essentiel du "quorum sensing" (QS) de *S. aureus* (Otto, 2012) ou le système de réponse collective des bactéries à partir d'un seuil critique de densité cellulaire. Il ne sera activé qu'à un stade avancé de la formation du biofilm (Shenkman et al, 2001). Les molécules « signal » du QS sont appelées des molécules auto-inducteurs ou AIP (Fig. 4). Chez *S. aureus*, ces molécules sont des oligopeptides de 7-9 acides aminés avec un cycle thiolactone à leur extrémité C-terminale. Elles sont produites suite au clivage du produit du gène *agrD* par la protéine transmembranaire AgrB. Une fois produites, les molécules d'AIP vont être secrétées dans l'environnement extracellulaire et leur accumulation se comporte comme un signal de densité cellulaire menant à l'activation de l'ensemble du système Agr. Ce système est constitué de deux opérons sous le contrôle de deux promoteurs P2 et P3 et dont la transcription, en orientation opposée, produit les transcrits ARNII et ARNIII. L'unité de transcription P2 est un opéron qui code pour 4 protéines (AgrB, AgrD, AgrC et AgrA) et qui participent activement au mécanisme de QS agr. Une fois le seuil atteint, le peptide auto-inducteur (AIP) se lie au senseur AgrC et stimule son activité kinase qui elle-même, phosphoryle le régulateur de réponse AgrA. Cette protéine augmentera la transcription de

l'opéron P3 ce qui conduit à l'augmentation de la concentration intracellulaire de l'ARNIII, indispensable à l'expression des exoprotéines (Novick et Geisinger, 2008). La molécule d'ARN III réprime l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion et active ceux responsables de la virulence et la dispersion du biofilm tel que les protéases, les nucléases et les phenol-soluble modulins (PSM) (Otto, 2014; Le KY et al, 2015). Une variation allélique dans la région *agrB-D-C* du gène *agr* conduit à la production de quatre groupes d'*agr* différents et donc quatre molécules d'AIP différentes. Une molécule d'AIP d'une séquence d'*agr* quelconque est capable d'inhiber la synthèse des molécules d'AIP d'une séquence d'*agr* différente (Novick et Geisinger, 2008). D'autres facteurs transcriptionnels peuvent participer à la régulation du biofilm chez *S. aureus*, tel que le facteur SigB (codé par le gène *sigB*) qui régule l'expression des gènes dans les conditions de stress (appauvrissement du milieu en nutriments, etc). Ce facteur régule positivement la transcription du gène régulateur *sarA* et réprime l'expression du système Agr (Bronner et al, 2004; Mitchell et al, 2010). Il existe encore d'autres facteurs tels que : IcaR et TcaR qui contrôlent négativement la transcription de l'opéron *ica* (Jefferson et al, 2004), Rbf (*regulator of biofilm formation*) qui intervient dans la phase d'agrégation cellulaire et qui est affecté par la présence du NaCl et du glucose (Lim et al, 2004) et finalement, le système à deux composantes ArlRS (*autolysin related locus*) qui peut interagir avec les régulateurs transcriptionnels *SarA* et *Agr* et par conséquent, régule négativement la formation du biofilm de *S. aureus* (Toledo-Arana et al, 2005).

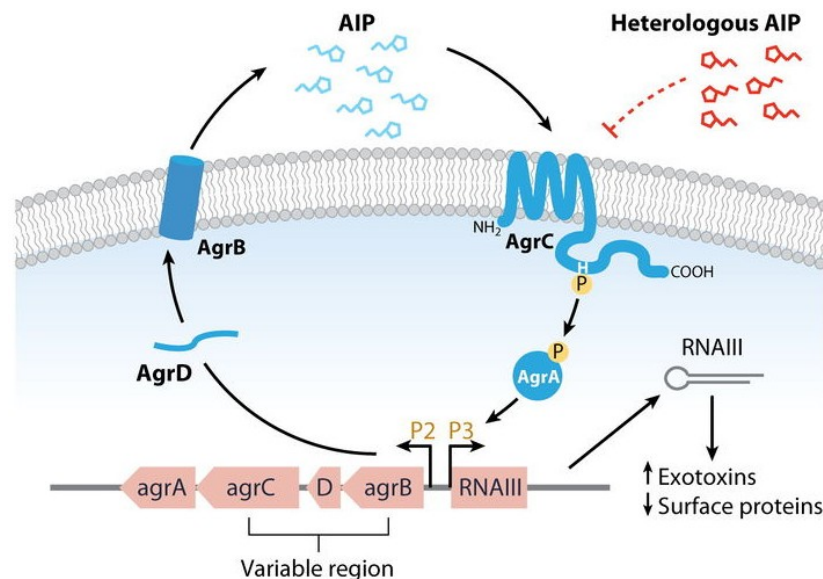


Fig. 4: Les étapes d'autoactivation d'Agr. (Tiré de Novick et Geisinger, 2008).

1.4.2.4.8. Facteurs externes agissant sur le biofilm

Dans la littérature, les chercheurs ont testé une panoplie de molécules naturelles ou synthétiques pour élucider leur effet perturbateur du biofilm. Certaines molécules sont utilisées seules ou en combinaison avec des antibiotiques afin de promouvoir leur effets sur les bactéries sessiles. Les molécules antibiofilm peuvent être des polysaccharides, des protéines ou des molécules chimiques. Plusieurs études ont démontré l'effet antibiofilm des polysaccharides naturellement produites par certaines bactéries comme les polysaccharides PeI et PsI du de l'espèce *P. aeruginosa* (Qin et al, 2009). Dans cette étude, Qin et ses collègues ont démontré que l'addition du surnageant de culture de la souche *P. aeruginosa* PAO1 disperse le biofilm de *S. epidermidis* et *S. aureus*. L'utilisation des souches mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 pour ces deux polysaccharides a révélé l'incapacité de cette souche à disperser le biofilm de *S. epidermidis*, d'où la confirmation de l'effet antibiofilm des polysaccharides PeI et PsI. L'analyse de la spectrométrie de masse a révélé que les molécules PeI et PsI sont composées par des unités de glucoses et glucose-mannoses respectivement. D'autres études ont montré également que le surnageant de culture de certaines bactéries marines contient des molécules pouvant avoir un tel effet. Sayem et ses collaborateurs (2011) ont analysé les surnageants de culture d'une dizaine de bactéries associées à l'éponge marine *Spongia officinalis* et ils ont trouvé que deux de ces surnageants inhibaient de façon significative la formation du biofilm d'*E. coli* et de *S. aureus in vitro*. Ces surnageants contenaient une molécule active appelée SP1 et dont la composition chimique est constituée de résidus de galactose, glycérol et phosphate. Une autre étude menée par Jiang et al, 2011, a montré le pouvoir de certains polysaccharides produits par *Vibrio sp.* QY101 tels que les molécules A101, de disperser le biofilm de *P. aeruginosa* et pas celui de *S. aureus*. Ces molécules sont composées d'acide galacturonique, d'acide glucuronique, du rhamnose et de la glucosamine. D'autres recherches ont rapporté que l'extrait du biofilm de certaines souches peut contenir des molécules qui peuvent disperser le biofilm. Bendaoud et ses collaborateurs (2011) ont trouvé que les molécules de PAM présentes dans l'extrait de biofilm de l'espèce *K. kingae*, étaient capables de disperser le biofilm préformé de *S. epidermidis*. Ces molécules sont essentiellement composées par des résidus du galactofuranose. D'autres polysaccharides tels que le chitosane démontraient un effet perturbateur du biofilm. Orgaz et ses collaborateurs (2011) ont montré que les polymères de chitosane avec un poids moléculaire

moyen (MMW), étaient capables de disperser le biofilm mature de plusieurs pathogènes liés à l'industrie alimentaire à l'exception de *S. aureus*. Alors qu'une autre étude établie par Knowles et al, 2001, a démontré que le traitement avec du chitosane 2% réduit le compte de cellules viables dans le film microbien de *S. aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et *Listeria monocytogenes*. Un autre type de molécule a été identifié par son effet antibiofilm. Il s'agit d'alginate lyase. Cette enzyme démontrait un effet antibiofilm lorsqu'elle est testée sur le biofilm préformé de la souche *P. aeruginosa*. Lamppa et al, 2013 ont découvert que l'alginate lyase est capable de disperser le biofilm de *P. aeruginosa* en hydrolysant les molécules d'alginate, composants essentiels de la matrice mucoïde du biofilm, et d'améliorer l'efficacité de la tobramycine en combinaison sur la viabilité des bactéries en biofilm.

Plusieurs études ont rapporté l'application de composés naturels dans le domaine de la recherche clinique. Ces composés sont généralement extraits à partir de plantes médicinales. Yadave et al, 2015, ont démontré que l'eugénol, un composant majeur de l'huile du clou de girofle, est capable non seulement d'inhiber la formation du biofilm, mais également de détruire les connexions cellule-cellule et détacher les biofilms existants des souches de SARM et SASM. Il possède également la capacité de tuer les bactéries dans le biofilm.

D'autres composés de nature cette fois-ci animale ont été testés pour leur pouvoir à éradiquer le biofilm. En effet, Klein et al, 2015 ont démontré qu'une lectine de type C isolée à partir du venin de serpent appelé : *Bothrops jararacussu*, est efficace contre les biofilms préformés des souches associées à la mammite bovine notamment *S. aureus* NRS155 et *S. epidermidis* NRS101.

Finalement, certains composés de nature chimique ont pris leur part dans les tests d'éradication des biofilm préformés des staphylocoques. En effet, Rogers et al, 2010 ont démontré que le 2-aminoimidazole seul ou son dérivé le conjugué 2-aminoimidazole/triazole sont capables de disperser le biofilm préformé de *S. aureus*. Ils ont démontré également que le conjugué possède une synergie avec la novobiocine, un antibiotique utilisé couramment dans le traitement des infections associées aux implants médicaux, dans les tests de dispersion des biofilm de plusieurs souches. Plusieurs composés naturels appartenant à cette classe tels que l'oroidine, l'ageliférine, et la mauritiamine (Mourabit et Potier, 2001; Huigens et al, 2007, 2008) peuvent démontrer le

même effet que le 2-aminoimidazole et par conséquent, pourraient être utilisés seule ou en combinaison avec certains antibiotiques afin de favoriser l'élimination des biofilms bactériens.

1.5. Chitosane et ses propriétés biologiques

1.5.1. Généralités sur la chitine, le chitosane et ses dérivés

La chitine est un polysaccharide linéaire composé de résidus de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) liés par des liaisons β (1-4). Elle représente le polysaccharide le plus abondant dans la nature, après la cellulose, et participe activement dans la structuration de la paroi cellulaire de plusieurs levures, des champignons et dans l'exosquelette des arthropodes (ex : crevettes, homards et les crabes). La chitine est insoluble dans l'eau et elle se trouve généralement en deux formes cristallines polymorphiques α et β . L' α -chitine est formée par des feuilletés composés de chaînes parallèles et antiparallèles alternées (Minke et al, 1978) et représente la forme la plus trouvée dans l'exosquelette des insectes, des arthropodes et dans la paroi cellulaire des levures et des champignons. La forme β -chitine est plutôt composée de chaînes parallèles (Gardner et al, 1975) et elle est moins fréquente que la forme α -chitine, mais son extraction est possible à partir du calmar. Le chitosane est un hétéropolymère composé de résidus de N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) et la D-glucosamine (GlcN). Il est préparé à partir de la chitine par une déacétylation partielle. Contrairement à la chitine, le chitosane est soluble dans les solutions acides aqueuses diluées et il réfère un continuum de formes polymériques solubles qui peuvent être classifiées selon plusieurs aspects : la fraction des résidus N-acétylés (F_A) ou le degré de la N-acétylation, le degré de la polymérisation (DP) ou le poids moléculaire (Mw), la distribution du poids moléculaire (PD pour la poly-dispersion) et le patron de la N-acétylation ou la séquence. Le chitosane possède plusieurs propriétés biologiques et physicochimiques très intéressantes dont la biocompatibilité, la non-toxicité et la biodégradabilité le rendant utile dans plusieurs applications en cosmétique, en agriculture, traitement des eaux et en médecine (Bhatnagar et al, 2009; Dodane et al, 1998).

Les chitooligosaccharides ou CHOS sont des oligomères obtenus à partir du chitosane par des procédés chimiques ou enzymatiques. Le chitosane peut être converti en CHOS par hydrolyse enzymatique à l'aide d'enzymes appartenant à la famille des glycosyl hydrolases telle que les chitinases ou les chitosanases, ou par hydrolyse acide. Les caractéristiques du CHOS tels que le F_A , MW, PD et le P_A dépendent du chitosane et la spécificité de l'enzyme utilisé.

Selon la littérature, les chercheurs pensent que les molécules de CHOS interagissent avec les protéines qui agissent, soit sur la chitine (ex : chitinases) ou celles qui sont supposées lier et détecter la chitine.

1.5.2. Production des molécules de CHOS

Le chitosane peut être isolé directement à partir de la paroi cellulaire de certains champignons, mais il peut être produit commercialement à partir de la chitine dans un processus de déacétylation hétérogène. Certains chercheurs qualifient le terme de chitosane et la chitine pour les polymères contenant plus de 100 unités de sucre.

Concernant sa production, le chitosane peut être obtenu par deux méthodes fondamentales : une déacétylation homogène (Sannan et al, 1976) ou hétérogène. Pour la première méthode, la chitine est dissoute dans une solution alcaline durant tout le processus de la déacétylation (une basse température et une agitation excessive) alors que dans la deuxième méthode, la chitine est gardée insoluble dans une solution alcaline chaude, signifiant que ce processus se déroule en deux phases. Les molécules de chitosane dont le F_A varie entre 0 et 65%, peuvent être préparées par une déacétylation homogène de la chitine (Sannan et al, 1976).

Dans la nature, la production de chitine est estimée à peu près de 10^{10} – 10^{11} tonnes par année (Gooday, 1990). Les quantités de chitine, chitosane et leurs dérivés produites ou utilisées par des procédés industriels (Sandford, 2002), sont estimées à environ de 30 000 tonnes métriques pour la chitine et 10 000 tonnes métriques de chitosane en 2007. La grande partie de la chitine est utilisée comme matière première pour la synthèse de la glucosamine (GlcN) monosaccharide, qui représente le supplément alimentaire numéro 1 aux États-Unis et le remède principal pour le soulagement des douleurs reliées à l'arthrose (Sandford, 2002).

1.5.3. Enzymes agissant sur la chitine et le chitosane

1.5.3.1. Chitinases et chitosanases

Les chitinases et les chitosanases sont des enzymes très impliquées dans la dépolymérisation de la chitine et le chitosane respectivement. Elles agissent en hydrolysant les liaisons glycosidiques qui lient les unités de sucres les unes aux autres d'où, leur appartenance à la famille des hydrolases. Les chitinases appartiennent aux familles des glycosyl hydrolases GH18 et GH19 et ces deux familles possèdent l'exclusivité de contenir ces enzymes. Les chitinases sont capables d'hydrolyser les liaisons A-A (acétyl- D-glucosamine –acétyl-D-glucosamine) et non les liaisons D-D (D-glucosamine-D-glucosamine) et cette propriété unique les différencie des chitosanases. Cependant, les chitinases sont capables d'hydrolyser le chitosane malgré ces différentes extensions.

Les enzymes dotées de l'activité chitosanase, appartiennent aux familles des glycosyl hydrolases GH 5, 7, 8, 46, 75 et 80. La famille GH 5 contient une variété d'activités enzymatiques incluant les cellulases, les chitosanases, les mannanases, les xylanases et les licheninases. La famille GH7 contient des cellulases et dans certains cas, peut contenir quelques enzymes dotés d'activités des chitosanases. Dans la famille GH8, les enzymes annotées comme chitosanases se produisent très fréquemment (ex : les cellulases et les xylanases) et cette famille semble contenir peu de vraies chitosanases (Adachi et al, 2004). Les autres familles GH 46, 75 et 80 contiennent exclusivement des chitosanases. Les chitosanases les mieux étudiées sont celles qui appartiennent à la famille GH 46 (Lacombe-Harvey et al, 2009; Saito et al, 1999). Les chitosanases sont classées dépendamment de la spécificité envers du chitosane, en trois sous classes I, II et III (Fukamizo et al, 1994). Les chitosanases de la sous classe I sont capables d'hydrolyser les liaisons A-D et D-D alors que celles de la sous classe II peuvent hydrolyser uniquement les liaisons D-D. Les chitosanases de la sous classe III ont la capacité d'hydrolyser les liaisons D-A et D-D. Les chitosanases des sous classes I sont trouvées dans la famille GH 46 et 75 (Cheng et al, 2006; Fukamizo et al, 1997), alors que celles de la sous classe III sont trouvés uniquement dans la famille GH 46 (Saito et al, 1999).

1.5.4. La production de CHOS – la méthode enzymatique

1.5.4.1. Dégradation du chitosane par les chitinases de la famille 18

La dégradation du chitosane par les chitinases de la famille 18 provenant de *Serratia marcescens* telles que : la ChiA, ChiaB et ChiC, est très bien détaillée dans plusieurs études (Horn et al, 2006; Sørbotten et al, 2005). Pour les chitinases ChiA et ChiB, les profils des produits obtenus durant la phase initiale de la dégradation montrent la dominance d'oligomères formés d'un nombre pair d'unités, ce qui est un indicateur d'une action processive (Eijsink et al, 2008). Si l'enzyme est processif, il passera par deux unités de sucres simultanément jusqu'à ce qu'il y est la formation d'un nouveau complexe productif. Dans le cas de la chitine, tous les produits seraient des dimères. Tandis que pour le chitosane, on constate, parmi les produits réactionnels, la présence d'oligomères plus longs mais formés préférentiellement par un nombre pair d'unités. Plus tard durant la réaction, la dominance d'oligomères disparaît graduellement avec le manque de substrat. A ce moment là, l'enzyme serait impliqué principalement dans d'autres liaisons et des clivages supplémentaires d'oligomères obtenus au cours de la phase précédente de la dégradation. La chitinase ChiC convertit le chitosane en un continuum d'oligomères de différentes tailles et le pic de polymère disparaît très tôt durant la réaction de dégradation. En plus, il n'y a pas d'accumulation initiale de dimères ou d'oligomères plus longs formés d'un nombre pair d'unités, ce qui indique que la ChiC attaque les chaînes polymériques du substrat dans des positions aléatoires et sans processivité.

1.5.4.2. Dégradation du chitosane par les chitinases de la famille 19

La chitinase ChiG est une enzyme qui appartient à la famille 19 des chitinases et qui provient d'une bactérie appelée : *Streptomyces coelicolor* A3(2). Cette enzyme est capable de produire des molécules de CHOS différentes de celles produites par les chitinases de la famille 18. Cette différence revient au fait que cette enzyme est capable de lier différemment son substrat dans son site actif (Heggset et al, 2009).

1.5.4.3. Dégradation du chitosane par les chitosanases de la famille 46

La famille GH 46 des chitosanases comprend des enzymes appartenant à la sous-classe I (clivage des liaisons A-D et les liaisons D-D) (Fukamizo et al, 1995) et la sous-classe III (clivage des liens D-A et les liens D-D) (Mitsutomi et al, 1996). Dans une étude antérieure, un chitosane avec un $F_A = 0.25-0.35$ a été largement dégradé par la chitosanase CsnN174 de *Streptomyces sp.* N174 et les oligomères produits ont été isolés et caractérisés. En plus des oligomères complètement déacétylés D, D-D et D-D-D, plusieurs hétéro-oligomères ont été identifiés (le dimère D-A, les trimères D-D-A et D-A-A, les tétramères D-D-A-A et D-A-A-A et le pentamère D-D-A-A-A) (Fukamizo et al, 1995). Ces résultats suggèrent que la CsnN174 a une grande spécificité pour les glucosamines (GlcN) dans le sous-site +1 (nouvelle extrémité non-réductrice), alors que les N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) et les glucosamines (GlcN), tout les deux, semblent acceptés dans le sous-site -1 (nouvelle extrémité réductrice). D'autres résultats ont montré que la ScCsn46A de *Streptomyces coelicolor*, est capable de dégrader le chitosane avec différent F_A en produisant des oligomères avec des extrémités réductrices acétylées et déacétylées (Heggset et al, 2010).

1.5.5. Production de CHOS - Méthodes chimiques

1.5.5.1. L'hydrolyse acide du chitosane

L'hydrolyse acide est probablement la méthode la plus connue des méthodes chimiques pour l'hydrolyse du chitosane (Domard et al, 1992; Morris et al, 2009). Les premières études sur l'hydrolyse acide du chitosane ont démontré qu'il est possible de convertir un chitosane complètement déacétylé en CHOS dans une solution d'acide chlorhydrique concentrée (Domard et al, 1992). Des études antérieures ont montré qu'en présence de différentes variétés de chitosane, les taux de dégradation du chitosane catalysé par l'acide, dépendent du F_A et le taux initial de dégradation est proportionnel au F_A .

L'hydrolyse acide possède une spécificité plus élevée pour le clivage des liaisons glycosidiques A-A et A-D que pour les liens D-D et D-A. Cette préférence est probablement due à deux facteurs essentiels : (1) la présence d'un groupe aminé (comme GlcN) chargé positivement près de la liaison glycosidique peut être inhibiteur, et (2) la présence d'un groupement N-acétyl (comme GlcNAc) près de la liaison glycosidique peut donner une certaine assistance au substrat dans le mécanisme d'hydrolyse. Les mêmes études ont démontré que le taux de déacétylation était près du 1/10 du taux de la dépolymérisation dans un acide concentré, alors que les deux taux étaient équivalents dans un acide dilué.

1.5.5.2. La synthèse chimique du CHOS

La synthèse chimique du CHOS permet de produire des composés purs, mais la plupart des méthodes existantes nécessitent beaucoup de temps et requièrent l'utilisation extensive des solvants organiques afin de produire uniquement des homo-oligomères. Dans la littérature, certains chercheurs ont démontré une méthode chimique pour la préparation des molécules de CHOS partiellement déacétylées à partir d'un chitosane entièrement déacétylé et possédant un poids moléculaire élevé. Le chitosane de départ était partiellement dépolymérisé en présence de l'acide chlorhydrique (HCl) afin de produire des oligomères entièrement déacétylés et fractionnés par une précipitation sélective suivi d'une ultrafiltration pour obtenir un mélange d'oligomères de DP2-DP12 (Trombotto et al, 2008). Les oligomères ont été par la suite partiellement N-acétylés en utilisant des quantités stœchiométriques d'acide chlorhydrique pour atteindre le F_A désiré. De cette manière, les fractions de CHOS dont le degré de polymérisation se situe entre DP-2 et DP-12 ont été préparées avec succès. L'inconvénient de cette méthode, c'est qu'elle permet d'établir la production d'un mélange hétérogène des molécules de CHOS.

1.6. Application du chitosane et ses dérivés

La littérature a documenté une grande variété d'activités biologiques des molécules de CHOS. Les mécanismes moléculaires derrière ces activités biologiques demeurent inconnus et dépendent

de la nature des molécules bioactives. Plusieurs activités biologiques ont été rapportées dans la littérature, mais la plupart d'entre-elles donnent des conclusions assez vastes et générales sur l'application de CHOS.

1.6.1. Effet anti-inflammatoire du chitosane

Plusieurs études ont rapporté les propriétés anti-inflammatoires du CHOS. Dans une étude menée par des chercheurs pour étudier l'effet de CHOS sur des cellules RAW 264.7 stimulées par le LPS, ils ont découvert que l'exposition au CHOS conduisait à une atténuation dose-dépendante de la sécrétion du TNF- α et IL-6, induite par le LPS dans le milieu d'incubation (Yoon et al, 2007). De plus, une baisse des taux d'ARNm du TNF- α et IL-6 indique que l'exposition au CHOS provoque une régulation négative de ces cytokines au niveau transcriptionnel. L'exposition provoque également une diminution de la sécrétion d'oxyde nitrique (NO), induit par le LPS dans le milieu d'incubation. Cependant, l'ajout supplémentaire du TNF- α dans le milieu inverse la diminution d'IL-6 et d'oxyde nitrique induite par le CHOS, ce qui suggère que l'effet anti-inflammatoire du CHOS se traduit par la modulation de la voie du TNF- α . D'autres chercheurs ont montré que l'activité anti-inflammatoire de CHOS dans un modèle d'œdème de pattes induit par le carraghénane est proportionnelle non seulement à la dose, mais aussi au poids moléculaire à des doses élevées (Fernandes et al, 2010). Une autre étude a démontré que le traitement par les molécules de CHOS permet d'atténuer le dysfonctionnement des organes dans le cas d'un sepsis induit par le lipopolysaccharide (LPS) et d'améliorer le taux de survie après l'injection du LPS (Qiao et al, 2011). Pour mieux comprendre le mécanisme, ces chercheurs ont examiné plusieurs marqueurs pro-inflammatoires incluant l'infiltration des neutrophiles dans les organes et les taux de TNF- α et l'IL-1 β dans le sérum et ils ont trouvé que les taux de ces cytokines ont été réduits considérablement chez les animaux traités par le CHOS.

1.6.2. Inhibition du développement des tumeurs

Des chercheurs ont démontré que les molécules de CHOS améliorent l'activité cytotoxique des lymphocytes intra-épithéliaux intestinaux parallèlement à la réduction de la croissance tumorale chez la souris et suggèrent que l'activation des fonctions immunitaires intestinales par le CHOS, pourrait être utile dans le traitement des tumeurs. Certaines indications ont montré que l'apoptose est impliquée dans la réduction des tumeurs sous l'effet de CHOS. Une étude a montré que l'ADN des cellules ascitiques d'Ehrlich cancéreuses a été fragmenté en présence de CHOS, ce qui est un indicateur d'apoptose (Harish Prashanth et al, 2005). Il a été démontré également que le CHOS est capable d'induire l'apoptose des cellules du carcinome hépatocellulaire humain via la régulation positive des protéines pro-apoptotiques Bax (Xu et al, 2008). D'autres chercheurs ont comparé l'effet de dimères jusqu'aux hexamères de CHOS entièrement déacétylés sur l'angiogénèse et ils ont trouvé que les hexamères sont les inhibiteurs les plus efficaces (Xiong et al, 2009), alors que d'autres chercheurs ont trouvé que les CHOS acétylés sont plus efficaces pour la prévention de l'angiogénèse que les CHOS entièrement déacétylés *in vitro* et *in vivo* (Wang et al, 2007).

1.6.3. Effet antifongique du chitosane

L'activité antifongique du chitosane a été découverte depuis très longtemps. En 1979, il a été utilisé pour inhiber la croissance des champignons dans différentes cultures (Bautista-Baños et al, 2006). Des études ont démontré également que les heptamères de CHOS déacétylés inhibent la croissance du champignon *Fusarium solani*, un agent infectieux des cultures de pois (Kendra et al, 1984). D'autres études ont rapporté que les polymères de CHOS (chitosane de faible poids moléculaire ou LMWC) sont très efficaces, car des molécules LMWC (4.6 kDa et DP en moyenne de 23) démontraient une activité antifongique contre *Candida krusei* et elles inhibaient la germination des spores de *Fusarium oxysporum* (Tikhonov et al, 2006). L'effet antifongique des LMWC représente la conséquence d'une interaction de ces molécules avec les lipides de la membrane plasmique, conduisant à des changements morphologiques et des perturbations de la surface cellulaire (Palma-Guerrero et al, 2009; Park et al, 2008). La composition de la membrane

plasmique des champignons joue un rôle très important dans la sensibilité au chitosane et la présence des lipides polyinsaturés rend cette sensibilité très importante (Palma-Guerrero et al, 2010).

1.6.4. Effet antibactérien du chitosane

Le chitosane démontre un large spectre d'activité antimicrobienne incluant plusieurs bactéries à Gram positif et à Gram négatif. L'activité antibactérienne reste un processus compliqué qui diffère entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif à cause des différentes caractéristiques de la surface cellulaire. Plusieurs études ont démontré que les molécules de chitosane manifestaient des activités antibactériennes efficaces contre les bactéries à Gram négatif que les bactéries à Gram positif (Chung et al, 2004), alors que d'autres études ont démontré que les bactéries à Gram positif qui étaient les plus susceptibles, probablement à cause de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Zhong et al, 2008). D'autres chercheurs ont montré qu'il n'y pas de différence significative entre les activités antibactériennes contre les bactéries testées (Wang et al, 2004). L'âge des cellules peut influencer l'efficacité de l'activité antimicrobienne du chitosane. Par exemple, certaines souches de *S. aureus* sont plus susceptibles, dans la phase exponentielle tardive, au conjugué lactose-chitosane avec une absence de la viabilité après 10h d'incubation. Cependant, une réduction relative de la population bactérienne de 3.75 et 3.96 log₁₀ Cfu/mL a été observée chez des cellules dans la phase mi-exponentielle et la phase stationnaire tardive respectivement (Chen et al, 2005). Cette différence est due probablement à la variation de l'électronégativité de la surface cellulaire avec la phase de la croissance, ce qui peut entraîner des différences dans la susceptibilité des cellules bactériennes au chitosane (Tsai et al, 1999). En contraste, la souche d'*E. coli* O157H7 est plus susceptible au maltose-chitosane dans la phase mi-exponentielle que la phase stationnaire de sa croissance (Yang et al, 2007).

Plusieurs facteurs intrinsèques du chitosane peuvent influencer son activité antibactérienne, notamment sa structure polycationique. Une grande densité de charges positives peut rendre les interactions électrostatiques très fortes. A cet égard, la charge positive est étroitement liée au DD (degré de déacétylation) du chitosane et leurs dérivés, ce qui affecte la densité de la charge

positive. Des microsphères de chitosane avec un DD de (97.5%) possèdent une densité de charge positive très élevée, ce qui leur confère une activité antimicrobienne très efficace contre les souches de *S. aureus* à pH 5.5 (Kong et al, 2008). Une autre étude a démontré qu'un chitosane avec un DD plus élevée, donc une densité de charge positive plus importante, est plus efficace dans l'inhibition de la croissance bactérienne qu'un chitosane avec un faible DD, suggérant que l'activité antibactérienne du chitosane s'améliore de façon proportionnelle au degré de déacétylation (DD) (Takahashia et al, 2008). D'autres études ont également rapporté l'existence d'une forte corrélation entre l'activité antimicrobienne du chitosane et son poids moléculaire (Mw). L'utilisation des molécules de chitosane de poids moléculaire élevé peut diminuer l'activité antibactérienne contre *E. coli*, alors que d'autres études ont démontré que les molécules de chitosane de poids moléculaire élevé (HMWC) montrent des activités antimicrobiennes plus fortes que les molécules de chitosane de poids moléculaire faibles (LMWC). D'autre chercheurs ont trouvé que le chitosane 4,6 kDa (LMWC) et ses dérivés démontrent des activités antimicrobiennes très importante contre les bactéries, les champignons et les levures (Vladimir et al, 2006). Cependant, d'autres études ont révélé que les activités antimicrobiennes sont similaires peu importe le poids moléculaire du chitosane contre *E. coli* et *Bacillus subtilis* (Vladimir et al, 2006).

1.6.5. Prévention de l'adhérence bactérienne aux cellules humaines

Certains pathogènes peuvent initier les maladies chez l'humain, en utilisant les lectines (protéines liant les glucides) pour s'attacher aux oligosaccharides membranaires des cellules hôtes (Sharon et al, 2000; Zopf et al, 1996). Les effets antibactériens et anti-infectieux des molécules de CHOS sont dus à la capacité de ces molécules de lier les lectines des agents infectieux, et par conséquent, prévenir l'adhésion aux cellules humaines (Rhoades et al, 2006). Une étude a démontré qu'un mélange de tétramères de CHOS (97% déacétylé) inhibe significativement l'adhésion de certaines souches d'*E. coli* entéropathogènes aux cellules épithéliales de l'adénocarcinome du côlon humain (HT29) en culture cellulaire, alors qu'elle n'est pas inhibée chez d'autres souches d'*E. coli* (Rhoades et al, 2006).

1.6.6. Effet antibiofilm du chitosane

Plusieurs études ont démontré que les molécules de chitosane peuvent être utilisées comme des agents antibiofilm, car elles peuvent nuire à la formation de biofilm ou disperser le biofilm préformé de plusieurs micro-organismes. Des chercheurs ont démontré que les molécules de chitosane (LMWC) ont la capacité d'interférer avec la formation de biofilm ou de disperser le biofilm préformé de plusieurs espèces de *Candida* sp. Ces molécules ont également la capacité d'inhiber de façon significative la formation de biofilm de l'espèce *C. parapsilosis* dans un modèle de souris à cathéter (Silva-Dias et al, 2014). D'autres chercheurs ont démontré que le biofilm de *Streptococcus mutans* est fortement inhibé après 12h et 24h d'incubation en présence de concentrations très élevées en chitosane (Pasquantonio et al, 2008). Les molécules de chitosane (LMWC) ont la capacité également de réduire l'activité métabolique de plusieurs pathogènes tel que *S. epidermidis* et *C. albicans* à des concentrations sous-inhibitrices dans le biofilm (Cobrado et al, 2012). Les molécules du chitosane sont utilisées également pour inactiver les micro-organismes adhérent aux surfaces d'acier inoxydable et qui sont responsables d'intoxications alimentaires. Dans une étude liée à l'alimentation, des chercheurs ont trouvé que le traitement avec du chitosane 2% réduit le compte de cellules viables dans le film microbien de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, et *Saccharomyces cerevisiae* (Knowles et al, 2001). Le chitosane peut également être utilisé comme un revêtement de surfaces, car une étude a démontré que les surfaces garnies avec du chitosane partiellement déacétylé nuisent à la formation de biofilm après 54h d'incubation de plusieurs micro-organismes tels que : *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* (Carlson et al, 2008).

1.7. Contexte, hypothèse et objectifs de recherche

La mammite bovine est définie comme étant l'inflammation des tissus internes qui constituent la glande mammaire des vaches laitières (Aitken et al, 2011). Elle est causée par l'introduction d'agents pathogènes dans le canal du trayon de la glande mammaire causant ainsi une infection intramammaire (IIM). La mammite engendre des pertes économiques importantes pour

l'industrie laitière en raison de la faible production du lait, des coûts de traitements élevés, la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait suite à leur utilisation, le rejet de lait non destiné à la consommation et les faibles taux de rendement pendant la transformation du lait en divers produits laitiers (Geary et al, 2012). Le développement de l'inflammation est souvent associé au degré d'exposition des glandes mammaires aux pathogènes. L'expression des facteurs de virulence influence grandement l'inflammation des glandes mammaires. *S. aureus* est considéré le pathogène le plus important de la mammite bovine au Canada (Reyher et al, 2011). Ce pathogène opportuniste est capable de causer des infections intra-mammaires persistantes sous-cliniques souvent réfractaires à l'antibiothérapie (Barkema et al, 2006; Reyher et al, 2011). En outre, le biofilm est un facteur de virulence clé dans la persistance de *S. aureus* pendant la mammite (Cucarella et al, 2004), car il augmente la résistance des bactéries contre les antibiotiques grâce à la matrice extracellulaire en recouvrant et protégeant les bactéries (Otto, 2013). Le biofilm représente donc, un problème majeur de l'industrie laitière et la recherche de nouvelles approches thérapeutiques alternatives adressant ce facteur de virulence est très désirable. Dans ce projet, nous voulons valider les hypothèses suivantes:

- Les molécules polycationiques comme le chitosane, peuvent être utiles pour lutter contre les infections causées par les staphylocoques via leurs propriétés antibactériennes et antibiofilm.
- Utilisation du chitosane en combinaison avec certains antibiotiques pourrait favoriser l'élimination de *S. aureus* dans le biofilm préformé.

Finalement, l'objectif général de l'étude est d'évaluer le potentiel d'action des molécules de chitosane pour prévenir la prolifération de *S. aureus* dans la glande mammaire. Plusieurs objectifs spécifiques ont été établis pour valider l'ensemble des hypothèses :

- Évaluer l'inhibition de la formation de biofilm de *S. aureus* par les différentes formes de chitosane.
- Évaluer la capacité du chitosane à disperser le biofilm préformé de *S. aureus*.
- Évaluer l'activité antibactérienne du chitosane dans le biofilm préformé de *S. aureus*.
- Évaluer la toxicité du chitosane sur les cellules épithéliales bovines MAC-T.
- Évaluer l'efficacité du chitosane sur l'internalisation et la persistance des bactéries dans les cellules épithéliales bovines MAC-T.

- Évaluer l'innocuité du chitosane dans un modèle de mammite aiguë murin lorsque le chitosane est administré en prophylaxie.
- Évaluer l'efficacité du chitosane lors d'une infection intramammaire (IIM) dans le modèle de mammite aiguë murin.
- Évaluer l'effet du chitosane en combinaison avec certains antibiotiques sur la viabilité des bactéries *in vitro*.
- Évaluer l'effet antibactérien de la combinaison chitosane-tilmicosine sur les bactéries en biofilm préformé *in vitro*.
- Évaluer l'efficacité de la combinaison chitosane-tilmicosine lors d'une infection intramammaire (IIM) dans le modèle murin.
- Faire une étude transcriptomique en présence du LMW 2,6 kDa en faisant le séquençage aléatoire du transcriptome entier ou RNA seq.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

2.1. Avant-propos

Dans la présente étude, nous voulions caractériser l'effet des molécules de chitosane avec des caractéristiques bien définies sur le biofilm et la viabilité de *S. aureus* dans le contexte de la mammite bovine. Les résultats de nos travaux seront par ailleurs soumis pour publication au périodique PLOS ONE.

2.2. Contributions

Abdelhamid Asli (1^{er} auteur): est l'expérimentateur principal qui a généré les résultats concernant les manipulations *in vitro*. Il a participé activement à la planification expérimentale du projet, tout en étant responsable du suivi de l'étude. C'est l'auteur qui a rédigé la première version de l'article, puis a finalisé les versions subséquentes.

Eric Brouillette (2^{ème} auteur) : Est un auteur qui était responsable des manipulations chez les souris. Il a également aidé à la planification expérimentale du projet.

Céline Ster (3^{ème} auteur) : Est une auteure qui était responsable des manipulations chez les vaches laitières. Elle a également aidé à la planification expérimentale du projet.

Mariana Gabriela Ghinet (4^{ème} auteur) : Est une auteure qui était responsable de la préparation des différentes formes de chitosane.

Ryszard Brzezinski (5^{ème} auteur) : Planification expérimentale du projet et révision du manuscrit.

Pierre Lacasse (6^{ème} auteur) : Planification expérimentale des études chez les vaches et analyses et révision du manuscrit.

Mario Jacques (7^{ème} auteur) : Planification expérimentale du projet et révision du manuscrit.

François Malouin (auteur pour la correspondance): Principal investigateur du projet, chercheur responsable et écriture du manuscrit.

2.3. Résumé de l'article

Staphylococcus aureus est l'un des principaux agents pathogènes qui causent les infections intramammaires (IIM) bovines. La mammite bovine dont l'origine est infectieuse, cause des pertes économiques importantes pour les producteurs de lait. La mammite bovine est la principale cause de l'utilisation d'antibiotiques dans les élevages laitiers. Malheureusement, un échec du traitement antibiotique est souvent constaté. Une des raisons possibles de l'inefficacité de l'antibiothérapie, malgré la susceptibilité observée des isolats bactériens *in vitro*, est la présence de biofilms. Dans la présente étude, nous avons utilisé des formes de chitosane dont les poids moléculaire sont bien définis et nous avons étudié leur activité antibiofilm et antibactérienne *in vitro* et *in vivo* dans des modèles d'IIM liée à *S. aureus*. Les formes de chitosane 2,6 et 4 kDa étaient capables de prévenir la production de biofilm par la souche la plus forte productrice de biofilm *S. aureus* 2117 et le SARM bovin (*S. aureus* résistant à la méthicilline). L'administration intramammaire de 2,6 kDa n'a démontré aucun effet indésirable chez les souris et chez les vaches, par opposition à la réaction inflammatoire observée dans les glandes mammaires en utilisant la forme 4 kDa. La forme 2,6 kDa était capable de tuer les bactéries incorporées dans les biofilms préformés d'une manière dose-réponse avec une réduction de $> 3 \log_{10}$ UFC à la concentration la plus élevée (4 mg / ml). En outre, la forme 2,6 kDa pourrait empêcher la persistance de SARM après son internalisation dans les cellules MAC-T. L'analyse des essais en damiers *in vitro* a montré que le 2,6 kDa produit une synergie avec

certaines antibiotiques de la classe des macrolides (par exemple, la tilmicosine) contre *S. aureus*, en réduisant la CMI des deux molécules par 2-8 fois. Enfin, l'administration intramammaire de la forme 2,6 kDa seule ($p < 0,01$) ou en combinaison avec la tilmicosine ($p < 0,0001$) a réduit la colonisation de *S. aureus* dans les glandes mammaires chez un modèle murin de mammite. Nos résultats suggèrent que l'emploi de chitosane seul ou en combinaison avec une faible dose de macrolide, pourrait aider à réduire l'utilisation des antibiotiques dans les élevages laitiers.

2.4. Insertion de l'article

Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan derivatives on *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis

A. Asli^{1,4}, E. Brouillette^{1,4}, C. Ster^{1,4}, M. G. Ghinet¹, R. Brzezinski¹, P. Lacasse^{2,4}, M. Jacques^{3,4}, F. Malouin*^{1,4}

¹Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM), Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1K 2R1.

²Sherbrooke Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke, QC, Canada, J1M 0C8.

³Département de pathologie et microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2.

⁴Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network (CBMMQRN) and *Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale* (Op+Lait), Université de Montréal.

For submission to: PLOS ONE (original article).

*** Corresponding address: Mailing address:**

Université de Sherbrooke
Département de biologie, Faculté des sciences,
2500 boul. Université,
Sherbrooke, QC, Canada J1K 2R1.
Tel: +1-819-821-8000, ext. 61202; Fax: +1-819-821-8049;
E-mail: francois.malouin@usherbrooke.ca

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the major pathogens causing bovine intramammary infections (IMIs). IMIs result in mastitis and cause important economic losses for milk producers. Mastitis is the primary cause for the use of antibiotics in dairy farms but therapeutic failure is often observed. One of the possible reasons for the lack of effectiveness of antibiotic therapy despite the observed susceptibility of bacterial isolates *in vitro* are bacterial biofilms. In this study, we used chitosan of a variety of well-defined molecular masses (0.4 – 0.6, 1.3, 2.6 and 4 kDa) and investigated their antibiofilm and antibacterial activities *in vitro* and *in vivo* models related to *S. aureus* IMIs. The 2.6 and 4 kDa forms of chitosan were able to prevent biofilm production by the biofilm hyperproducer strain *S. aureus* 2117 and a bovine MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*). The intramammary administration of the 2.6 kDa chitosan showed no adverse effect in mice or in cows, as opposed to the slight inflammatory effect observed in the mammary glands with the 4 kDa derivative. The 2.6 kDa chitosan was able to kill bacteria embedded in pre-established biofilms in a dose-dependent manner with a >3 log₁₀ reduction in CFU at the highest dose (4 mg/mL). Also, the 2.6 kDa chitosan could prevent the persistence of the internalized MRSA strain into the mammary epithelial cell line MAC-T cells. An *in vitro* checkerboard assay showed that the 2.6 kDa chitosan produced a synergy with the macrolide class of antibiotics (e.g., tilmicosin) against *S. aureus* by reducing the MIC of both molecules by 2-8 times. Finally, the intramammary administration of the 2.6 kDa chitosan alone (p<0.01) or in combination with tilmicosin (p<0.0001) reduced the colonization of the mammary glands by *S. aureus* in a murine mastitis model. Our results suggest that the use of chitosan alone or in combination with a low dose of a macrolide could help reduce antibiotic use in dairy farms.

INTRODUCTION

Mastitis is usually known as the major disease of dairy cattle. Mastitis causes a major economic loss to the dairy industry because of decreased milk production and quality, cost of antibiotic treatment, and discarded milk retention time due to the risk of antibiotic residues in milk [1]. An intra-mammary infection (IMI) often occur when bacteria invade the mammary gland through the teat canal causing an inflammatory response, which translates in either subclinical (visual symptoms are absent) or clinical mastitis (local and/or systemic symptoms are visible) [2, 3]. The expression of bacterial virulence factors influences the severity of mammary glands inflammation. Many Gram-positive and Gram-negative pathogens can cause mastitis [4]. Most of the time, *S. aureus* causes subclinical and persistent IMIs that often remain undetected and poorly respond to antibiotic treatment [5, 6]. It is also frequently isolated from several clinical cases [5]. The existence of such strains represents a reservoir that maintains the appearance of *S. aureus* infections in herds [7]. The prevalence values of 3.4 to 8.2 % for quarter infections have been observed in several studies where milk samples have been taken randomly from quarters of all cows in herds [8, 9,10].

S. aureus is able to produce a number of virulence factors that contribute in causing and maintaining IMI [11]. These factors are belonging to different groups including surface-associated components and degradative enzymes as well toxins such as staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) [11]. Furthermore, most of *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis are able to produce alpha- and beta-hemolysins and leukocidins provoking host cell destruction [12, 13]. Other molecules like phenol-soluble-modulins (PSM) play a major role in *S. aureus* pathogenesis. Indeed, PSM α are peptides that can facilitate lysis of white blood cells like neutrophils after phagocytosis [14]. *S. aureus* is responsible for causing several types of infections. Many of them are related to biofilm production [15]. The biofilm is defined as a community of bacteria attached to biotic or abiotic surfaces and embedded in a self-synthesized organic polymer matrix [16]. The major component of the extracellular polymer matrix is the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) which synthesis is directed by the *icaADBC* operon [17]. The staphylococcal biofilm is likely a key virulence factor involved in the persistence of the bacteria during bovine mastitis [18]. Indeed, a

previous study from our laboratory showed that some clones of *S. aureus* produce significantly more biofilm than others and that strains that are not eliminated during the antibiotic therapy of the dry period, produce more biofilm than strains that are eliminated after calving [19]. Furthermore, biofilms reduce the effectiveness of antimicrobial peptides, which are important constituents of host innate immune system, reducing phagocytosis during infection and increasing resistance to antibiotics [15, 20]. A relationship between the *ica ADBC* operon and the accessory gene regulator (*agr*) locus, a quorum-sensing system that regulates the expression of many virulence factors in *S. aureus*, has been elucidated. Some studies have reported that low *agr* activity is required to support biofilm formation through the up-regulation of bacterial surface components or adhesins whereas the dispersion of biofilm is controlled by the secretion of proteases and nucleases, which are stimulated by *agr* activation [21, 22]. Thus, biofilm production is a significant contributor to *S. aureus* pathogenesis and the need for alternative therapies that directly tackle this element is of utmost importance.

In the last decades, many natural compounds have been employed in an attempt to disrupt biofilm-associated infections. Such compounds were many but included eugenol [23], lectins [24] and chitosan [25]. In particular, chitosan has been investigated as an antimicrobial agent against a vast range of organisms such as algae, bacteria, yeasts and fungi in experiments involving *in vitro* and *in vivo* interactions with chitosan in different forms (films, solutions and composites) [26]. Chitosan is defined as a linear polysaccharide, derived from the naturally abundant chitin, and organized by D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine units linked by β -1,4-glycosidic linkages [27]. The biological activity of chitosan is dependent on several factors that can considerably vary or that can be modified: the degree of polymerization (DP) or molecular weight (MW), and the degree of deacetylation (DD) are the main known factors [28]. The biodegradability, biocompatibility and non-toxicity, as well as hypoallergenic properties of chitosan have been reported, which justify the use of this polysaccharide in a wide range of possible applications in the pharmaceutical, biomedical, industrial and agricultural fields [29, 30, 31]. Some studies have reported the antibiofilm effect of low molecular weight chitosan (LMWC) hydrogel *in vitro* and *in vivo*. Indeed, LMWC hydrogel (MW 50 kDa, DD 92%) was shown to significantly inhibit biofilm formation by *Candida parapsilosis* *in vitro* and *in vivo* using a catheter mouse model [32]. Similarly, LMWC (MW 107 kDa, DD 75-85%) demonstrated a strong ability to inhibit biofilm production by *S. epidermidis* and *C. albicans* *in*

vitro but was not equally efficient against *S. aureus* strains [33]. In this study, we hypothesized that polycationic polymers such as chitosan, could be used to treat biofilm associated infections caused by *S. aureus* isolates via growth inhibition or biofilm disruption. Most importantly, the use of well-defined forms of chitosan should help segregating some of its important biological activities. Finally, we show here that the combination of chitosan with antibiotics could be useful to enhance the killing of bacteria within preformed biofilms and in a murine model of *S. aureus* IMI.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

The isolates were selected from the Mastitis Pathogen Culture Collection (MPCC) belonging to the Canadian bovine mastitis and milk quality research network (CBMMQRN, St-Hyacinthe, QC, Canada). They include one bovine MRSA (strain 1158c, *spa* type t451, barcode 10812464) and one biofilm hyperproducer (strain 2117, *spa* type t13401, barcode 10705001), evidenced in a previous study [19]. The reference strain for antibiotic susceptibility tests (*S. aureus* ATCC 29213) and the bovine strain Newbould (ATCC 29740) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA).

Chitosan molecules

Chitosan molecules with a DP of ~2 to 4 oligosaccharide units (CHOS, with a number average molecular mass [Mn] of 0.4 - 0.6 kDa), and oligosaccharides of low molecular weight (LMW), Mn of 1.3 kDa (DP ~6 units), Mn of 2.6 kDa (DP ~13 units), and Mn of 4 kDa (DP ~20 units) were prepared from 98% N-deacetylated chitosan (Marinard Biotech, Québec, Canada) by total or partial hydrolysis with endo-chitosanase from *Streptomyces sp.* N174 [34]. Chitosan (25 g/L) was dissolved in 0.2 M acetic acid, mixed up with the chitosanase (0.1 Unit per gram of

chitosan), and incubated for several hours depending of the weight desired at 37°C. The reaction was stopped by heating for 5 min in boiling water. The number average molecular mass (Mn) was estimated by the reducing sugar assay [35]. The hydrolyzed chitosan was recovered by lyophilization. The lyophilized product contained around 1% of residual acetate.

Minimal inhibitory concentration (MIC)

The MICs were determined by using a broth microdilution technique in 96-well plates following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute [36]. Each compound was serially diluted 2-fold with cation-adjusted Muller-Hinton broth (CAMHB) in 96-well plates. Bacteria were inoculated at 10⁵ CFU/ml and plates were incubated at 35°C for 18-24h. Bacterial growth was quantified by measuring the optical density at 600 nm (OD600) using a micro plate reader (Epoch microplate spectrophotometer, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). The MIC value represented the lowest concentration of compound that has an OD600 similar to the control well containing only CAMHB (*i.e.*, no visible growth).

Synergy test

A 96-well plate checkerboard assay was used to identify possible synergy between chitosan and antibiotics. The first antibiotic of the combination was serially diluted 2-fold with CAMHB along the ordinate, while the second drug was diluted along the abscissa [37]. All the wells were inoculated with 10⁵ CFU/ml prepared in CAMHB and the plates were incubated at 35°C for 24 h. The resulting checkerboard contains each combination of two antibiotics, with wells that contain the highest concentration of each antibiotic at the opposite corners. Synergy was expressed when the ratio of the concentration of each antibiotic to the MIC of that antibiotic was same for all components of the mixture. The \sum FICs (fractional inhibitory concentration index) were calculated as follows: \sum FIC= FIC A + FIC B, where FIC A is the MIC of drug A in the combination/MIC of drug A alone, and FIC B is the MIC of drug B in the combination/MIC of

drug B alone. The combination considered synergistic when the \sum FIC is ≤ 0.5 , indifferent or additive when the $0.5 < \sum \text{FIC} < 2$, and antagonistic when the $\sum \text{FIC}$ is ≥ 2 [38].

Kill kinetics

Kill kinetics experiments were performed in order to evaluate the bactericidal effect of chitosan. Bacteria were inoculated at 10^5 CFU/ml in CAMHB in the presence or absence of chitosan. At several points of time, bacteria were sampled, serially diluted and plated on tryptic soy agar (TSA) plates for CFU counts. Plates were incubated for 24 h at 35°C. The detection limit was 10 CFU/ml.

Biofilm production assay

Biofilm production was assessed in sterile flat-bottom 96-well polystyrene microtiter plates. The bacterial isolates were inoculated into a brain heart infusion (BHI) supplemented with 0.25 % glucose (BHIg) and grown for 18 to 24h at 35°C. A cell suspension adjusted to a 0.5 McFarland standard was prepared for each bacterial strain and a volume of 100 μ l was added to the wells containing different forms of chitosan serially diluted 2-fold with BHIg to obtain a final volume of 200 μ L per well. The plates were then incubated at 35°C without agitation for 24h. After incubation, the growth was evaluated by the OD at 600 nm with an Epoch microplate spectrophotometer before discarding the medium. The wells were gently washed three times with 200 μ L of sterile phosphate buffer saline, pH 7.4 (PBS), air dried, and stained with 200 μ L of 0.01% crystal violet for 30min. Each well was re-washed three times with 200 μ L of sterile distilled water prior to the addition of 200 μ L of 95% ethanol. Finally, the biofilm produced in each well was measured by OD at 540 nm and normalized to the growth (OD 600nm). Measurements were done in quadruplicate, and each assay was repeated three times.

To measure the effect of compounds on preformed biofilms, the bacteria were allowed to grow for 24 h in 96-well plates with lids having pegs (Thermo Scientific, Ottawa, ON) according to

the Biofilm Calgary Device method [39]. The bacterial biofilm formed on pegs were washed three times with 200 μ L PBS 1X and were further incubated in new 96-well plates carrying 200 μ L of fresh BHIg containing serial dilutions of tested compounds. The plates were then incubated for another 24h at 35°C, 120 RPM. The treated biofilm on pegs were washed three times with PBS 1X, air dried, and stained with 200 μ L of 0.1% crystal violet for 30 min. All the pegs were washed again two times with 200 μ L of sterile distilled water prior to addition of 200 μ L of 95% ethanol and the OD at 560 nm was measured. Measurements were done in triplicate, and each experiment was repeated three times.

Antibiotic activity in preformed biofilms

The viability of bacteria in preformed biofilms treated with chitosan and antibiotics was evaluated using the peg lid method as described above. In this assay, the biofilm formed on pegs were washed three times with 200 μ L of PBS 1X and were further incubated in new 96-well plates carrying 200 μ L of fresh BHIg containing serial dilutions of tested compounds. The plates were then incubated for another 24h at 35°C, 120 RPM. The treated biofilm on pegs were washed three times with PBS 1X and the bacteria were recovered by sonication in a new 96-well plate containing 200 μ L of PBS 1X per well using an ultra-sonicator bath for 10 min. To recover all the detached bacteria, the 96-well plate was centrifuged for 5 min at 1000 rpm. A volume of 190 μ L was recovered from each well, serially diluted, plated on TSA and incubated at 35°C for 24 h before CFU counting. Measurements were done in triplicate, and each experiment was repeated at least twice.

Cytotoxicity assay

MAC-T bovine mammary epithelial cells were used to evaluate the relative cytotoxicity of chitosan by measuring the release of lactate dehydrogenase from cells (LDH). Briefly, MAC-T cells were seeded in 48-well plates using complete medium (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada)), 10% of fetal bovine serum, antibiotic

antimitotic solution (100 IU/mL of Penicillin sodium salt, 100 µg/mL of Streptomycin sulfate and 0.25 µg/mL of Amphotericin B), sodium pyruvate (1 mM), insulin (5 µg/mL) and hydrocortisone (1 µg/mL)) for 30% of confluence in order to reach 100% of confluence after 2 days of incubation at 37°C with 5% CO₂. After incubation, the cells were washed twice with 1 mL of DMEM pre-warmed at 37°C prior to the addition of 200 µl of a pre-warmed DMEM containing 1% of fetal bovine serum, sodium pyruvate (1 mM), insulin (5 µg/mL) and hydrocortisone (1 µg/mL). A volume of 50 µl of chitosan (5X concentrated), 50 µl of the above described medium acting as the low-toxicity control and 50 µl of triton X-100 (5% v/v) as the high-toxicity control were added to the wells. After 6 h of incubation at 37°C with 5% CO₂, a volume of 200 µl was recovered from the wells and centrifuged at 250 g in order to remove the cells from the culture medium. In 96-well plate, 100 µl of the recovered supernatant was mixed with 100 µl of the reaction mixture from the LDH detection kit (Roche Diagnosis, Indianapolis, IN) and the plate was incubated for 15 min at room temperature prior to measuring the OD at 492 nm and 655 nm, according to the enclosed protocol provided by the manufacturer.

Effect of chitosan on the internalization and persistence of bacteria into MAC-T cells

MAC-T bovine mammary epithelial cells were used to evaluate the ability of chitosan to prevent the internalization and persistence of bacteria within cells. Briefly, MAC-T cells were seeded in 24-well plates using the DMEM complete medium for a confluence of 30 % in order to obtain 100 % of confluence after 2 days of incubation at 37°C with 5% CO₂. MAC-T cells were washed with pre-warmed DMEM prior to the addition of the invasion medium (DMEM containing 1% of fetal bovine serum, sodium pyruvate (1 mM), insulin (5 µg/mL) and hydrocortisone (1 µg/mL)). The day of the experiment, bacteria from an overnight culture were diluted 20 times and grown in a fresh tryptic soy broth for 2 h at 37 °C. Bacteria were centrifuged at 3000 rpm for 10 min and washed two times with cold sterile PBS. Bacteria in PBS at $\sim 4 \times 10^6$ CFU/mL (MOI of 10) were mixed with chitosan at different concentrations prior to addition to the wells containing confluent MAC-T cells. After 3 h of invasion, the cells were washed with DMEM prior to the addition of invasion medium containing lysostaphin (20 µg/ml) and incubated for 30 min (or for 24 h for the intracellular persistence test) at 37°C with 5% CO₂. After incubation, infected MAC-

T cells were washed with DMEM and treated with trypsin 0.25% for 10 min at 37°C prior to the addition of sterile water to lyse the MAC-T cells and release the intracellular bacteria. Immediately after, PBS (10X) was added and CFU counts were obtained after plating serial dilutions of the cell lysate on TSA.

Safety assessment in animals

The innocuity of the different forms of chitosan was evaluated *in vivo* using a mouse mastitis model and cows. Briefly, CD-1 lactating mice were separated from their pups, anesthetized, and received two different doses of chitosan (0.1 mg/gland or 2.5 mg/gland). First, the fourth pair of glands found from the head to tail (L4 and R4 glands) was disinfected with 70% ethanol. Then, 50 µL of chitosan (in PBS) was slowly injected into the lactiferous duct with a 32-gauge blunt needle attached to a 1 ml syringe. Fourteen hours later, mammary glands were harvested and a visual observation performed on tissue. Inflammation scores were given depending on the mammary gland redness.

In order to evaluate the innocuity of the different forms of chitosan in cows, a mammary gland quarter received either 500 mg of chitosan (2.6 kDa or 4 kDa) or saline as negative control after the morning milking. Milk samples were collected aseptically from each quarter before the instillation of chitosan and 2, 4, 8, 21, 33, 45 and 69 h after the intra-mammary injection to evaluate the inflammation by determining the somatic cell count (SCC). Cows were milked every 12 h using a quarters milking machine in order to get individual quarter milk production.

Murine mastitis model

A mouse mastitis model [40, 41] was used to evaluate the capacity of chitosan alone or in combination with an antibiotic to reduce *S. aureus* colonization of mouse mammary glands. Briefly, CD-1 lactating mice were separated from their pups, anesthetized, and infected with *S. aureus* Newbould (ATCC 29740) or *S. aureus* 2117 (both strains isolated from bovine mastitis).

First, 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 was slowly injected into the lactiferous duct with a 32-gauge blunt needle attached to a 1 ml syringe. Two doses of chitosan (in PBS) were administered into the infected mammary glands: one dose was administered immediately after inoculation of bacteria and the second dose was given four hours post-inoculation alone or in combination with tilmicosin (Sigma-Aldrich), after anesthetizing mice. Twelve hours later, *i.e.* 16h 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 glands.

Ethics statement

All the experiments performed with animals were approved by the ethics committee on animal experimentation of the Faculté des sciences of the Université de Sherbrooke (mice) and by the Agriculture and Agri-Food Canada local institutional animal care committee (cows), and were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

RESULTS

Comparison of chitosan forms based on *in vitro* antibacterial and antibiofilm activities.

Bacterial susceptibility tests were performed for a variety of chitosan forms having different degree of polymerization (DP). The different forms of chitosan used in this assay were CHOS (0.4-0.6 kDa), LMW 1.3 kDa, LMW 2.6 kDa and LMW 4 kDa. The MICs obtained with CHOS were 16 mg/ml whereas the LMW 1.3kDa, LMW 2.6 kDa and LMW 4 kDa exhibited much lower MICs (1mg/ml) for all *S. aureus* strains tested (Table 1). Interestingly, the different forms of chitosan were highly deacetylated (98%) and the unique difference was the DP. The results

show that the DP is critical for best activity but that an oligosaccharide of at least 6 units is necessary for maximum antibacterial activity.

Table 1. MICs of the various forms of chitosan against *S. aureus*.

Strain	MIC (mg/ml)			
	CHOS DP 2-3	1,3 kDa DP 6	2,6 kDa DP 13	4 kDa DP 20
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	16	1	1	1
<i>S. aureus</i> bovine 2117	16	1	1	1
MRSA 1158 c	16	1	1	1

In order to delineate the antibiofilm activity of the different forms of chitosan, we first measured their effects on biofilm production by *S. aureus* in 96-well plates. Fig. 1 shows the effect of different forms of LMW chitosan on biofilm formation by the bovine MRSA strain and the biofilm hyperproducer strain. To distinguish the antibiofilm activity from a possible growth inhibitory effect by chitosan, we used the OD ratio 540/600 nm, which evaluate biofilm production based on the overall growth. Using such a ratio, we found that CHOS was only able to inhibit *S. aureus* biofilm production using a concentration as high as 16 mg/ml (data not shown) which is at or near its MIC. Note that MICs are determined using an inoculum of 10^5 - 10^6 CFU/ml, whereas in this biofilm assay the inoculum was 10^8 CFU/ml, a condition that allows visible growth at concentrations up to 4xMIC. As for the other forms of chitosan, a concentration of 2 mg/ml caused a significant decrease in the biofilm/growth ratio except for the 1.3 kDa form, which only affected strain 2117.

Together with the MIC results, it seems that the 2.6 and the 4.0 kDa forms had the best antibacterial and antibiofilm activities against *S. aureus*. Those two forms were therefore further evaluated and compared based on cytotoxicity and safety issues, considering an eventual use of such molecules for the treatment of bovine mastitis.

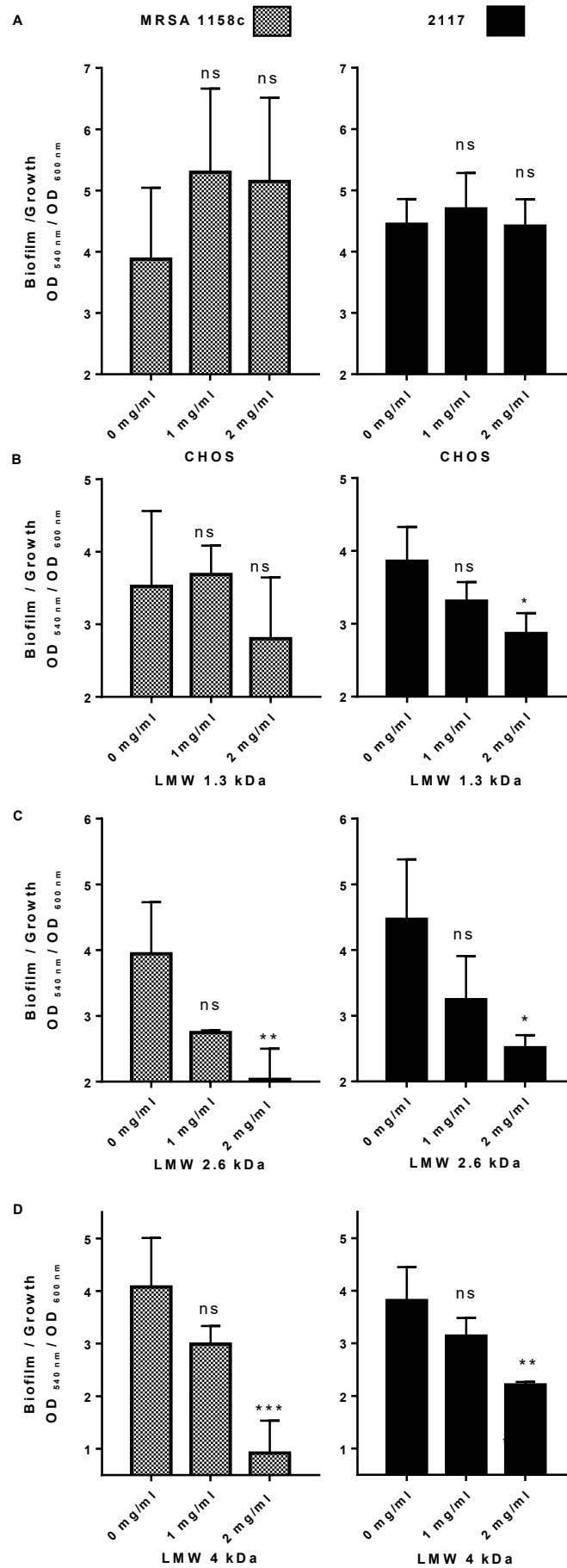


Fig. 1. Antibiofilm activity of the different forms of chitosan against MRSA 1158c and the biofilm hyperproducer strain 2117. (A) CHOS, (B) LMW 1.3 kDa, (C) LMW 2.6 kDa, and (D) LMW 4.0 kDa chitosan. Data were obtained from three independent experiments. Significant differences in comparison to the untreated control (0 mg/ml) are shown by asterisks. Statistical analysis was performed using non-parametric one way ANOVA: ns, non significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Cytotoxicity and safety assessment in animals.

First, the innocuity of the different forms of chitosan was evaluated using two different doses (0.1 mg and 2.5 mg) administered by direct intramammary injection in mice. The results are presented in Table 2. CHOS and the LMW 2.6 kDa chitosan demonstrated a weak or null score of inflammation, compared to the LMW 4.0 kDa molecule showing a score of 2.7 (a score of 3 being the maximum) at the highest dose administered (2.5 mg/gland).

In cows, there was a Treatment*Time interaction ($P < 0.001$). Somatic cell counts (SCC) in milk of quarters treated with the 4.0 kDa chitosan were higher than those treated with saline during all the period of the monitoring ($P < 0.001$). The intramammary injection of the 2.6 kDa chitosan tended to increase only slightly the SCC between 4h and 33h post injection ($P < 0.1$, Fig. 2A). Quarter milk yield was not affected by treatments (Fig. 2B).

MAC-T bovine mammary epithelial cells were then used to evaluate the cytotoxicity of the LMW 2.6 kDa chitosan by assessing LDH release resulting from cell membrane damage (Fig. 3). No toxicity on cells was observed when the 2.6 kDa molecule was used at 0.5 mg/ml and 2 mg/ml (0.5x and 2xMIC, respectively). A slight toxicity was observed compared to the no-compound control when the 2.6 kDa chitosan was used at 8 mg/ml (8xMIC).

This initial safety assessment of chitosan showed that the LMW 2.6 kDa molecule has a promising safety profile and this warranted further investigation on its antibiotic and antibiofilm properties (below).

Table 2. Inflammation scores obtained after administration of chitosan by intramammary injection in mice.

Chitosan forms	Inflammation scores ^a	
	Dose administered per gland (mg)	
	0.1	2.5
CHOS	0	0.1
LMW 2.6 kDa	0.1	0
LMW 4 kDa	0	2.7

^a Inflammation scores were given depending on the mammary gland shape. The inflammation can be: 0: none or slight, 1: moderate, 2: medium and 3: severe. The values represent the mean of tree observations of tree different glands (3 mice).

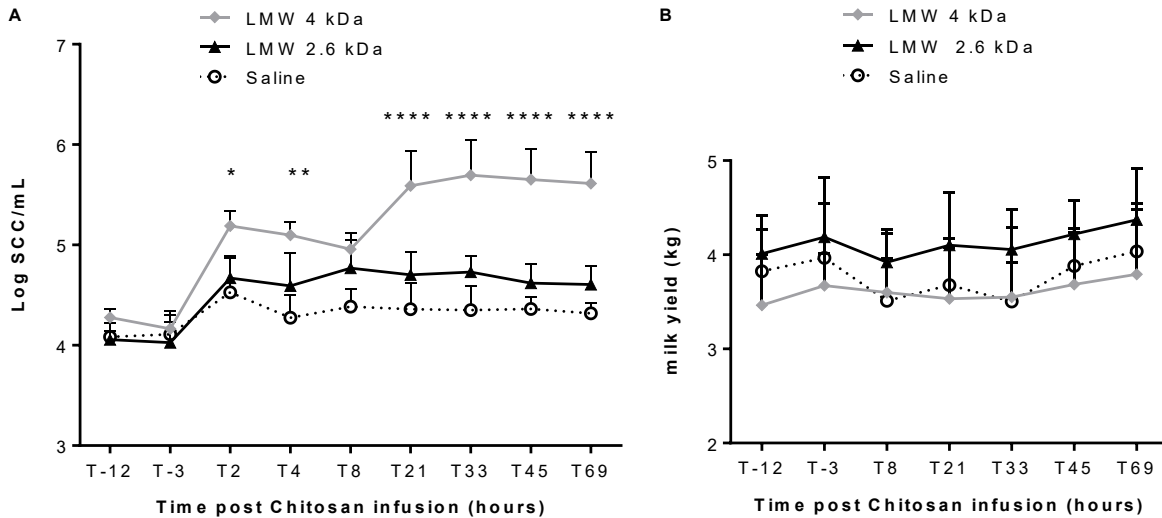


Fig. 2. Relative innocuity of different forms of chitosan in cows. Each quarter of cow’s udder has received 500 mg of chitosan (2.6 kDa or 4 kDa) or saline as the negative control. Milk samples and somatic cell counts (SCC) were determined 12 and 3 hours before the instillation of

chitosan. After the intramammary instillation, milk samples were aseptically collected from cows at several points in time to evaluate inflammation by determining the SCC (A) and milk yields (B). Symbols represent the means and vertical lines the standard deviation. Data were analyzed by ANOVA using the MIXED procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). For the first experiment, time was used as a repeated effect and treatment (cow) was used as the subject. Orthogonal contrasts were performed to compare the effect of each treatment to control. No difference was observed between saline and the 2.6 kDa chitosan (SCC and quarter milk yield). Significant differences were observed between saline and LMW4 kDa for SCC: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

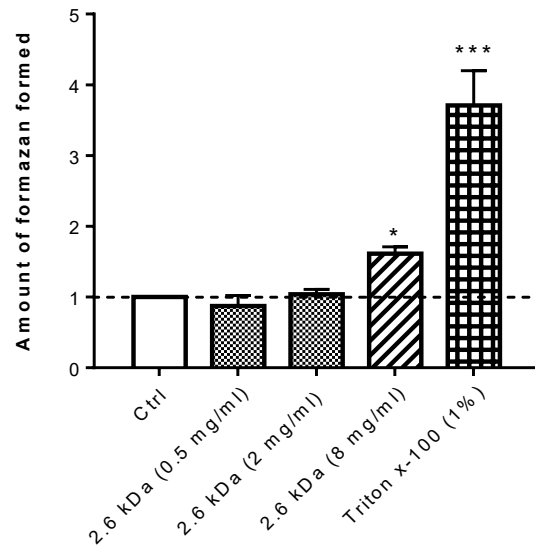


Fig. 3. Effect of the LMW 2.6 kDa chitosan on LDH release from MAC-T bovine mammary epithelial cells. Cells were exposed to the 2.6 kDa chitosan at different concentrations (0.5 mg/ml, 2 mg/ml and 8 mg/ml). Triton x-100 and culture medium were used as cytotoxic positive and negative (Ctrl) controls, respectively. The amount of formazan formed was normalized to the amount formed by the non-treated cells (Ctrl). Bars represent the means and vertical lines the standard deviation (SD). Significant differences in comparison to the negative control (Ctrl) are shown. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis test (non-parametric one way ANOVA) with Dunn's multiple comparison test: *, $P < 0.05$.

Bactericidal activity of the LMW 2.6 kDa chitosan and synergy with antibiotics.

The bactericidal activity of the LMW 2.6 kDa chitosan was determined in time-kill experiments. Fig. 4 shows a strong dose-dependent bactericidal activity of this form of chitosan used at 2xMIC (*i.e.*, 2 mg/ml) against both the bovine MRSA and the biofilm hyperproducer strains (>3 log₁₀ drop in CFU/ml).

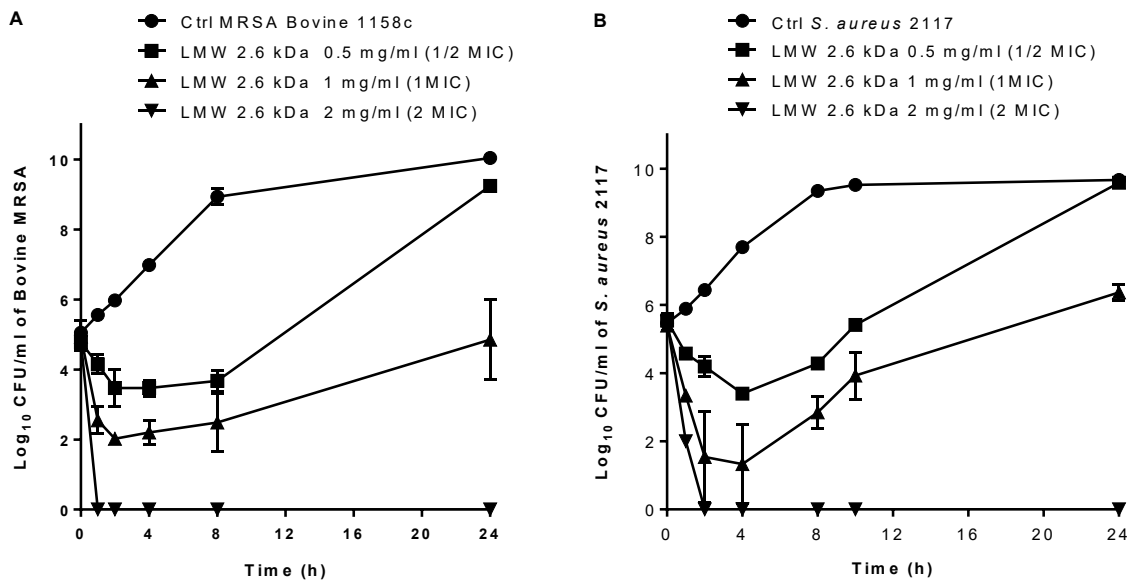


Fig. 4. Time-kill experiments showing the viability of *S. aureus* untreated (Ctrl) or in the presence of increasing concentrations of the LMW 2.6 kDa chitosan, (A) for strain MRSA 1158c, and (B) for the biofilm hyperproducer strain 2117. The CFU detection limit is 10 CFU/ml. Data are presented as means with standard deviations from three independent experiments.

To build up on the observed bactericidal activity of chitosan, a checkerboard assay was then performed to detect any possible synergy between the LMW 2.6 kDa chitosan and any of several classes of antibiotics against *S. aureus* ATCC 29213. The checkerboard result (Table 3) showed

that the 2.6 kDa molecule exhibit synergy with erythromycin belonging to the macrolide class (Σ FIC value: 0.49) as well as with ciprofloxacin, a fluoroquinolone, (Σ FIC: 0.54) although the latter FIC was near the cut-off value (0.5). There were only indifferent or additive effects when chitosan was combined to the other classes of antibiotics. No antagonistic effect was observed. The 2.6 kDa chitosan also demonstrated a synergy when combined with erythromycin also against the bovine MRSA strain 1158c (data not shown). Thus, sub-MICs of chitosan and erythromycin were combined to evaluate the bactericidal activity of such a drug combination in time-kill experiments. Fig. 5A represents residual bacterial counts (CFU/ml) at 10 h post-inoculation for both *S. aureus* 2117 and MRSA in presence of chitosan alone or in presence of erythromycin (both used at 0.25xMIC). Tilmicosin, a macrolide analog of erythromycin usually used for treatment of infections in bovine, was also used in a similar experiment (Fig. 5B). In both cases, chitosan combined with the macrolide significantly reduced the bacterial counts compared to the use of chitosan and/or the macrolide alone even if these compounds were used at sub-MICs.

Table 3. Antibiotic and chitosan (LMW 2.6 kDa) MICs in a checkerboard assay against *S. aureus* ATCC 29213.

Antibiotics (ATB) in the checkerboard assay	ATB MIC alone ($\mu\text{g/ml}$)	ATB MIC with chitosan ($\mu\text{g/ml}$)	Chitosan MIC alone (mg/ml)	Chitosan MIC with ATB (mg/ml)	Σ FIC value	Result ^a
Gentamicin	0.5	0.06	1	0.5	0.62	I
Erythromycin	0.5	0.12	1	0.25	0.49	S
Vancomycin	1	0.5	1	0.5	1.00	I
Chloramphenicol	4	2	1	0.5	1.00	I
Ciprofloxacin	0.25	0.01	1	0.5	0.54	S ^b
Ceftiofur	0.5	0.5	1	0.5	1.50	I
Rifampicin	0.0025	0.0012	1	0.25	0.73	I
Pirlimicycin	0.25	0.06	1	0.5	0.74	I
Oxacillin	0.12	0.12	1	0.5	1.50	I

^a I, indifferent, S, synergy, ^b borderline synergy.

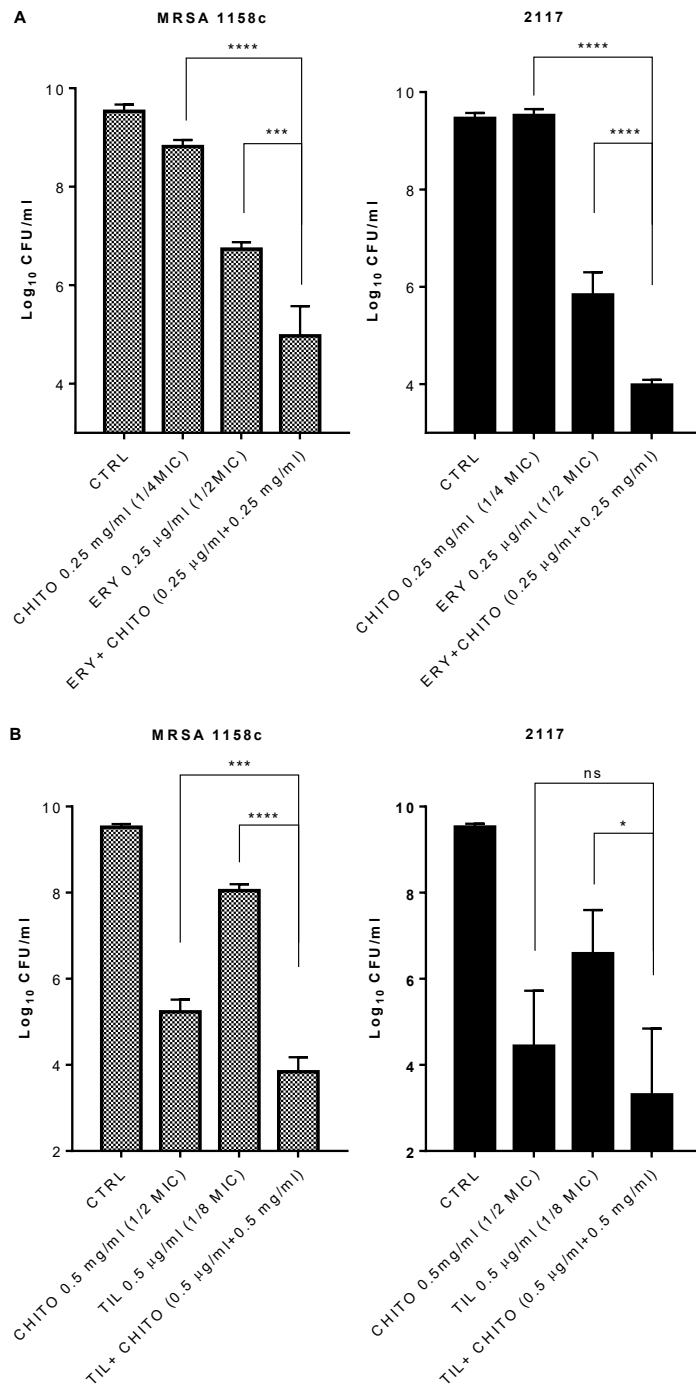


Fig. 5. Viability of *S. aureus* 2117 and MRSA either untreated (CTRL) or in the presence of a sub-MIC of chitosan (LMW 2.6 kDa chitosan, CHITO) used alone or in combination with a sub-MIC of (A) erythromycin (ERY) or (B) tilmicosin (TIL) at 10 h post-inoculation. The sub-MIC concentrations are indicated on the graphs. The CFU detection limit is 10 CFU/ml.

Data are presented as means with standard deviations from three independent experiments. Significant differences between the control (CTRL) and test conditions are shown (ns, non significant; *, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ as determined by using Kruskal-Wallis test (non-parametric one way ANOVA) with Dunn's multiple comparison test.

The 2.6 kDa chitosan kills bacteria embedded in preformed biofilms.

The Calgary biofilm device (96-well plate lids with pegs) was used to further evaluate the ability of the LMW 2.6 kDa chitosan to disrupt a preformed biofilm of *S. aureus* bovine 2117 and MRSA bovine 1158c (Fig. 6). Results show that the 2.6 kDa chitosan exhibited a dose-dependent activity against the preformed biofilm of MRSA (Fig. 6A), which was significantly reduced by using a concentration of 4 mg/ml (4xMIC). The preformed biofilm of the biofilm-hyperproducer strain 2117 was also significantly reduced in the presence of chitosan but distinctively, such an effect was observed at concentrations well below the MIC of chitosan (*i.e.*, < 1 mg/ml) with a strong and significant effect already observed at the lowest concentration tested (0.03 mg/ml).

Also, Fig. 6B shows that the 2.6 kDa chitosan exhibited bactericidal activity against both *S. aureus* strains (MRSA and the biofilm hyperproducer strain 2117) pre-embedded in their biofilms. To some extent, these results paralleled those shown in Fig. 6A. The use of 4 mg/ml (4xMIC) of chitosan caused a $3.9 \log_{10}$ and $1.6 \log_{10}$ reduction in CFUs/peg for *S. aureus* 2117 and the MRSA strain, respectively, in comparison to the untreated biofilm control (Fig. 6B). Interestingly, chitosan demonstrated a dose-dependent bactericidal activity on *S. aureus* 2117 and such an effect was significant at concentrations ≥ 1 mg/ml (Fig. 6B). The latter observation paralleled the dose-dependent effect observed on the biofilm of that strain in Fig. 6A.

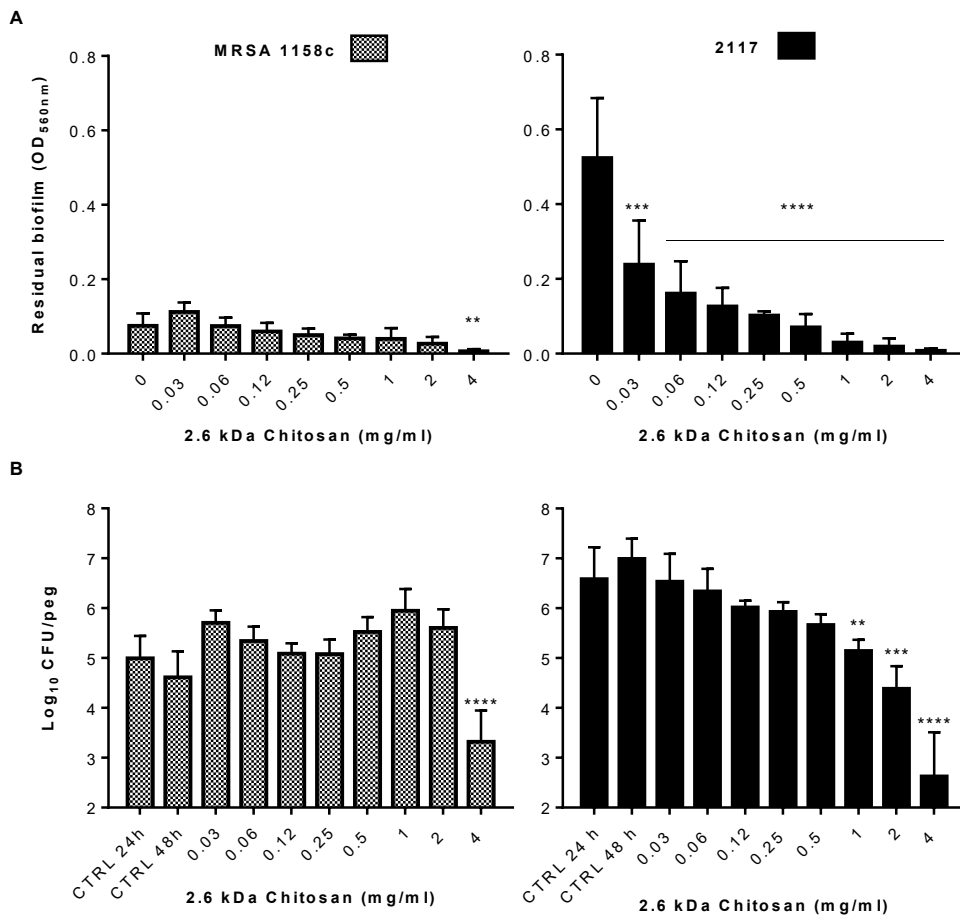


Fig. 6. Preformed biofilms of *S. aureus* strains exposed to the LMW 2.6 kDa chitosan. (A) Reduction of a preformed biofilm on pegs following exposure to increasing concentrations of chitosan. **(B)** Bactericidal effect of chitosan on preformed biofilms. The CFU/peg after 24h of biofilm formation was evaluated for control pegs (CTRL 24h) and this represented the inoculum at the onset of treatment, which occurred at 24h for another 24h of incubation. The CFU/peg obtained for the untreated pegs after the total incubation period served as the reference (CTRL 48h) for treatment efficacy. Data were obtained from three independent experiments. Significant differences in comparison to the untreated controls (0 mg/ml in A, and CTRL 48h in B) are shown. Statistical analysis was performed using non-parametric one way ANOVA: **, P<0.005; ***, P<0.001; ****, P<0.0001.

Bactericidal activity of a chitosan-tilmicosin combination against bacteria embedded in preformed biofilms.

Next, based on data collected from biofilm assays, kill kinetics and observations of antibacterial synergy, it was appropriate to evaluate the bactericidal activity of tilmicosin alone or in combination with a fixed sub-MIC of the 2.6 kDa chitosan against bacteria embedded in preformed biofilms on pegs (Fig. 7). Macrolide antibiotics are primarily bacteriostatic and it was therefore not surprising that tilmicosin used alone in this assay showed limited killing despite utilization of concentrations well above its MIC of 4 $\mu\text{g/ml}$ against both *S. aureus* strains (Fig. 7, white bars). In contrast, tilmicosin combined with the 2.6 kDa chitosan exhibited a dose-dependent activity against both *S. aureus* strains (Fig. 7, grey or black bars). Thus, the addition of 0.5 mg/ml (1/2 MIC) of chitosan enhanced the bactericidal activity of tilmicosin in biofilms.

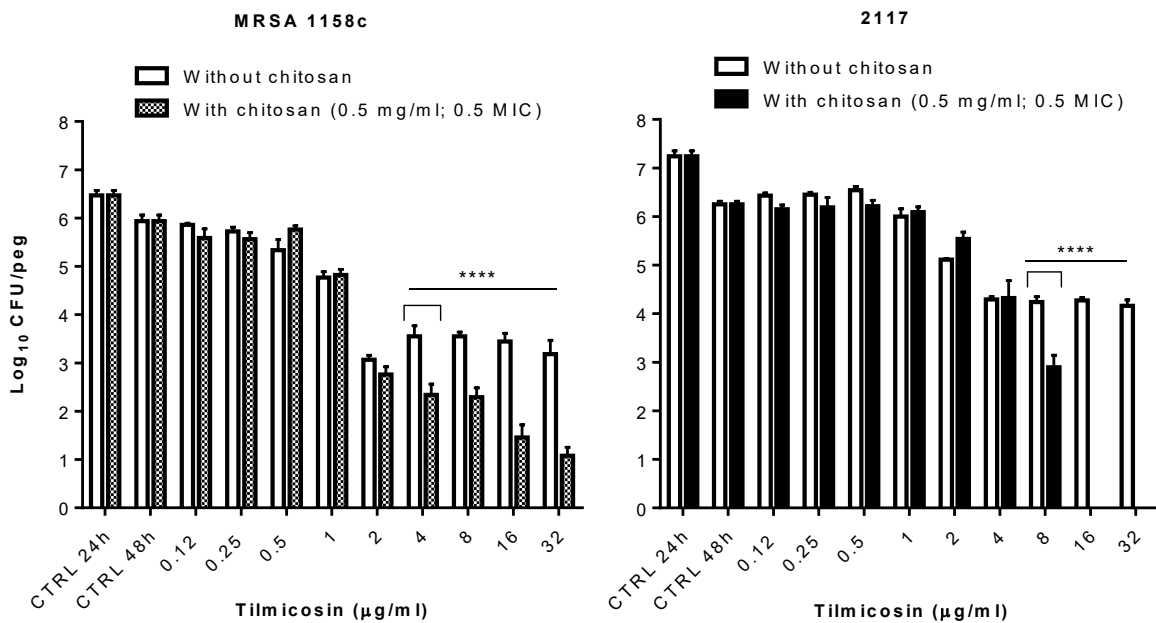


Fig. 7. Bactericidal activity of increasing concentrations of tilmicosin used alone or in combination with a fixed sub-MIC of the LMW 2.6 kDa chitosan against *S. aureus* strains embedded in preformed biofilms. The CTRL 24h and CTRL 48h are as defined in the legend

of Fig. 6. Data were obtained from three independent experiments. Significant differences between tests done with or without chitosan at each tilmicosin concentrations are shown. Statistical analysis was performed using non-parametric one way ANOVA: ****, $P < 0.0001$.

Effect of the LMW 2.6 kDa chitosan on *S. aureus* internalization and persistence into MAC-T cells.

MAC-T bovine mammary epithelial cells were used to evaluate the ability of the LMW 2.6 kDa chitosan to prevent the internalization and the intracellular persistence of *S. aureus*. A 3-h exposure to chitosan does not prevent the internalization of $\sim 6 \log_{10}$ CFU/ml of the MRSA strain into MAC-T cells at the concentrations tested (MIC and 2xMIC; Fig. 8A). However, chitosan used at 2mg/ml was able to significantly reduce the persistence of viable bacteria within the MAC-T cells after 24h compared to the untreated control (Fig. 8B). Note that chitosan was removed from the cell culture after allowing internalization of bacteria (*i.e.*, after the 3-h incubation period in the presence of chitosan). This suggests that the LMW 2.6 kDa chitosan was either internalized with bacteria during the 3-h incubation period and/or was able to cross the cell membrane and accumulate within MAC-T cells during that period.

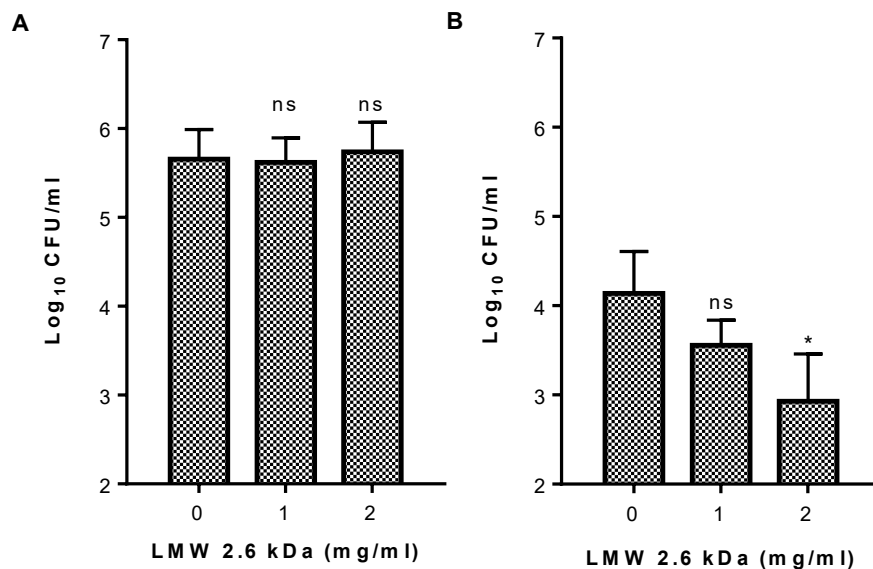


Fig. 8. Evaluation of internalization (A) and persistence (B) of the MRSA strain 1158c into MAC-T cells after exposure to the LMW 2.6 kDa chitosan used at different concentrations.

In A, MAC-T cells were exposed to bacteria and chitosan for a period of 3h before cell cultures were washed and supplemented by lysostaphin to remove extracellular chitosan and bacteria before provoking MAC-T cell lysis for determination of intracellular CFUs (number of intracellular bacteria at 3h). In B, MAC-T cells were exposed to bacteria and chitosan for a period of 3h before cell cultures were washed and supplemented by lysostaphin to remove extracellular chitosan and bacteria before an additional incubation of 24h in the presence of lysostaphin to determine persisting intracellular CFUs (number of intracellular and persistent bacteria at 24h). Data were obtained from three independent experiments. Significant differences in comparison to the untreated control (0 mg/ml) are shown. Statistical analysis was performed using non-parametric one way ANOVA: *, $P < 0.05$.

Efficacy of chitosan for treatment of *S. aureus* intramammary infection in the mouse.

We evaluated the capacity of chitosan alone or in combination with an antibiotic to reduce *S. aureus* colonization of mouse mammary glands. First, the antibacterial activity of the LMW 2.6 kDa chitosan used alone was assessed against *S. aureus* strain Newbould (Fig 9A). *S. aureus* Newbould is a reference bovine strain that was used multiple times in this murine model [40, 41]. Results show that two intramammary instillations of either 2 mg or 10 mg of chitosan were able to significantly reduce colonization of the mammary glands by strain Newbould (Fig. 9A).

Moreover, we tested the ability of chitosan to potentiate the activity of tilmicosin against the biofilm hyperproducer strain *S. aureus* 2117 (Fig. 9B). In this test, two instillations of chitosan at 2 mg/gland was able to enhance the antibacterial activity of tilmicosin by significantly reducing the bacterial counts in glands as compared to the effect obtained with a treatment by tilmicosin or chitosan administered alone. This support the antibacterial synergy found in the checkerboard or bactericidal assays performed *in vitro*.

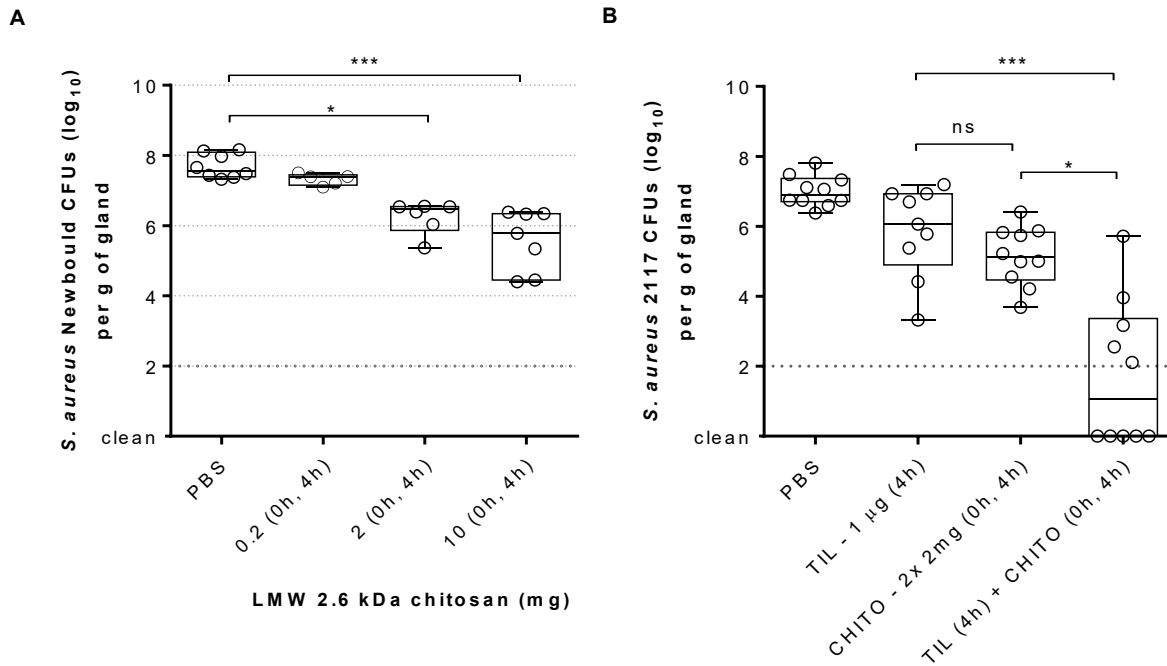


Fig. 9. Efficacy of the LMW 2.6 kDa chitosan used alone or in combination with tilmicosin on *S. aureus* in a mouse mastitis model. (A) Chitosan was administered twice at (0h and 4h post-inoculation) using 0.2, 2 or 10 mg/gland for the challenge against *S. aureus* strain Newbould. (B) A challenge with *S. aureus* strain 2117 was treated with chitosan (CHITO) or tilmicosin (TIL) or a combination of both. Chitosan was administered twice at (0h and 4 h post-inoculation) whereas tilmicosin was administered 4 h post-inoculation. The middle bars indicate median values for each group of glands (n= 5-8) whereas the boxes specify quartiles Q1-Q3. The detection limit was 200 cfu (dotted line), below that, the glands were considered cleaned. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test: *, P<0.05; ***, P<0.001.

DISCUSSION

Bovine mastitis is considered one of the most recurrent and costly diseases of dairy cattle [42]. It usually causes an increase of somatic cells which affects milk quality and production [43]. Additionally, antibiotic treatment of mastitis increases the risk of residues which affect the intrinsic properties of milk [44]. Alternative molecules such as chitosan could avoid some of the problems associated with antibiotics. For example, several studies have reported that chitosan is a biodegradable molecule that can be used in many treatment applications [45]. Besides, the antimicrobial activity of chitosan itself has been reported in some studies against a wide range of bacteria [26]. The molecular weight (MW) or degree of polymerization (DP), and the degree of deacetylation (DD) are the main factors modulating chitosan biological activities [28]. However, a variety of forms and mixtures have been used and reported in the scientific literature rendering difficult the association of a specific form of chitosan to a specific biological activity. In this study, we used well defined forms of chitosan to adequately associate some forms to important biological activities against *S. aureus*, notably the antibiofilm and bactericidal activity of chitosan against this pathogen responsible for a large number of IMI worldwide [46, 47, 48] .

In the present study, susceptibility tests showed that all forms of chitosan exhibited an antibacterial effect against *S. aureus*. The MICs of the LMW forms of 1.3, 2.6 and 4 kDa were however much lower than those obtained with CHOS (0.4-0.6 kDa). Hence, we showed here that the degree of polymerization is critical for activity and that an oligosaccharide of at least 6 units provides maximum antibacterial activity against *S. aureus* when chitosan is highly deacetylated (DD of 98%).

Many studies on the antibacterial activity of chitosan have indeed reported a correlation between its activity and its MW but the use of chitosan of diverse provenance may have generated conflicting results. Some studies described that high chitosan polymerization yielded low activity against *E. coli* [49], while larger chitosan forms showed greater activity than smaller chitosan molecules in another study [50]. One more study reported that a concentration of 1.2 mg/ml of chitosan exhibited a good inhibitory activity against *S. aureus* but the DP of those chitosan molecules was not characterized [51]. Besides, the mode of action of chitosan is still not well understood and it is possible that different forms of chitosan have different modes of action.

Several studies supported the essential polycationic structure of chitosan in antimicrobial activity [52]. Under transmission electron microscope, it was possible to identify chitosan molecules attached on bacteria cell surfaces. The cell membrane became locally detached from the cell wall, generating a “vacuole-like” structure underneath the wall. The detachment produces ions and water efflux, engendering decreases on the internal bacterial pressure [53]. Confirmation of the membrane lysis has been also showed on Gram negative and Gram positive bacteria [54]. Some studies have reported that chitosan interact with the DNA of bacteria and fungi, consequently preventing RNA and protein syntheses [55, 56, 57].

Chitosan can also exhibit a synergy with antibiotics. Using a checkerboard assay, we found that the 2.6 kDa chitosan exhibited a synergy with macrolides such as erythromycin and tilmicosin. Other studies have reported a synergy of chitosan with disinfectants or antibiotics such as chlorhexidine and sulfamethoxazole for combating dental plaque or improving antibiotic activity against *Pseudomonas aeruginosa*, respectively [58, 59].

As mentioned in the introduction section, biofilm production is a significant contributor of *S. aureus* pathogenesis and consequently we have also investigated the antibiofilm activity of the different forms of chitosan we had in hands. As reported for *Candida albicans* [60], our chitosan molecules with the highest molecular weight (2.6 and 4.0 kDa) had the most antibiofilm activity against *S. aureus*. This was evidenced using the biofilm/growth ratio to rule out direct growth inhibition. In fact, examining the effect of chitosan on preformed biofilms from the bovine MRSA and the biofilm-hyperproducer strain 2117, we better demonstrated that the antibiofilm activity of the 2.6 kDa chitosan affects biofilm at concentrations much below the MIC, at least for strain 2117.

Interestingly, some studies reported that the biofilm matrix composition differs between that produced by MRSA and that from methicillin-susceptible strains (MSSA). Indeed, this bacterium is able to form biofilm by *ica*-dependent and *ica*-independent pathways. The *ica*-dependent biofilm formation in MSSA is mostly mediated by the polysaccharide intercellular adhesin or poly-N-acetyl-glucosamine (PIA/PNAG), which is produced by enzymes encoded by *icaADBC* operon, whereas the *ica*-independent biofilm formation in MRSA is mediated by protein-protein interactions [61, 62]. This possible difference in the biofilm matrices of our bovine strains (MRSA vs. 2117) may perhaps explain why the biofilm of strain 2117 was so much more

affected by chitosan in our study. Many antibiofilm polysaccharides, including chitosan, are believed to act as surfactant molecules that modify the physical characteristics of bacterial cells and abiotic surfaces. However, some reports mentioned that polysaccharides may act as signaling molecules that modulate gene expression of recipient bacteria leading to biofilm disruption or inducing cell motility [63, 64, 65]. It remains to be seen if the regulatory pathway by which strain 2117 hyperproduces biofilm compared to other *S. aureus* strains [19] can be specifically modulated by chitosan.

The bactericidal activity of our 2.6 kDa chitosan alone or in combination with tilmicosin against bacteria embedded in preformed biofilm showed that the synergy observed in susceptibility tests with planktonic cells also applies in such experimental conditions. Whether chitosan helps disrupting the biofilm thus helping the antibiotic to act on bacteria that are released from the biofilm or whether chitosan combines its own bactericidal action to the bacteriostatic effect of this macrolide antibiotic against the embedded bacteria, is still unknown. It was recently proposed that chitosan helps gentamicin efficacy in biofilms by facilitating the penetration of this aminoglycoside into the biofilm architecture of *Listeria monocytogenes* [66]. This is indeed yet another possibility to explore.

Many interesting properties of chitosan such as biocompatibility, low toxicity and biodegradability give the feasibility for it to be employed in numerous applications [67]. In the present study, we have shown that the LMW 2.6 kDa chitosan was non-cytotoxic for bovine mammary epithelial cells at a concentration of at least 2xMIC and that this concentration significantly reduced the presence of intracellular bacteria. This reduction of intracellular bacterial persistence was probably due to the penetration of chitosan molecules through the MAC-T cell membrane as visualized by epifluorescence and differential interference contrast microscopy, and which allowed a continued bactericidal action after internalization. We did not observe any effect of the 2.6 kDa chitosan on the initial rate of *S. aureus* internalization into MAC-T cells. In contrast, it was reported that chito-oligosaccharides (CHOS, DP range of 2-20) at concentrations of 1-16 mg/ml were able to reduce the adherence of Gram negative bacteria onto eukaryotic cells [68], showing that similar forms of chitosan may affect differently distinct microbial species. The anti-adherence characteristic of oligosaccharides has been assigned to the

resemblance between the oligosaccharide structure and cell surface receptor to which some bacteria attach prior to colonization [68].

We showed here that among the chitosan forms tested, the LMW 2.6 kDa molecule appeared innocuous in mice and in cows after intramammary instillation. This was in contrast to the 4.0 kDa molecule, which caused visible signs of inflammation. It was then possible to use the 2.6 kDa chitosan as a therapeutic agent alone or in combination with tilmicosin in a *S. aureus* intramammary infection model. We found that the 2.6 kDa chitosan was indeed able to significantly reduce the bacterial counts in the mammary glands in a dose-response manner. In addition, the combination of the 2.6 kDa molecule and tilmicosin was significantly more effective than chitosan or tilmicosin used alone. Such an effect of the combination confirmed the synergy already observed in susceptibility tests and against preformed biofilms *in vitro*.

Many factors may account for the efficacy of chitosan observed in the intramammary infection model. The reduction of the mammary gland colonization by *S. aureus* could of course be explained in part by the bactericidal activity of the chitosan molecules as observed *in vitro*. Likewise, the antibiofilm activity of chitosan observed *in vitro* may also have contributed, although this is difficult to demonstrate *in vivo*.

CONCLUSION

This study highlighted the antibiofilm and bactericidal properties of the LMW 2.6 kDa chitosan with a degree of polymerization of 13 and a high degree of deacetylation (98.24%) against MSSA and MRSA strains of bovine origin. The use of biodegradable and innocuous compounds such as chitosan alone or in combination with low concentrations of antibiotics like tilmicosin, may represent an alternative treatment for intramammary infections caused by *S. aureus* and could notably help reducing antibiotic use in dairy farms.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a contribution from the Dairy Research Cluster initiative [Dairy Farmers of Canada (Ottawa, ON, Canada), Agriculture and Agri-Food Canada (Ottawa, ON, Canada), and the Canadian Dairy Commission (Ottawa, ON, Canada)] through the Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network (St-Hyacinthe, QC, Canada).

A. Asli received a studentship from Op+Lait, *le Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale* supported by the FRQNT, les *Fonds de Recherche du Québec, Nature et Technologies* (St-Hyacinthe, Québec, Canada).

REFERENCES

1. Geary U, Lopez-Villalobos N, Begley N, McCoy F, O'Brien B, O'Grady L, Shalloo L. 2012. Estimating the effect of mastitis on the profitability of Irish dairy farms. *J Dairy Sci.* 95(7):3662-73.
2. Aitken SL, Corl CM, Sordillo LM. 2011. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 16(4):291-304.
3. De Vliegher S, Fox LK, Piepers S, McDougall S, Barkema HW. 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci.* 95(3):1025-40.
4. Olde Riekerink RG, Barkema HW, Kelton DF, Scholl DT. 2008. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* 91, 1366-1377.
5. Reyher KK, Dufour S, Barkema WH, Des Côteaux L, DeVries JT, Dohoo RI, Keefe PG, Roy JP, Scholl DT. 2011. The National Cohort of Dairy Farms--A data collection platform for mastitis research in Canada. *J Dairy Sci.* 94, 1616-1626.
6. Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. 2006. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 89:1877–1895.
7. Anderson KL, Lyman RL. 2006. Long-term persistence of specific genetic types of mastitis-causing *Staphylococcus aureus* on three dairies. *J Dairy Sci.* 89(12):4551-6.
8. Østerås O, Sølverød L, Reksen O. 2006. Milk culture results in a large Norwegian survey-effect of season parity, days in milk, resistance and clustering. *J Dairy Sci.* 89:1010-1023.
9. Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. 2004. Bovine mastitis in Finland 200—prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci.* 87:2433-2441.

10. Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci.* 89:2542-2551.
11. Foster TJ. 2004. The *Staphylococcus aureus* "superbug". *J Clin Invest.* 114(12):1693-6.
12. Aarestrup FM, Larsen HD, Eriksen NH, Elsberg CS, Jensen NE. 1999. Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS.* 107(4):425-430.
13. Rainard P, Corrales JC, Barrio MB, Cochard T, Poutrel B. 2003. Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10:272-277.
14. Otto M. 2014. Phenol-soluble modulins. *Int J Med Microbiol.* 304(2):164-9.
15. Otto M. 2012. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinant of pathogenicity. *Annu Rev Med.* 64: 1-14.
16. Costerton JW. 1999. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents.* 11: 217-221.
17. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun.* 67(10):5427-33.
18. Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. 2006. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *Vet J.* 171:398-407.
19. Veh KA, Klein RC, Ster C, Keefe G, Lacasse P, Scholl D, Roy JP, Haine D, Dufour S, Talbot BG, Ribon AO, Malouin F. 2015. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and non persistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. *J Dairy Sci.* 98(1):155-68.

20. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 35: 322–332.
21. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Demelio V, Spina D, Nicoletti G, Stefani S. 2007. *agr*-Genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 51(1):220-7.
22. Boles BR, Horswill AR. 2008. *Agr*-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*. 4(4):e1000052.
23. Yadav MK, Chae SW, Im GJ, Chung JW, Song JJ. 2015. Eugenol: a phyto-compound effective against methicillin-resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* clinical strain biofilms. *PLoS One*. 10(3):e0119564.
24. Klein RC, Fabres-Klein MH, de Oliveira LL, Feio RN, Malouin F, Ribon Ade O. 2015. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts Staphylococcal biofilms. *PLoS One*. 10(3):e0120514.
25. Cobrado L, Silva-Dias A, Azevedo MM, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. 2013. *In vivo* antibiofilm effect of cerium, chitosan and hamamelitannin against usual agents of catheter-related bloodstream infections. *J Antimicrob Chemother*. 68(1):126-30.
26. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol*. 144(1):51-63.
27. Jarmila V, Vavříková E. 2011. Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities--a review. *Curr Pharm Des*. 17(32):3596-607.
28. Vårum KM, Smidsrød O. 2005. Structure-property relationships in chitosans, In: Dumitriu S, (Ed.), *Polysaccharides*, 2nd ed: Structural Diversity and Functional Versatility. Marcel Dekker Inc, New York. pp. 625–642.
29. Dodane V, Vilivalam VD. 1998. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm Sci Tech Today*. 1, 246–253.

30. Harish Prashanth KV, Tharanathan RN. 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential -an overview. *Trends Food Sci Technol.* 18, 117–131.
31. Bhatnagar A, Sillanpää M. 2009. Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater - A short review. *Adv Colloid Interface Sci.* 152, 26–38.
32. Silva-Dias A, Palmeira-de-Oliveira A, Miranda IM, Branco J, Cobrado L, Monteiro-Soares M, Queiroz JA, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. 2010. Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida* species. *Med Microbiol Immunol.* 203:25–33.
33. Cobrado L, Azevedo MM, Silva-Dias A, Ramos JP, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. 2012. Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? *J Antimicrob Chemother.* 67(5): 1159–1162.
34. Boucher I, Dupuy A, Vidal P, Neugebauer WA, Brzezinski R. 1992. Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174. *Appl Microbiol Biotechnol.* 38: 188-193.
35. Lever M. 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Anal Biochem.* 47(1):273-9.
36. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Information Supplement.* CLSI documents M100-S16 [ISBN 1-56238-588-7]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.
37. Mitchell G, Lafrance M, Boulanger S, Séguin DL, Guay I, Gattuso M, Marsault E, Bouarab K, Malouin F. 2012. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multi-resistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. *J Antimicrob Chemother.* 67(3):559-68.

38. Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. 2005. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. J Clin Microbiol. 43(1):140-3.
39. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. 1999. The Calgary biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. J Clin Microbiol. 37:1771-1776.
40. Brouillette E, Grondin G, Lefebvre C, Talbot BG, Malouin F. 2004. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. Vet Microbiol. 101:253-262.
41. Brouillette E, Malouin F. 2005. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: Study models in the mouse. Microb Infect. 7:560-568.
42. Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. Vet Q. 29(1):18-31.
43. Ma Y, Ryan C, Barbano DM, Galton DM, Rudan MA, Boor KJ. 2000. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. J Dairy Sci. 83(2):264-74.
44. McEwen SA, Black WD, Meek AH. 1991. Antibiotic residue prevention methods farm management, and occurrence of antibiotic residues in milk. J Dairy Sci. 74(7):2128-37.
45. Saber A, Strand SP, Ulfendahl M. 2010. Use of the biodegradable polymer chitosan as a vehicle for applying drugs to the inner ear. Eur J Pharm Sci. 39(1-3):110-5.
46. Fox LK, Zadoks RN, Gaskins CT. 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. Vet Microbiol. 107(3-4):295-9.
47. Aarestrup FM, Wegener HC, Rosdahl VT, Jensen NE. 1995. Staphylococcal and other bacterial species associated with intramammary infections in Danish dairy herds. Acta Vet Scand. 36(4):475-87.

48. Fournier C, Kuhnert P, Frey J, Miserez R, Kirchhofer M, Kaufmann T, Steiner A, Graber HU. 2008. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res Vet Sci.* 85(3):439-48.
49. Zheng LY, Zhu JF. 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers.* 54(4), 527-530.
50. Tokura S, Ueno K, Miyazaki S, Nishi N. 1996. Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan. In *New Macromolecular Architecture and Functions* (pp. 199-207). Springer Berlin Heidelberg.
51. Islam M, Masumb SM, Mahbuba KR, Haque M. 2011. Antibacterial Activity of Crab-Chitosan against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Adv Scient Res.* 2(4): 63-66.
52. Raafat D, Sahl HG. 2009. Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey. *Microb Biotechnol.* 2(2):186-201.
53. Raafat D, von Barga K, Haas A, Sahl HG. 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl Environ Microbiol.* 74(12):3764-73.
54. Chung YC, Chen CY. 2008. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresour Technol.* 99(8):2806-14.
55. Tarsi R, Muzzarelli RAA, Guzman CA, Pruzzo C. 1997. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. *J Dent Res.* 76: 665–672.
56. Liu XF, Guan YL, Yang DZ, Li Z, De Yao K. 2001. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J Appl Polym Sci.* 79: 1324–1335.
57. Rabea EI, Badawy ME-T, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromol.* 4: 1457–1465.

58. Decker EM, von Ohle C, Weiger R, Wiech I, Brex M. 2005. A synergistic chlorhexidine /chitosan combination for improved antiplaque strategies. *J Periodontal Res.* 40(5):373-7.
59. Tin S, Kishore R. Sakharkar, Chu Sing Lim, Meena K. Sakharkar. 2009. Activity of chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Biol Sci.* 5(2):153-60.
60. Costa E, Silva S, Tavaría F, Pintado M. 2014. Antimicrobial and antibiofilm activity of chitosan on the Oral Pathogen *Candida albicans*. *Pathogens.* 3(4):908-19.
61. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, O'Gara JP. 2007. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol.* 45(5):1379-88.
62. Vergara-Irigaray M, Valle J, Merino N, Latasa C, García B, Ruiz de Los Mozos I, Solano C, Toledo-Arana A, Penadés JR, Lasa I. 2009. Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. *Infect Immun.* 77(9):3978-91.
63. Kim Y, Oh S, Kim SH. 2009. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduces biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem Biophys Res Commun.* 379: 324–329.
64. Karatan E, Watnick P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73: 310–347.
65. Kaplan JB. 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res.* 89: 205–218.
66. Mu H, Guo F, Niu H, Liu Q, Wang S, Duan J. 2014. Chitosan improves anti-biofilm efficacy of gentamicin through facilitating antibiotic penetration. *Int J Mol Sci.* 15 (12): 22296-308.
67. Kumar MN, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev.* 104(12):6017-84.

68. Quintero-Villegas MI, Aam BB, Rupnow J, Sørli M, Eijsink VG, Hutkins RW. 2013. Adherence inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by chitooligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization. J Agric Food Chem. 61(11):2748-54.

CHAPITRE 3

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

La mammite bovine est considérée comme l'une des maladies les plus récurrentes et coûteuses de l'industrie laitière (Halasa et al, 2007). Elle provoque généralement une augmentation de la présence des cellules somatiques qui affecte la qualité du lait et une diminution de sa production (Ma et al, 2000). L'utilisation d'antibiotiques comme traitement de la mammite, augmente le risque de résidus qui affecte les propriétés intrinsèques du lait (McEwen et al, 1991). Des molécules alternatives telles que le chitosane peuvent être utilisées pour éviter ce risque de résidus dans le lait. En outre, le chitosane est une molécule biodégradable qui peut être utilisée dans plusieurs applications grâce à ses propriétés bioadhésives (Saber et al, 2010). L'activité antimicrobienne du chitosane a été rapportée contre plusieurs types de bactéries (Kong et al, 2010). Dans notre étude, le test de susceptibilité a montré que les différentes formes de chitosane présentaient un effet antibactérien contre certains isolats de *S. aureus* provenant de cas de mammite bovine. Cet effet est obtenu lorsque le chitosane est fortement déacétylé avec un degré de déacétylation (DD) de 98% et contient plus d'unités de D-glucosamine avec un degré de polymérisation (DP) d'au moins 3 unités dans notre cas. L'activité antibactérienne du chitosane est souvent liée à la charge positive résultante de la déacétylation des unités de sucre. En effet, l'efficacité du chitosane dépend du degré de la déacétylation qui fournit la charge positive aux molécules et le degré de polymérisation qui augmente le nombre d'unités chargées dans la structure du chitosane. Ainsi, plusieurs études ont rapporté une corrélation entre l'activité bactéricide et le degré de polymérisation du chitosane (Tikhonov et al, 2006). Le mode d'action de chitosane reste encore à déterminer. Plusieurs études suggèrent l'importance de la structure polycationique du chitosane dans l'activité antimicrobienne (Raafat et al, 2009). Au microscope électronique à transmission, il a été possible de localiser des molécules de chitosane attachées aux surfaces bactériennes. Suite à cette interaction, la membrane bactérienne est détachée localement de la paroi cellulaire produisant ainsi la formation d'une structure similaire à des vacuoles sous la paroi cellulaire. Ce détachement produit des ions et des efflux d'eau provoquant la diminution de la pression interne des bactéries (Raafat et al, 2008). D'autres études ont signalé que les molécules de chitosane interagissent avec l'ADN cellulaire des bactéries et des

champignons en inhibant la réplication de l'ADN, ainsi que la transcription de l'ARN et la synthèse protéique (Chung et al, 2008). En combinaison, le chitosane peut également présenter une synergie avec certains antibiotiques. Dans la littérature, des études ont montré que le chitosane présentait une synergie avec des désinfectants et des antibiotiques tels que la chlorhexidine et le sulfaméthoxazole respectivement (Decker et al, 2005; Tin et al, 2009). En utilisant l'essai du damier, nous avons trouvé que le LMW 2,6 kDa présentait une synergie avec les macrolides tels que l'érythromycine et la tilmicosine. Basé sur cet effet synergique, nous suggérons que les molécules de chitosane perturbent probablement la paroi cellulaire et la membrane cellulaire, ce qui facilite par conséquent l'entrée des macrolides dans la cellule bactérienne. Nos résultats ont montré que le LMW 2,6 kDa était capable d'améliorer l'efficacité des macrolides, inhibiteurs de la synthèse protéique, en utilisant de faibles concentrations d'érythromycine et la tilmicosine pour inhiber la croissance bactérienne.

Dans la littérature, certaines études ont montré l'activité antibiofilm du chitosane contre les bactéries et les champignons. Une étude a montré que le LMWC (1,5 mg / ml) et le HMWC (0,5 mg / ml) ont été capables de réduire la formation de biofilm de *C. albicans* (Costa et al, 2014). Nos résultats montrent que les formes LMW 2,6 kDa et LMW 4 kDa présentaient une activité antibiofilm dose-réponse contre le SARM bovin et la souche bovine *S. aureus* 2117 avec une réduction de la formation du biofilm à une concentration élevée. En outre, la forme LMW 2,6 kDa montrait un effet perturbateur avec une activité dose-dépendante contre le biofilm préformé des deux souches. La plupart des polysaccharides dotés d'activité antibiofilm y compris le chitosane agissent comme des molécules tensioactives (surfactants) qui modifient les caractéristiques physiques des cellules bactériennes et des surfaces abiotiques. Par contre, certaines études ont signalé que les polysaccharides peuvent agir comme des molécules de signalisation qui modulent l'expression des gènes de la bactérie hôte (Kim et al, 2009). Différents mécanismes ont été impliqués dans la perturbation des biofilm bactérien incluant la mort cellulaire, la production d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire et l'induction de la motilité cellulaire (Karatan et al, 2009; Kaplan, 2010). Concernant l'activité antimicrobienne, nous avons montré que le LMW 2,6 kDa était capable de réduire significativement le nombre de bactéries dans le biofilm préformé des deux souches. En outre, le LMW 2,6 kDa (1/2 CMI) a permis d'améliorer l'activité antibactérienne de la tilmicosine de 8 fois contre les bactéries en biofilm préformé en facilitant la pénétration de l'antibiotique. Cet événement peut être traduit par

un stress physique de la structure du biofilm en raison de la perméabilité de la membrane cellulaire, ce qui permet une pénétration accrue de la tilmicosine. Le même phénomène a été rapporté lorsque le chitosane a été utilisé en combinaison avec la gentamicine (Mu et al, 2014).

La non-toxicité des molécules du chitosane a été rapportée dans de nombreuses études. Les caractéristiques intéressantes de ce polysaccharide telles que la biocompatibilité, la non-toxicité et la biodégradabilité lui permettent son utilisation dans de nombreuses applications (Kumar et al, 2004). Nos résultats ont montré que la forme LMW 2,6 kDa n'est pas toxique à des concentrations faibles comparativement à 1% de réactif triton X-100. Ce résultat confirme l'effet de non-toxicité du chitosane contre les cellules épithéliales mammaires bovines MAC-T. Basé sur ces données, nous avons évalué la capacité du LMW 2,6 kDa pour prévenir l'internalisation et/ou la persistance des bactéries dans les cellules épithéliales mammaires bovines MAC-T. Nous avons trouvé que LMW 2,6 kDa pouvait réduire la persistance, mais pas l'internalisation, de SARM bovin dans les cellules MAC-T. Cette prévention de la persistance est probablement due à la pénétration des molécules de chitosane à travers la membrane des cellules mammaires sans causer de dommage comme prévu avec l'essai de toxicité. Ainsi, les molécules de chitosane et les bactéries ont probablement pénétré en même temps dans les cellules MAC-T et un tel effet a été observé uniquement que dans les cellules MAC-T après 24 h d'incubation. Dans la littérature, une étude a démontré la capacité des chitooligosaccharides (CHOS) à inhiber l'adhésion des EPEC aux cellules HEp-2. L'anti-adhérence des oligosaccharides est due à la ressemblance entre la structure des oligosaccharides et celle des récepteurs de surface cellulaire auxquels se fixent les bactéries avant la colonisation (Quintero-Villegas et al, 2013). Dans notre cas, les molécules LMW 2,6 kDa n'étaient pas en mesure de démontrer un tel effet, probablement en raison de la pénétration des molécules à travers la membrane cellulaire. Cette hypothèse pourrait être confirmée par des études qui ont rapporté que les molécules de chitosane sont capables de pénétrer dans les cellules végétales, 15 minutes après leur application sur la surface du tissu végétal (Hadwiger et al, 1981).

Finalement, nous avons trouvé que la forme LMW 2,6 kDa était capable d'interférer avec la colonisation des glandes mammaires des souris CD-1, en réduisant le nombre de bactéries d'une manière dose-réponse. En outre, la combinaison LMW 2,6 kDa-tilmicosine permettait de réduire également cette colonisation bactérienne comparativement au LMW 2,6 kDa ou au tilmicosine

seule. La réduction de la colonisation intramammaire pourrait être expliquée par la capacité des molécules de chitosane à tuer les bactéries en déployant les propriétés antibactériennes comme décrit précédemment. En outre, LMW 2,6 kDa améliorait l'activité bactéricide de la tilmicosine, connue souvent comme bactériostatique. À la lumière de ces résultats, on suppose que la tilmicosine réduisait le nombre de bactéries probablement suite à des dommages provoqués par les molécules de chitosane au niveau de la membrane bactérienne. Une autre hypothèse pourrait expliquer ce phénomène par le fait que les molécules de chitosane stimulent le système immunitaire en activant les polynucléaires afin d'éliminer les bactéries par phagocytose sans provoquer d'inflammation. En outre, de nombreuses études ont montré que les molécules de chitosane sont capables de diminuer l'inflammation en réduisant les niveaux d'ARNm d'interleukines (IL-4, IL-5, IL-13) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) dans le tissu pulmonaire (Chung et al, 2012).

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la forme 2,6 kDa, les bactéries de *S. aureus* peuvent être exposées à des concentrations variables de chitosane pour une durée très courte en respectant les courbes de bactéricidie préalablement établies. Cette courte exposition permettra de récolter un culot bactérien contenant des bactéries influencées par l'effet des molécules de chitosane. Ce culot bactérien permettra par la suite d'établir une étude transcriptomique en isolant d'abord, l'ARN total et en faisant le séquençage aléatoire du transcriptome entier ou RNA-Seq. Cette technique permettra d'identifier et de quantifier l'ARN provenant de la transcription du génome lors de l'exposition des bactéries au chitosane. L'analyse permettra de révéler la modulation probable des différents gènes essentiels à la survie en présence de chitosane (réponse à un stress spécifique) indiquant ou suggérant un mode d'action pour cet agent antibactérien.

In vivo, l'administration intramammaire de 2,6 kDa n'a révélé aucun effet inflammatoire notable chez la souris et chez les vaches laitières. Ceci permettra une utilisation future des molécules de 2,6 kDa seules ou en combinaison avec de faibles doses de macrolide (ex : tilmicosine) pour traiter les infections intramammaires en réduisant d'abord, la colonisation des bactéries de *S. aureus* dans les glandes mammaires des vaches laitières de même que l'utilisation des antibiotiques.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La mammite bovine représente la maladie la plus coûteuse dans l'industrie laitière. L'antibiothérapie demeure une option intéressante pour le traitement de la mammite, car elle permet d'éliminer les signes cliniques de la glande mammaire et soulager les souffrances des vaches. Par contre, ce type de traitement conventionnel devrait être utilisé en dernier recours car cela force le retrait et la perte du lait des vaches traitées au cas où des résidus d'antibiotiques se retrouveraient dans le réservoir de lait. La vaccination est un très bon outil pour éviter la mammite bovine car elle permet de stimuler le système immunitaire de la vache et elle représente un très bon moyen de prévention de la maladie. Par contre, la vaccination devrait cibler l'ensemble des pathogènes contagieux comme *S. aureus* et les pathogènes environnementaux tel que *E. coli*. En outre, l'utilisation des molécules naturelles biodégradables pourrait constituer une alternative de traitement. Dans cette étude, nous avons mis en évidence les propriétés antibactériennes et antibiofilm d'un chitosane de 2,6 kDa avec des caractéristiques spécifiques telles que le degré de polymérisation (DP: 13) et un degré de déacétylation élevé (DD: 98%) contre les souches bovines SASM et SARM. L'utilisation de chitosane seul ou en combinaison avec de faibles concentrations d'antibiotique comme la tilmicosine, pourrait représenter une alternative de traitement pour les infections intramammaires (IIM) causées par les souches de *S. aureus* et pourrait également réduire l'utilisation des antibiotiques dans les élevages laitiers.

BIBLIOGRAPHIE

Adachi W, Sakihama Y, Shimizu S, Sunami T, Fukazawa T, Suzuki M, Yatsunami R, Nakamura S, Takenaka A. 2004. Crystal structure of family GH-8 chitosanase with subclass II specificity from *Bacillus sp.* K17. *J Mol Biol.* 343, 785–795.

Aitken SL, Corl CM, Sordillo LM. 2011. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 16(4):291-304.

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

Amagai M, Matsuyoshi N, Wang ZH, Andl C, Stanley JR. 2000. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med.* 6(11):1275-7.

Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2: 445-459.

Atwood DN, Beenken KE, Loughran AJ, Meeker DG, Lantz TL, Graham JW, Spencer HJ, Smeltzer MS. 2016. XerC contributes to diverse forms of *Staphylococcus aureus* infection via agr-dependent and agr-independent pathways. *Infect Immun.* 24; 84(4):1214-25.

Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. 2006. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 89:1877–1895.

Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo AN, Velázquez-del Valle MG, Hernández-López M, Ait Barka E, Bosquez-Molina E, Wilson CL. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection.* 25, 108–118.

Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Von Eiff C. 2003. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol.* 41(4):1434-9.

Becker P, Hufnagle W, Peters G, Herrmann M. 2001. Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference-analysis. *Appl Environ Microbiol.* 67: 2958-2965.

Beenken KE, Blevins JS, Smeltzer MS. 2003. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect Immun.* 71, 4206-421.

Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Blevin JS, Smeltzer MS. 2004. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol.* 186: 4665-4684.

Bendaoud M, Vinogradov E, Balashova NV, Kadouri DE, Kachlany SC, Kaplan JB. 2011. Broad-spectrum biofilm inhibition by *Kingella kingae* exopolysaccharide. *J Bacteriol.* 193: 3879–3886.

Bernal A, Proft T, Fraser JD, Posnett DN. 1999. Superantigens in human disease. *J Clin Immunol.* 19(3):149-57.

Bhatnagar A, Sillanpää M. 2009. Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater - A short review. *Adv Colloid Interface Sci.* 152, 26–38.

Bien J, Sokolova O, Bozko P. 2011. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *J Pathog.* 2001: 601905.

Boles BR, Horswill AR. 2008. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* 4(4):e1000052.

Boles BR, Horswill AR. 2011. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol.* 19: 449-455.

Bronner S, Monteil H, Prevost G. 2004. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev.* 28(2):183-200.

Brouillette E, Grondin G, Shkreta L, Lacasse P, Talbot B.G. 2003. *In vivo* and *in vitro* demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb Pathog.* 35(4): 159-68.

Brouillette E, Malouin F. 2005. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes Infect.* 7(3): 560-8.

Capuco AV, Mein GA, Nickerson SC, Jack LJ, Wood DL, Bright SA, Aschenbrenner RA, Miller RH, Bitman J. 1994. Influence of pulsationless milking on teat canal keratin and mastitis. *J Dairy Sci.* 77(1):64-74.

Carlson RP, Taffs R, Davison WM, Stewart PS. 2008. Antibiofilm properties of chitosan-coated surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed.* 19(8):1035–1046.

Chen YL, Chou CC. 2005. Factors affecting the susceptibility of *Staphylococcus aureus* CCRC 12657 to water soluble lactose chitosan derivative. *Food Microbiol.* 22, 29–35.

Cheng CY, Chang CH, Wu YJ, Li YK. 2006. Exploration of glycosyl hydrolase family 75, a chitosanase from *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem.* 281, 3137–3144.

Chung MJ, Park JK, Park YI. 2012. Anti-inflammatory effects of low-molecular weight chitosan oligosaccharides in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells and asthma model mice. *Int Immunopharmacol.* 12(2):453-9.

Chung YC, Chen CY. 2008. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresour Technol.* 99(8):2806-14.

Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JC, Lin JG. 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin.* 25(7):932-6.

Clarke SR, Harris LG, Richards RG, Foster SJ. 2002. Analysis of Ehb, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 70, 6680–6687.

Cobrado L, Azevedo MM, Silva-Dias A, Ramos JP, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. 2012. Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? *J Antimicrob Chemother.* 67(5): 1159–1162.

Communiqué de presse Bayer-UdeS. 30 Mai 2016.

<https://www.usherbrooke.ca/medias/communiqués/communiqués-détails/c/31848/>.

Corrigan RM, Rigby D, Hadley P, Foster TJ. 2007. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiol.* 153: 2435-2446.

Costa E, Silva S, Tavaría F, Pintado M. 2014. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of chitosan on the Oral Pathogen *Candida albicans*. *Pathogens.* 3(4):908-19.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284, 1318-1322.

Costerton JW. 1999. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents.* 11: 217-221.

Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lassa Í, Penadés JR. 2001. Bap, a *Staphylococcus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 183: 2888-2896.

Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. 2004. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 72(4):2177-85.

Davies D . 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* (2):114-22.

De Briyne N, Atkinson J, Pokludová L, Borriello SP. 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet Rec.* 175(13):325.

De Vliegher S, Fox LK, Piepers S, McDougall S, Barkema HW. 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci.* 95(3):1025-40.

Decker EM, von Ohle C, Weiger R, Wiech I, Brex M. 2005. A synergistic Chlorhexidine /chitosan combination for improved anti-plaque strategies. *J Periodontal Res.* 40(5):373-7.

Descôteaux L. 2004. https://www.agrireseau.net/bovinslaitiers/documents/Descoteaux_Luc.pdf.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 13(1):16-34.

Dodane V, Vilivalam V.D. 1998. Pharmaceutical applications of chitosan. Pharm Sci Tech Today. 1, 246–253.

Domard A, Cartier N. 1992. Glucosamine oligomers: 4. solid state-crystallization and sustained dissolution. Int J Biol Macromol. 14, 100–106.

Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Inf Dis. 8: 881-890.

Dosogne H, Vangroenweghe F, Burvenich C. 2002. Potential mechanism of action of J5 vaccine in protection against severe bovine coliform mastitis. Vet Res. 33(1):1-12.

Doyle RJ. 2000. Contribution of hydrophobic effect on microbial infection. Microbes Infect. 2: 391-400.

Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, Brown EL, Zagursky RJ, Shlaes D, Projan SJ. 2001. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. J bacteriol. 183(24):7341-53.

Dunne WM Jr. 2002. Bacterial adhesion: see any good biofilms lately? Clin Microbiol Rev. 15(2):155-66.

EASME: Executive agency for SMEs: Development of non-antibiotic therapy for the treatment of bovine mastitis. <https://ec.europa.eu/easme/en/sme/6867/development-non-antibiotic-therapy-treatment-bovine-mastitis>.

Eijsink VG, Vaaje-Kolstad G, Vårum KM, Horn SJ. 2008. Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. Trends Biotechnol. 26, 228–235.

Fernandes JC, Spindola H, de Sousa V, Santos-Silva A, Pintado ME, Malcata FX, Carvalho JE. 2010. Anti-inflammatory activity of chitooligosaccharides *in vivo*. *Mar Drugs*. 8, 1763–1768.

Forsbäck L, Lindmark-Månsson H, Andrén A, Åkerstedt M, Svennersten-Sjaunja K. 2009. Udder quarter milk composition at different levels of somatic cell count in cow composite milk. *Animal*. 3:710–717.

Foster TJ, Hook M. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiol.* 6, 484-488.

Foster TJ. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol.* 3(12):948-58.

Fukamizo T, Brzezinski R. 1997. Chitosanase from *Streptomyces sp.* strain N174: a comparative review of its structure and function. *Biochem Cell Biol.* 75, 687–696.

Fukamizo T, Honda Y, Goto S, Boucher I, Brzezinski R. 1995. Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces sp.* N174. *Biochem J.* 311 (Pt 2), 377–383.

Fukamizo T, Ohkawa T, Ikeda Y, Goto S. 1994. Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*. *Biochim Biophys Acta.* 1205(2):183-8.

Gardner KH, Blackwell J. 1975. Refinement of structure of beta-chitin. *Biopolymers.* 14, 1581–1595.

Garret TR, Bhakoo M, Zhang Z. 2008. Bacteria adhesion and biofilm on surfaces. *Prog Nat Sc.* 18: 1049-1056.

Geary U, Lopez-Villalobos N, Begley N, McCoy F, O'Brien B, O'Grady L, Shalloo L. 2012. Estimating the effect of mastitis on the profitability of Irish dairy farms. *J Dairy Sci.* 95(7):3662-73.

Gillespie BE, Moorehead H, Lunn P, Dowlen HH, Johnson DL, Lamar KC, Lewis MJ, Ivey SJ, Hallberg JW, Chester ST, Oliver SP. 2002. Efficacy of extended pirlimycin hydrochloride therapy for treatment of environmental *Streptococcus spp* and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in lactating dairy cows. *Vet Ther.* 3(4):373-80.

Gomes F, Henriques M. 2016. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic approaches. *Curr Microbiol.* 72(4):377-82.

Gooday GW. 1990. The ecology of chitin degradation. *Adv Microb Ecol.* 11, 387–430.

Gordon RJ, Lowy FD. 2008. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Inf Dis.* 46: S350-S359.

Gravet A, Colin DA, Keller D, Girardot R, Monteil H, Prévost G. 1998. Characterization of a novel structural member, Luke-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett.* 436(2):202-8.

Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ. 1995. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol microbiol.* 17(6):1143-52.

Gross M, Cramton SE, Götz F, Peschel A. 2001. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun.* 69: 3423-3426.

Hadwiger LA, Beckman JM, Adams MJ. 1981. Localization of fungal components in the pea–Fusarium interaction detected immunochemically with anti-chitosan and anti-fungal cell wall antisera. *Plant Physiol.* 67 (1)170– 175.

Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q.* 29(1):18-31.

Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Høiby N, Moser C, Costerton JW, Motter A, Bjarnsholt T. 2012. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 65(2):127-45.

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

Hamadi F, Latrache H, Mliji E, Mallouki B, Mabrouki M, Ellouali M. 2009. Adhésion de *Staphylococcus aureus* au verre et au téflon. *Rev Microbiol Ind San Environn.* 3: 1-16.

Harish Prashanth KV, Tharanathan RN. 2005. Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1722, 22–29.

Harraghy N, Hussain M, Haggar A, Chavakis T, Sinha B, Herrmann M, Flock JI. 2003. The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiol (Reading, England)*. 149, 2701-2707.

Heggset EB, Hoell IA, Kristoffersen M, Eijsink VG, Vårum KM. 2009. Degradation of chitosans with chitinase G from *Streptomyces coelicolor* A3(2): production of chitooligosaccharides and insight into subsite specificities. *Biomacromol*. 10, 892–899.

Heggset EB, Dybvik AI, Hoell IA, Norberg AL, Sørli M, Eijsink VG, Vårum KM. 2010. Degradation of chitosans with a family 46 chitosanase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biomacromol*. 11(9):2487-97.

Heilmann C, Götz F. 2010. Cell-cell communication and biofilm formation in Gram positive bacteria. *Bacterial signaling*. 7-22.

Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F. 1996. Molecular basis of intracellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol*. 20(5): 1083-91.

Henry-Stanley MJ, Shepherd MM, Wells CL, Hess DJ. 2011. Role of *Staphylococcus aureus* protein A in adherence to silastic catheters. *J Surg Res*. 167: 9-13.

Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 35: 322–332.

Horn SJ, Sørbotten A, Synstad B, Sikorski P, Sørli M, Vårum KM, Eijsink VG. 2006. Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS J*. 273, 491–503.

Huigens RW, Ma L, Gambino C, Moeller PD, Basso A, Cavanagh J, Wozniak DJ, Melander C. 2008. Control of bacterial biofilms with marine alkaloid derivatives. *Mol Biosyst*. 4:614-21.

Huigens RW, Richards JJ, Parise G, Ballard TE, Zeng W, Deora R, Melander C. 2007. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation with bromoageliferin analogues. *J Am Chem Soc.* 129:6966-7.

Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Earhart CA. 2007. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 189(23):8719-26.

Huseby MJ, Kruse AC, Digre J, Kohler PL, Vocke JA, Mann EE, Bayles KW, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Earhart CA. 2010. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(32):14407-12.

Hussain M, Becker K, von Eiff C, Schrenzel J, Peters G, Herrmann M. 2001. Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J bacteriol.* 183, 6778-6786.

Jefferson KK, Pier DB, Goldmann DA, Pier GB. 2004. The teicoplanin-associated locus regulator (*TcaR*) and the intercellular adhesin locus regulator (*IcaR*) are transcriptional inhibitors of *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. *J bacteriol.* 186, 2449-2456.

Jiang P, Li J, Han F, Duan G, Lu X, Gu Y, Yu W. 2011. Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLoS ONE.* 6: e18514.

Jones SM, Morgan M, Humphrey TJ, Lappin-Scott H. 2001. Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet.* 357(9249):40-1.

Kaplan JB. 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res.* 89: 205–218.

Karatan E, Watnick P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73: 310–347.

Katsikogianni M, Missirlis YF. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacterial-material interactions. *Eur Cell Mater.* 8: 37-37.

Kendra DF, Hadwiger LA. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicit pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp Mycol.* 8, 276–281.

Kim Y, Oh S, Kim SH. 2009. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduces biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem Biophys Res Commun.* 379: 324–329.

Klein RC, Fabres-Klein MH, de Oliveira LL, Feio RN, Malouin F, Ribon Ade O. 2015. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts Staphylococcal biofilms. *PLoS One.* 10 (3): e 0120514.

Knowles J, Roller S. 2001. Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. *J Food Prot.* 64(10):1542–1548.

Kong M, Chen XG, Liu CS, Liu CG, Meng XH, Yu le J. 2008. Antimicrobial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 65(2):197-202.

Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol.* 144(1):51-63.

Kumar MN , Muzzarelli RA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev.* 104(12):6017-84.

Lacombe-Harvey ME, Fukamizo T, Gagnon J, Ghinet MG, Denhart N, Letzel T, Brzezinski R. 2009. Accessory active site residues of *Streptomyces sp* N174 chitosanase. *FEBS J.* 276, 857–869.

Lamppa JW, Griswold KE. 2013. Alginate lyase exhibits catalysis-independent biofilm dispersion and antibiotic synergy. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(1):137-45.

Landin H, Mörk MJ, Larsson M, Waller KP. 2015. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds. *Acta Vet Scand.* 57:81.

Le KY, Otto M. 2015. Quorum-sensing regulation in staphylococci. An overview. *Front Microbiol.* 6:1174.

Le Magrex E, Brisset L, Jacquelin LF, Carquin J, Bonnaveiro N, Choisy C. 1994. Susceptibility to antibacterials and compared metabolism of suspended bacteria versus embedded bacteria in biofilms. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2: 89-95.

Li M, Diep BA, Villaruz AE, Braughton KR, Jiang X, DeLeo FR, Chambers HF, Lu Y, Otto M. 2009. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106: pp. 5883-5888.

Lim Y, Jana M, Luong TT, Lee CY. 2004. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J bacteriol.* 186(3): 722-729.

Lin YC, Peterson ML. 2010. New insights into the prevention of staphylococcal infections and toxic shock syndrome. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 3(6):753-767.

Ma Y, Ryan C, Barbano DM, Galton DM, Rudan MA, Boor KJ. 2000. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci.* 83(2):264-74.

Mahami T, Adu-Gyamfi A. 2011. Biofilm-associated infections: public health implications. *Int Res J Microbiol.* 2: 375-381.

Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L, Tsang LH, Smeltzer MS, Horswill AR, Bayles KW. 2009. Modulation of eDNA and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One.* 4(6):e5822.

Martí M, Trotonda MP, Tromo-Más MA, Vergara- Irigaray M, Cheung AL, Lassa I, Penadés JR. 2009. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microb Infect.* 12: 55-64.

McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Rev Microbiol.* 10: 39-50.

McDougall S, Arthur DG, Bryan MA, Vermunt JJ, Weir AM. 2007. Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. *N Z Vet J.* 55:161–170.

McEwen SA, Black WD, Meek AH. 1991. Antibiotic residue prevention methods farm management, and occurrence of antibiotic residues in milk. *J Dairy Sci.* 74(7):2128-37.

McLandsborough L, Rodriguez A, Pérez-Conesa D, Weiss J. 2006. Biofilms: At the interface between biophysics and microbiology. *FOBI* 1: 94-114.

Mehlin C, Headley CM, Klebanoff SJ. 1999. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *J Exp Med.* 189(6):907-18.

Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. 2007. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilm. *Vet Microbiol.* 125, 141-149.

Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. 2006. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *Vet J.* 171, 398-407.

Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, Lopez JA, Foster TJ, Penadés JR, Lasa Í. 2009. Protein A-mediated multicellular behaviour in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 191: 832-843.

Minke R, Blackwell J. 1978. The structure of alpha-chitin. *J Mol Biol.* 120, 167–181.

Mitchell G, Brouillette E, Séguin DL, Asselin AE, Jacob CL, Malouin F. 2010. A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides. *Microb Pathog.* 48(1):18-27.

Mitsutomi M, Ueda M, Arai M, Ando A, Watanabe T. 1996. In *Chitin Enzymology*; Muzzarelli, R.A.A., Ed.; Atec Edizioni: Grottammare, Italy, pp. 273–284.

Morris VB, Neethu S, Abraham TE, Pillai CKS, Sharma CP. 2009. Studies on the Condensation of Depolymerized Chitosans with DNA for Preparing Chitosan-DNA Nanoparticles for Gene Delivery Applications. *J Biomed Mater Res. Part B*, 89B, 282–292.

Mourabit A, Potier P. 2001. Sponge's Molecular Diversity through the Ambivalent Reactivity of 2-Aminoimidazole: A Universal Chemical Pathway to the Oroidin-Based Pyrrole-Imidazole Alkaloids and Their Palau'amine Congeners. *Eur J Org Chem.* (2): 237 – 243.

Mu H, Guo F, Niu H, Liu Q, Wang S, Duan J. 2014. Chitosan improves anti-biofilm efficacy of gentamicin through facilitating antibiotic penetration. *Int J Mol Sci.* 15(12):22296-308.

Novick RP, Geisinger E. 2008. Quorum sensing in staphylococci. *Ann Rev Gen.*42: 541-564.

Novick RP. 2003. Auto-induction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol.* 48(6):1429-49.

O'Neil E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, O'Gara JP. 2007. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device –related infections. *J Clin Microbiol.* 45: 13791388.

O'Neil O, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A, Foster TJ, O'Gara JP. 2008. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol.* 190: 3835-3850.

Olde Riekerink RG, Barkema HW, Kelton DF, Scholl DT. 2008. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* 91, 1366-1377.

O'Reilly M, Kreiswirth B, Foster TJ. 1990. Cryptic alpha-toxin gene in toxic shock syndrome and septicaemia strains of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 4(11):1947-55.

Orgaz B, Lobete MM, Puga CH, San Jose C. 2011. Effectiveness of chitosan against mature biofilms formed by food related bacteria. *Int J Mol Sci.* 12(1):817-28.

O'Riordan K, Lee JC. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev.*17(1):218-34.

Otto M. 2008. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322: 207-228.

Otto M. 2013. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.* 64:175-88.

Otto M. 2014. Phenol-soluble modulins. *Int J Med Microbiol.* 4(2):164-9.

Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect.* 54(4):399-409.

Palma-Guerrero J, Huang IC, Jansson HB, Salinas J, Lopez-Llorca LV, Read ND. 2009. Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. *Fungal Genet Biol.* 46, 585–594.

Palma-Guerrero J, Lopez-Jimenez JA, Pérez-Berná AJ, Huang IC, Jansson HB, Salinas J, Villalán J, Read ND, Lopez-Llorca LV. 2010. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Mol Microbiol.* 75(4):1021-32.

Park Y, Kim MH, Park SC, Cheong H, Jang MK, Nah JW, Hahm KS. 2008. Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan. *J Microbiol Biotechnol.* 18, 1729–1734.

Pasquantonio G, Greco C, Prenna M, Ripa C, Vitali LA, Petrelli D, Di Luca MC, Ripa S. 2008. Antibacterial activity and antibiofilm effect of chitosan against strains of *Streptococcus mutans* isolated in dental plaque. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 21(4):993–997.

Patti JM, Höök M. 1994. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr Opin Cell Biol.* (5):752-8.

Persson Waller K, Bengtsson B, Lindberg A, Nyman A, Ericsson Unnerstad E. 2009. Incidence of mastitis and bacterial findings at clinical mastitis in Swedish primiparous cows—Influence of breed and stage of lactation. *Vet Microbiol.* 134:89–94.

Peters MD, Silveira ID, Fischer V. 2015. Impact of subclinical and clinical mastitis on sensitivity to pain of dairy cows. *Animal.* 9(12):2024-8.

Peterson PK, Verhoef J, Sabath LD, Quie PG. 1977. Effect of protein A on staphylococcal opsonization. *Infect Immun.* 15(3):760-4.

Pierre Lévesque « classification des mammites » le producteur du lait québécois. Juillet/août 2006. http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF_FR/ABC/Classification.pdf.

Qiao Y, Bai XF, Du YG. 2011. Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress. *Int Immunopharmacol.* 11, 121–127.

Qin Z, Yang L, Qu D, Molin S, Tolker-Nielsen T. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit staphylococcal growth, and disrupt established biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol.* 155: 2148–2156.

Quintero-Villegas MI, Aam BB, Rupnow J, Sørli M, Eijsink VG, Hutkins RW. 2013. Adherence inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by chitoooligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization. *J Agric Food Chem.* 61(11):2748-54.

Raafat D, Sahl HG. 2009. Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literature survey. *Microb Biotechnol.* 2(2):186-201.

Raafat D, von Barga K, Haas A, Sahl HG. 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl Environ Microbiol.* 74(12):3764-73.

Réseau Canadien de Recherche sur la Mammite Bovine et la Qualité du Lait (RCRMBQL). Consulté le 25-08-2016 (<http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/fr/page.php?p=24&tm=g>).

Reyher KK, Dufour S, Barkema WH, Des Côteaux L, DeVries JT, Dohoo RI, Keefe PG, Roy J-P, Scholl DT. 2011. The National Cohort of Dairy Farms--A data collection platform for mastitis research in Canada. *J Dairy Sci.* 94, 1616-1626.

Rhoades J, Gibson G, Formentin K, Beer M, Rastall R. 2006. Inhibition of the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* strains to HT-29 cells in culture by chito-oligosaccharides. *Carbohydr Polym.* 64, 57–59.

Rogers SA, Huigens RW, Cavanagh J, Melander C. 2010. Synergistic effects between conventional antibiotics and 2-aminoimidazole-derived antibiofilm agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(5):2112-8.

Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, Scherpe S, Davies AP, Harris LG, Horstkotte MA, Knobloch JK, Rangunath C, Kaplan JB, Mack D. 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*. (9):1711-20.

Saber A, Strand SP, Ulfendahl M. 2010. Use of the biodegradable polymer chitosan as a vehicle for applying drugs to the inner ear. *Eur J Pharm Sci*. 39(1-3):110-5.

Saini V, McClure JT, Léger D, Dufour S, Sheldon AG, Scholl DT, Barkema HW. 2012. Antimicrobial use on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci*. 95(3):1209-21.

Saito J, Kita A, Higuchi Y, Nagata Y, Ando A, Miki K. 1999. Crystal structure of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1 at 1.6-angstrom resolution and its substrate recognition mechanism. *J Biol Chem*. 274, 30818–30825.

Sandford PA. 2002. Commercial sources of chitin & chitosan and their utilization. In *Advances in Chitin Science* (Vårum KM, Domard A, Smidsrød O, Eds). Ntnu. Trondheim, Norway. Volume VI.

Sannan T, Kurita K, Iwakura Y. 1976. Studies on Chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility. *Macromol Chem*. 177, 3589–3600.

Sayem SA, Manzo E, Ciavatta L, Tramice A, Cordone A, Zanfardino A, De Felice M, Varcamonti M. 2011. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb Cell Fact*. 10: 74.

Schlievert PM, Case LC, Strandberg KL, Tripp TJ, Lin YC, Peterson ML. 2007. Vaginal *Staphylococcus aureus* superantigen profile shift from 1980 and 1981 to 2003, 2004, and 2005. *J Clin Microbiol*. 45(8):2704-7.

Schroeder K, Jularic M, Horshburg SM, Hirschhausen N, Neumann C, Berteling A, Schulte A, Foster S, Kehrel BE, Peters G, Heilmann C. 2009. Molecular characterization on a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. *PLoS One*. 4: e7567-e7581.

Schukken YH, Bronzo V, Locatelli C, Pollera C, Rota N, Casula A, Testa F, Scaccabarozzi L, March R, Zalduendo D, Guix R, Moroni P. 2014. Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *J Dairy Sci.* 97(8):5250-64.

Sharon N, Ofek I. 2000. Safe as mother's milk: Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. *Glycoconjugate J.* 17, 659–664.

Shenkman B, Rubinstein E, Cheung AL, Brill GE, Dardik R, Tamarin I, Savion N, Varon D. 2001. Adherence properties of *Staphylococcus aureus* under static and flow conditions: roles of *agr* and *sar* loci, platelets, and plasma ligands. *Infect Immun.* 69, 4473-4478.

Shkreta L, Talbot BG, Diarra MS, Lacasse P. 2004. Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. *Vaccine.* 23 (1):114-26.

Silva-Dias A, Palmeira-de-Oliveira A, Miranda IM, Branco J, Cobrado L, Monteiro-Soares M, Queiroz JA, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. 2014. Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida* species. *Med Microbiol Immunol.* 203:25–33.

Song Y, Liu CI, Lin FY, No JH, Hensler M, Liu YL, Jeng WY, Low J, Liu GY, Nizet V, Wang AH, Oldfield E. 2009. Inhibition of staphyloxanthin virulence factor biosynthesis in *Staphylococcus aureus*: *in vitro*, *in vivo*, and crystallographic results. *J Med Chem.* 52(13):3869-80.

Sørbotten A, Horn SJ, Eijsink VG, Vårum KM. 2005. Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens*. Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. *FEBS J.* 272, 538–549.

Speranza G, Gottardi G, Pederzulli C, Lunelli L, Canteri R, Pasquardini L, Carli E, Lui A, Maniglio D, Brugnara M, Anderle M. 2004. Role of chemical interaction in bacteria adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials.* 25: 2029-2037.

Stewart PS, Costerton JW. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 358: 135-138.

Sutherland IW. 2001. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9: 222-227.

Sutra L, Poutrel B. 1994. Virulence actors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol. 40 (2):79-89.

Takahashia T, Imaia M, Suzukia I, Sawaib J. 2008. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. Biochem Eng J. 40, 485–491.

Tenke P, Köves B, Nagy K, Hultgren SJ, Mendling W, Wullt B, Grabe M, Wangenlehner FM, Ceke M, Pickard R, Botton H, Naber KG, Bjerklund Johansen TE. 2012. Update on biofilms infections in urinary tract. World J Urol. 30(1): 51-57.

Thompson-Crispi K, Atalla H, Miglior F, Mallard BA. 2015. Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. Front Immunol. 5:493.

Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, Engebretsen IL, Bayles KW, Horswill AR, Kielian T. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. J Immunol. 186: 6585-6596.

Tikhonov VE, Stepnova EA, Babak VG, Yamskov IA, Palma-Guerrero J, Jansson HB, Lopez-Llorca LV, Salinas J, Gerasimenko DV, Avdienko ID, Varlamov VP. 2006. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2(3)-(dodec2-enyl)succinoyl/-derivatives. Carbohydr Polym. 64, 66–72.

Tin S, Sakharkar KR, Lim CS, Sakharkar MK. 2009. Activity of Chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Biol Sci. 5(2):153-60.

Toledo-Arana A, Merino N, Vergara-Irigaray M, Debarbouille M, Penades JR, Lasa I. 2005. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, ica-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. J bacteriol. 187, 5318-5329.

Trombotto S, Ladavière C, Delolme F, Domard A. 2008. Chemical preparation and structural characterization of a homogeneous series of chitin/chitosan oligomers. Biomacromol. 9, 1731–1738.

Tsai GJ, Su WH. 1999. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. J Food Prot. 62(3):239-43.

Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo JM, Amorena B, Penades JR, Lasa I. 2003. *SarA* and not sigma B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. Mol microbiol. 48, 1075-1087.

Van Oostveldt K, Vangroenweghe F, Dosogne H, Burvenich C. 2001. Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows. Vet Res. 32(6):617-22.

Vaudaux PE, Francois P, Proctor RA, McDevitt D, Foster TJ, Albrecht RM, Lew DP, Wabers H, Cooper SL. 1995. Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arterio-venous shunts. Infect Immun. 63, 585-590.

Vergara-Irigaray M, Valle J, Merino N, Latasa C, García B, de los Mozos IR, Solano C, Toledo-Arana A, Penadés JR, Lasa I. 2009. Relevant role of fibronectin-binding protein in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. Infect Immun. 77: 3978-3991.

Von Eiff C, Jansen B, Kohlen W, Becker K. 2005. Infections associated with medical devices. Pathogenesis, management and prophylaxis. Drugs. 65: 179-214.

Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischert ER, DeLeo FR, Otto M. 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. J Biol Chem. 279: 54881-54886.

Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, Wells KD, Talbot N, Hawk HW. 2005. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. Nat Biotechnol. 23(4):445-51.

Wang X, Du Y, Liu H. 2004. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. Carbohydr polym. 56:21-26.

Wang Z, Zheng L, Yang S, Niu R, Chu E, Lin X. 2007. N-acetylchitoooligosaccharide is a potent angiogenic inhibitor both *in vivo* and *in vitro*. Biochem Biophys Res Commun. 357, 26-31.

Xiao Z, Xu P. 2007. Acetoin metabolism in bacteria. Crit Rev Microbiol. 33(2):127-40.

Xiong C, Wu H, Wei P, Pan M, Tuo Y, Kusakabe I, Du Y. 2009. Potent angiogenic inhibition effects of deacetylated chitohexaose separated from chitooligosaccharides and its mechanism of action *in vitro*. *Carbohydr Res.* 344(15):1975-83.

Xu QS, Dou HL, Wei P, Tan CY, Yun XJ, Wu YH, Bal XF, Ma XJ, Du YG. 2008. Chitooligosaccharides induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via upregulation of Bax. *Carbohydr Polym.* 71: 509–514.

Yadav MK, Chae SW, Im GJ, Chung JW, Song JJ. 2015. Eugenol: a phyto-compound effective against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical strain biofilms. *PLoS One.* 10(3):e0119564.

Yang TC, Li CF, Chou CC. 2007. Cell age, suspending medium and metal ion influence the susceptibility of *Escherichia coli* O157:H7 to water-soluble maltose chitosan derivative. *Int J Food Microbiol.* 113(3):258-62.

Yarwood JM, Schlievert PM. 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest.* 112: 1620-1625.

Yoon HJ, Moon ME, Park HS, Im SY, Kim YH. 2007. Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 358(3):954–959.

Zhong Z, Xing R, Liu S, Wang L, Cai S, Li P. 2008. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities *in vitro*. *Carbohydr Res.* 343(3):566-70.

Zopf D, Roth S. 1996. Oligosaccharide anti-infective agents. *The Lancet.* 347, 1017–1021.

