



HAL
open science

Identification de facteurs de *Staphylococcus aureus* impliqués dans la sévérité et la chronicité des mammites.

Vincent Péton

► To cite this version:

Vincent Péton. Identification de facteurs de *Staphylococcus aureus* impliqués dans la sévérité et la chronicité des mammites.. Ingénierie des aliments. AGROCAMPUS OUEST, 2014. Français. ⟨NNT : ⟩. ⟨tel-02801843⟩

HAL Id: tel-02801843

<https://hal.inrae.fr/tel-02801843v1>

Submitted on 5 Jun 2020

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

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



HAL Authorization



N° d'ordre : 2014-30

N° de série : B-258

THESE/AGROCAMPUS OUEST

Sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

Pour obtenir le diplôme de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES, AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE

Spécialité : Biochimie, Biologie moléculaire et cellulaire

Ecole Doctorale : VAS

Présentée par :

Vincent PETON

Identification de facteurs de *Staphylococcus aureus* impliqués dans la sévérité et la chronicité des mammites.

Thèse préparée à l'UMR Sciences et Technologies du Lait et l'œuf, INRA-Agrocampus Ouest
65 rue de St Brieuc, 35042 RENNES

soutenue le 11 décembre 2014 devant le jury composé de :

Pascal RAINARD, Directeur de Recherche, INRA, Nouzilly	Rapporteur
Gérard LINA, Professeur, Université de Lyon I, Lyon	Rapporteur
Brice FELDEN, Professeur, Université de Rennes I, Rennes	Examineur
Evelyne MEYER, Professeure, Université de Gand, Gand	Examinatrice
Florence VAL, Professeure, Agrocampus Ouest, Rennes	Représentante de l'ED VAS
Yves LE LOIR, Directeur de Recherche, INRA, Rennes	Directeur de thèse
Sergine EVEN, Chargée de Recherche, INRA, Rennes	Co-Directrice de thèse



Remerciements

Je remercie Joëlle Léonil, directrice de l'UMR STLO pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, avec un souci tout particulier pour la formation des doctorants.

Je remercie bien évidemment Yves Le Loir et Sergine Even, mes encadrants, pour leurs encouragements et leur façon de penser positive et pragmatique, le temps passé pour des relectures et corrections diverses, les blagues parfois douteuses ou les potins du labo. Merci de m'avoir donné l'occasion de voyager et de rencontrer d'autres scientifiques d'autres domaines, de m'avoir permis de présenter mes résultats dans d'autres sphères. En tant qu'encadrants, je trouve que vous formez un duo de choc !

Mes remerciements s'adressent aussi à Gérard Lina, Pascal Rainard, Brice Felden, Evelyne Meyer et Florence Val, les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse, avec un regard critique et bienveillant.

Un grand merci à tous mes collègues du STLO, avec une mention spéciale à Paulette Amet et Jessica Musset pour leur aide au quotidien, pour l'organisation du labo et toutes ces petites choses qui vous facilitent le travail. Le café de 4h a été pour moi un allié précieux dans la rédaction de cette thèse. Merci à Lucie Rault pour ses coups de main occasionnels, sa bonne humeur et son rire communicatif qui ont égayé le bureau. Merci à toute l'équipe BISE, pour leur soutien régulier tant au niveau administratif qu'au niveau informatique et pour me laisser parfois bricoler avec les outils de l'atelier. Merci à Gwénaél Jan pour m'avoir mis le pied à l'étrier lorsque j'étais jeune padawan et m'avoir fait entrer dans cette académie Jedi (même si j'ai fini par passer du côté obscur). Merci à Valérie Briard-Bion et Julien Jardin pour leur aide pour les analyses de protéomique et le retraitement des données de spectrométrie de masse. Merci à Rachel Boutrou pour son aide, lors d'atelier ou ailleurs, et pour apporter un regard neuf sur des choses qui commençaient à tourner en rond.

Merci aux amateurs de course à pieds, aux joueurs de babyfoot, toutes disciplines confondues (y compris le programme « danse autour du baby ») et aux joueurs de badminton pour les bons moments de détente entre deux sessions de rédaction.

Merci à mes collègues mais néanmoins amis, que j'ai pu croiser et apprendre à connaître au cours de ces années. A Clémentine et Coralie pour les débats chats-chiens, Katy Perry et la voiture à paillettes, mais également à Lélia, Rozenn et Xav pour toutes les super-discussions et les moments partagés ensemble. A Damien avec qui j'ai eu plaisir de partager une paillasse, un PSM ou un bureau. A tous les autres doctorants ou stagiaires, trop nombreux pour que je puisse tous les

nommer, avec qui j'ai eu la joie de partager cette expérience, ou tout simplement des bières au Knock !

Merci aux copains de BCGMP, Erwan, Camille, Loulou, Manue, Yoannah et à l'ovni Naoki, mon parasite préféré.

Merci à mes parents qui m'ont toujours incité à faire ce que j'aime, parfois poussé (avec parfois des discussions à propos d'autruches) et qui ne m'ont jamais lâché.

Merci à ma « petite » sœur, qui me supporte depuis toujours.

Sommaire

Table des Illustrations : Figures	5
Table des Illustrations : Tableaux	6
Abbréviations	7
Préambule	9
<u>CHAPITRE I : Introduction bibliographique</u>	11
I. Généralités	12
1. Quelques chiffres... ..	12
2. Et quelques données anatomiques... ..	14
II. Mammites staphylococciques	17
1. Généralités	17
2. Sources de contamination	19
3. Processus infectieux.....	19
A. Adhésion aux cellules épithéliales mammaires	20
B. Internalisation dans les cellules épithéliales	21
C. Dissémination dans les tissus adjacents et persistance	22
4. Virulence.....	22
A. Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i>	22
B. Systèmes de régulation de la virulence	27
5. La réponse immunitaire de l'hôte dans la mamelle	34
6. Degré de virulence et chronicité	36
A. Toutes les souches de <i>S. aureus</i> n'ont pas le même degré de virulence.....	36
B. Certaines souches de <i>S. aureus</i> font des infections chroniques	37
7. Méthodes de contrôle et prophylaxie	38
III. Staphylococcus aureus en médecine vétérinaire	44
1. Infections à <i>S. aureus</i> chez les animaux (hors mammites)	44
2. L'adaptation de <i>S. aureus</i> à l'hôte	47
A. Biotypes et génotypes hôtes-spécifiques.....	47
B. Bases moléculaires de la spécificité d'hôte.....	49
C. L'adaptation aux ruminants	50
IV. Question et stratégie de recherche	55

A. Chronicité de l'infection.	55
B. Degré de virulence.	56
<u>CHAPITRE II : Identification de facteurs staphylococciques impliqués dans la chronicité des mammites</u>	57
<u>CHAPITRE III : Caractérisation d'un gène régulateur : Lien avec la sévérité des mammites</u>	91
<u>CHAPITRE IV : Conclusions et Perspectives</u>	115
<u>ANNEXE 1 : Valorisation des travaux de Thèse</u>	125
<u>ANNEXE 2 : Article de revue</u>	129
<u>Références bibliographiques</u>	145

Table des Illustrations : Figures

Figure 1 : Répartition des élevages laitiers (à gauche) et de la production laitière (à droite) en France métropolitaine en 2012.

Figure 2 : Nombre de vaches laitières et leur rendement.

Figure 3 : La structure de soutien de la mamelle.

Figure 4 : Anatomie de la glande mammaire. Gauche: Coupe chématique de la glande mammaire, Droite : Coupe schématique d'un trayon de vache.

Figure 5 : Schéma du système vasculaire de la mamelle.

Figure 6 : Cycle infectieux présumé de *S. aureus* dans la glande mammaire.

Figure 7 : Représentation du système *agr* .

Figure 8 : Représentation des domaines de différents groupes de facteurs σ^{70} . A : Groupe 1, B : Groupe 3, C : Groupe 4 (ou ECF).

Figure 9 : Caractéristiques structurales des facteurs σ^{70} . (a) Les régions conservées des facteurs σ et leurs fonctions. Les quatre régions conservées ainsi que la région non conservée (NCR) sont indiquées avec les différents domaines σ . Le schéma d'un promoteur typique permet de montrer quelles sont les régions du facteur σ qui permettent la reconnaissance (indiquées par des flèches). (b) Un modèle d'interaction de l'ARN polymérase holoenzyme (avec les sous-unités $\alpha 2\beta\beta'$ ω en gris clair et σ en gris foncé) avec la séquence ADN d'un promoteur. La flèche indique le sens de transcription

Figure 10 : Typologie des mammites ovines.

Table des Illustrations : Tableaux

Tableau 1 : Productions de laits au niveau mondial.

Tableau 2 : Caractéristiques des différents types de mammites.

Tableau 3 : Exemples de vaccins commerciaux contre les mammites staphylococciques.

Tableau 4 : Infections les plus communes causées par des staphylocoques à coagulase chez les animaux.

Tableau 5 : Tests phénotypiques permettant la discrimination des différents biotypes de *S. aureus*.

Tableau 6 : Exemples de caractères spécifiques d'un hôte et leurs déterminants génétiques chez *S. aureus*

Abbréviations

2D-PAGE	2 dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BHI	Brain heart infusion
CCS	Comptage des cellules somatiques
CDS	Coding sequence
CEMb	Cellule épithéliale mammaire bovine
CFU	Colony-forming unit
CNIEL	Centre national interprofessionnel de l'économie laitière
CNS	Coagulase negative staphylococci
MLST	Multi locus sequence typing
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
MSCRAMMs	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
NanoLC MS/MS	Nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry
PBS	Phosphate buffered saline
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PMN	Polymorphonuclear neutrophil
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCC	Somatic cell count
SCN	Staphylocoque à coagulase négative
SCP	Staphylocoque à Coagulase Positive
SCV	Small colony variant
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SERPA	Serological proteome analysis
SNP	Single nucleotide polymorphism
TCS	Two component system
TFA	Trifluoroacetic acid
UFC	Unité formant colonie

Préambule

Cette thèse a été cofinancée par l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) et la Région Bretagne. Elle s'est déroulée de 2011 à 2014, au sein de l'UMR Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (STLO), INRA/Agrocampus Ouest. Le laboratoire s'intéresse aux composants du lait et de l'œuf, deux aliments qui possèdent des potentiels d'innovation et de transformation très intéressants pour l'industrie agroalimentaire. Les travaux menés au laboratoire visent à maîtriser la transformation de ces constituants en améliorant notre compréhension de leurs structures, leurs fonctionnalités et leur digestibilité.

Au sein du laboratoire, la microbiologie représente une part importante de l'effectif et repose sur quatre équipes qui travaillent sur l'amélioration de la qualité et de la sécurité des produits laitiers fermentés et des ovo-produits. Le laboratoire héberge également un centre international de ressources microbiennes dédié aux bactéries d'intérêt alimentaire.

Ces travaux ont été réalisés au sein de l'équipe « Biodiversité Bactérienne et Interactions *In Situ* » (B2ISI). Les thématiques de l'équipe visent à comprendre et à contrôler les interactions entre deux espèces de bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Propionibacterium freudenreichii*) et leur environnement. Elles visent notamment à comprendre les interactions que ces bactéries peuvent entretenir avec leur hôte au niveau cellulaire, en termes d'effet probiotique pour *P. freudenreichii* ou en termes de virulence pour *S. aureus*. C'est sur ce dernier thème qu'a porté mon travail de thèse.

Ce projet de thèse a également été intégré dans des projets de collaborations internationales avec :

- Le département de Pharmacologie, Toxicologie et Biochimie de la faculté de Médecine Vétérinaire de Gand (Belgique) pour les études sur le modèle murin de mammites (séjour en juin 2013).
- L'Université Fédérale du Minas Gerais (Belo Horizonte, Brésil), pour les analyses bioinformatiques sur les génomes des souches bovines.
- Le laboratoire de Recherche génomique des Hôpitaux Universitaires de Genève (Suisse), pour le séquençage et l'annotation de la souche Newbould 305.

Chapitre I

Introduction bibliographique

I. Généralités

1. Quelques chiffres...

En 2013, la production mondiale de lait a atteint 769 millions de tonnes toutes espèces confondues (CNIEL, 2014). Elle a légèrement progressé aux Etats-Unis et en Europe et les cours des produits laitiers se sont maintenus à des niveaux élevés, en raison de la demande mondiale soutenue, notamment asiatique. Les principales productions sont les laits de vaches, de bufflonnes, de chèvres et de brebis (Tableau 1).

Tableau 1 : Productions de laits au niveau mondial (CNIEL, 2014)

Millions de tonnes	2008	2009	2010	2011	2012
Lait de vache	591,2	596,4	608,0	624,2	637,3
Lait de bufflonne	87,1	89,8	93,3	97,4	100,7
Lait de chèvre	16,7	17,0	17,8	18,2	18,3
Lait de brebis	8,9	9,5	10,0	9,9	10,2
Autres	2,9	2,8	2,9	3,0	3,0
TOTAL	706,8	715,6	731,9	752,6	769,5

La France est le 8^{ème} producteur de lait au niveau mondial et le deuxième au niveau européen (après l'Allemagne). En 2012, la collecte laitière française approche les 24 milliards de litres de lait de vache, 214 millions de litres de lait de chèvres et 271 millions de litres de lait de brebis (CNIEL, 2014). Le lait de vache est consommé de nombreuses façons, principalement sous forme de laits conditionnés, de fromages, de yaourts et desserts lactés, de crèmes conditionnées, de spécialités à tartiner, de matières grasses ou encore de poudres de lait. Les laits de chèvres et de brebis sont essentiellement transformés en fromages.

L'industrie laitière constitue un secteur économique majeur en France, et plus particulièrement dans le Grand-Ouest qui rassemble 43,5 % des élevages laitiers (Figure 1) et 48,3 % de la production de lait de vaches (CNIEL, 2014). En 2011, ce secteur représentait plus de 23 milliards d'Euros, soit 1/5 du chiffre d'affaires de l'agroalimentaire, au deuxième rang derrière les viandes (CNIEL, 2014). En 2013, le commerce extérieur affiche un solde commercial record de 4,3 milliards d'Euros pour les produits laitiers et à base de lait, identique à celui de 2012.

Les techniques et les conduites d'élevage (alimentation, matériel de traite, soins des animaux) ainsi que la sélection génétique ont permis d'améliorer la productivité dans les élevages laitiers (Figure 2). Ainsi, malgré la diminution du cheptel et du nombre d'exploitations au cours des dernières années en France, les volumes de lait produits sont restés stables. Cependant, cette augmentation de la productivité est inversement corrélée à la fertilité et à la santé des animaux. En effet, les dernières décennies de sélection génétique basée sur des critères de qualité (taux protéique et butyrique) et de quantité ont conduit à l'obtention de races hautement productives, comme la Holstein (Prim'Holstein

en France). Ces races sont généralement plus sujettes aux boiteries, mammites et métrites ou sont moins fertiles que des races produisant moins de lait mais plus rustiques (Boichard & Brochard, 2012; Pighetti & Elliott, 2011; Weigel, 2006). Ces différentes affections induisent des frais vétérinaires, un manque à gagner global (baisse de productivité des animaux et réformes anticipées), une surcharge de travail de l'éleveur et affectent le bien-être animal (Fourichon *et al.*, 1999; Rushen *et al.*, 2001). Par ailleurs, les mammites représentent la première cause d'utilisation d'antibiotiques dans les élevages (Barkema *et al.*, 2006).

Ces critères économiques et une demande sociétale croissante pour l'amélioration du bien-être animal et la diminution du recours aux antibiotiques (entre autres intrants) dans les productions agricoles justifient les efforts de recherche dédiés à la compréhension, la prévention et le traitement des mammites.

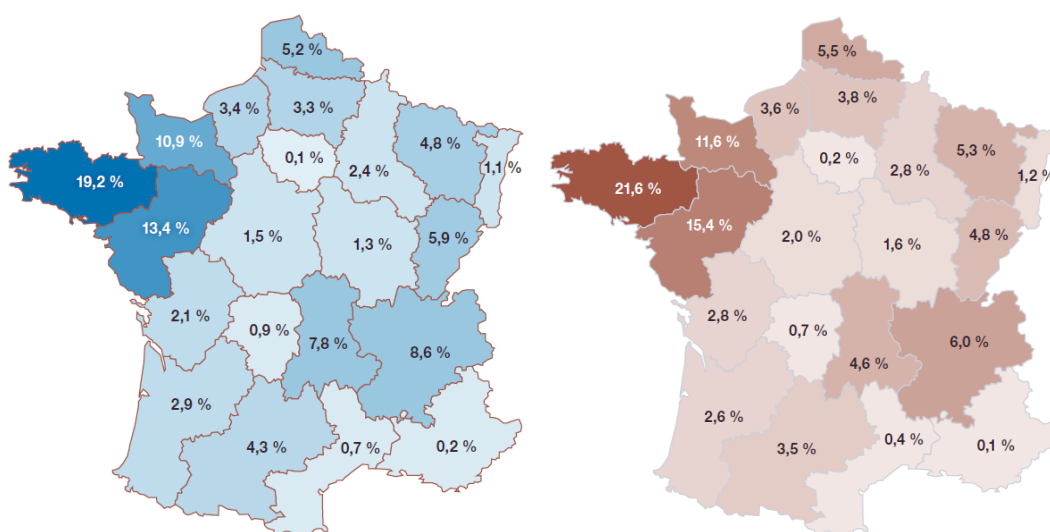


Figure 1 : Répartition des élevages laitiers (à gauche) et de la production laitière (à droite) en France métropolitaine en 2012 (CNIEL, 2014).

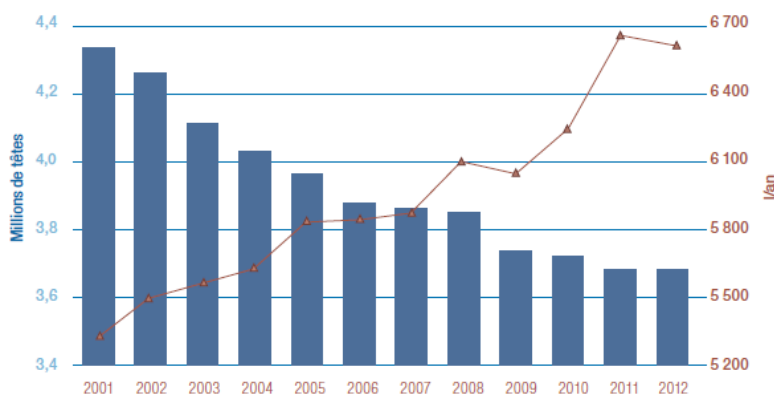


Figure 2 : Nombre de vaches laitières et leur rendement (CNIEL, 2014).

2. Et quelques données anatomiques...

L'anatomie de la glande mammaire varie selon les espèces. Le nombre de glandes et de trayons ne sont pas les mêmes chez la vache, la truie ou la jument. Cependant, l'anatomie microscopique est très semblable chez ces animaux.

La mamelle de la vache laitière est constituée de quatre glandes séparées et comportant chacune un trayon. Le lait sécrété dans une des glandes ne peut pas passer par une autre glande. Les côtés gauche et droit sont aussi séparés par un ligament médian tandis que les quartiers avant et arrière sont moins clairement séparés. L'ensemble de la mamelle est suspendu au pelvis par un ligament suspenseur. Si ce ligament est rompu ou trop lâche, l'affaissement de la mamelle entraîne des difficultés de traite et augmente les risques de mammite à cause de la proximité des trayons avec le sol, d'où une exposition plus importante aux pathogènes.

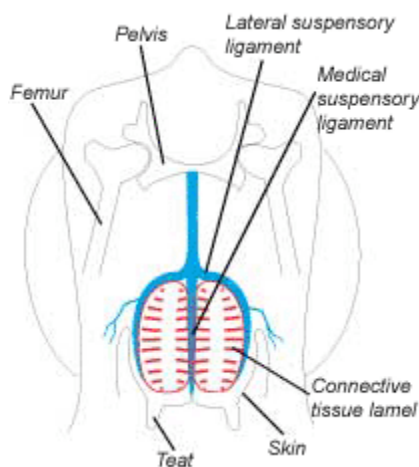


Figure 3 : La structure de soutien de la mamelle (d'après Sandholm *et al.*, 1990)

La mamelle est composée de tissus de sécrétion et de tissus conjonctifs. La quantité de tissus de sécrétion ou le nombre de cellules sécrétrices est le facteur limitant la production laitière de la glande mammaire. Il est généralement admis que les grosses glandes mammaires sont associées à une haute production de lait. Ceci n'est pas tout à fait vrai en réalité puisqu'une grosse mamelle peut être constituée de beaucoup de tissus conjonctifs ou adipeux. Le lait est synthétisé par les cellules sécrétrices qui sont elles-mêmes disposées en une couche simple sur une membrane dans une structure sphérique appelée alvéole. Le diamètre de chaque alvéole est d'environ 50-250 μm . Plusieurs alvéoles regroupées constituent un lobule. Cette structure ressemble beaucoup à celle du poumon. Entre les trayons, le lait (continuellement sécrété dans la zone alvéolaire) est stocké dans les alvéoles, les canaux d'excrétion et dans la citerne du trayon.

Le trayon est constitué d'une citerne et d'un canal. Six à dix plis longitudinaux forment la rosette de Fürstenberg à l'endroit où la citerne du trayon et le canal se rencontrent. Cette rosette contient des leucocytes résidents et joue un rôle dans la lutte contre les mammites. Le canal du trayon est entouré de fibres musculaires longitudinales et circulaires. Entre les trayons, les sphincters gardent

l'extrémité du canal fermée. Également entre les traies, le canal du trayon est obstrué par de la kératine. La kératine fait barrage aux bactéries pathogènes.

Beaucoup de nerfs passent dans la mamelle, spécialement dans les trayons. La peau du trayon, couverte de nerfs sensibles à la tétée des veaux, est donc influencée par la pression, la chaleur et la fréquence des tétées (ou des traies). Les nerfs des mamelles sont reliés aux muscles du système circulatoire et des canaux lactifères. La succion du veau ou de la machine à traire induit une libération d'ocytocine qui provoque la contraction des cellules myoépithéliales dans les alvéoles mammaires et l'éjection du lait (Svennersten-Sjaunja & Olsson, 2005).

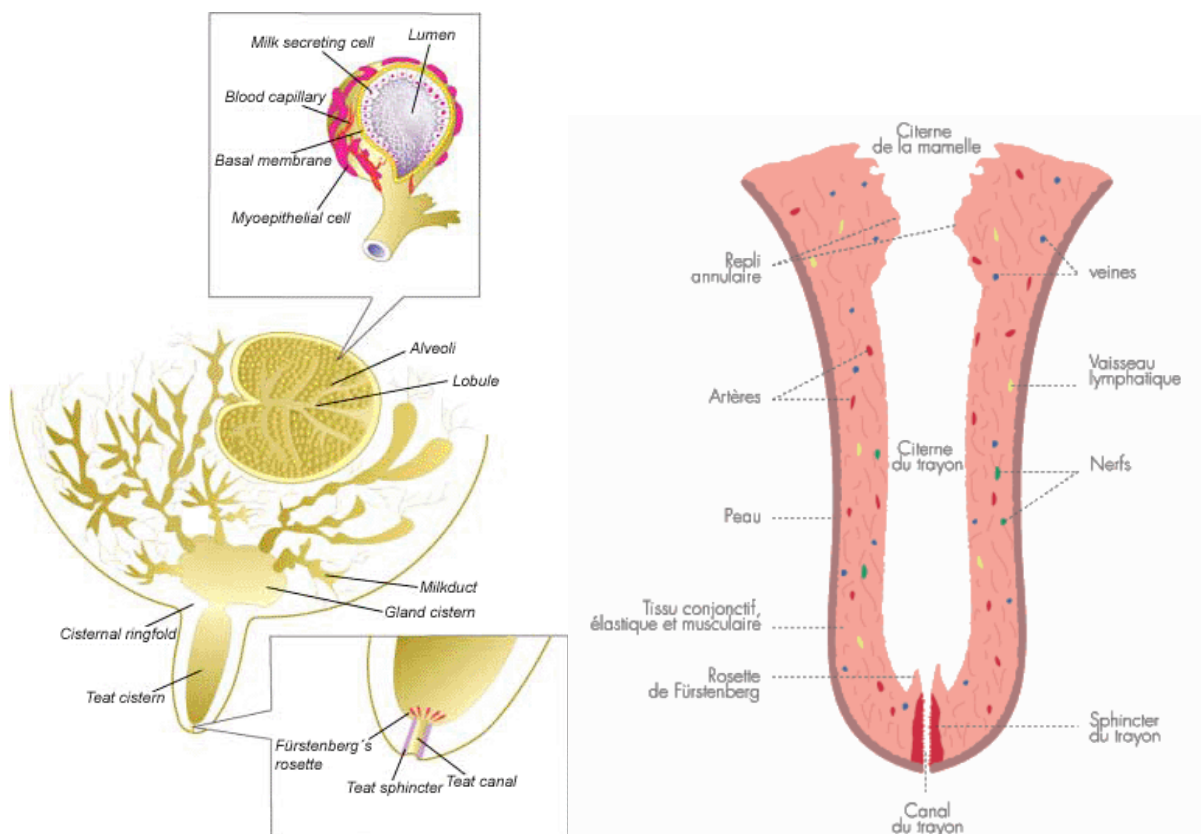


Figure 4 : Gauche: Anatomie schématique de la glande mammaire (d'après DeLaval, 2014), Droite : Coupe schématique d'un trayon de vache (d'après Institut de l'élevage, 2009)

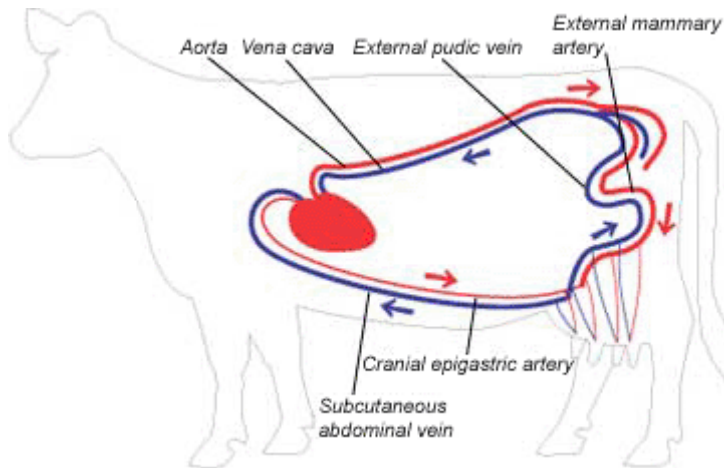


Figure 5 : Schéma du système vasculaire de la mamelle (d'après DeLaval, 2014)

Beaucoup de veines et d'artères irriguent la mamelle. Il faut environ 500L de sang circulant dans la mamelle pour produire 1L de lait. Pour une vache produisant 60L de lait par jour, 30 000L de sang circulent dans la mamelle. Cela nécessite un système circulatoire bien développé et dédié à l'irrigation des cellules sécrétrices dans les alvéoles (Figure 5). Les moitiés droite et gauche possèdent normalement leurs propres sources artérielles. Il existe quelques petites connexions artérielles qui passent d'une moitié à l'autre. La première fonction du système artériel est de fournir une source continue de nutriments aux cellules sécrétrices

II. Mammites staphylococciques

1. Généralités

La mammité est la principale cause de pertes économiques dans les élevages laitiers, à cause de la perte de production au niveau des quartiers infectés, des traitements vétérinaires, le surcroît de travail de l'éleveur, et le tarissement prématuré. Par ailleurs, la qualité du lait est affectée par la présence de pathogènes et/ou de résidus d'antibiotiques de même que par l'élévation du comptage de cellules somatiques (CCS ; NB : un lait dont le CCS est supérieur à 400 000 cellules/mL est déclaré impropre à la consommation humaine selon la directive EEC94/71).

Le coût moyen annuel pour un troupeau de 100 vaches laitières est estimé entre 6 000 et 10 000 € (Fabres-Klein *et al.*, 2014), ce qui représente plus de 218 millions d'Euros pour l'ensemble du cheptel français (3,6 millions de vaches laitières en France en 2012 (CNIEL, 2014)). De ce fait, une prévalence élevée dans un troupeau peut être une menace directe pour la viabilité de l'exploitation laitière.

S. aureus est un des trois principaux pathogènes responsables de mammites, avec *Escherichia coli* et *Streptococcus uberis* chez les bovins (cf encadré) (Keane *et al.*, 2013). Ceci est observable dans toutes les régions productrices de lait, même chez celles qui ont mis en place des programmes stricts de lutte contre les mammites. L'incidence des mammites staphylococciques varie selon les pays et régions considérés et selon les hôtes. Chez les vaches laitières, *S. aureus* est responsable de 5 à 30% des mammites cliniques et 5 à 10% des mammites subcliniques. Chez les petits ruminants, l'incidence des mammites subcliniques causées par *S. aureus* est plus faible que chez les bovins (2 à 10% selon les races de brebis et 13% chez les chèvres) (Bergonier *et al.*, 2003; Santana *et al.*, 2013), avec une prévalence des staphylocoques à coagulase négative. En revanche, les cas de mammites cliniques sont plus importants : *S. aureus* est responsable de 75% des mammites gangréneuses chez les brebis (Tel & Bozkaya, 2012) et de 38% des mammites cliniques chez les chèvres (Nathawat *et al.*, 2013). A noter que les études portant sur les mammites subcliniques présentent des résultats très variables selon les régions, le climat et les méthodes de détection utilisées. Notamment, les chèvres sont sensibles à des lentivirus qui peuvent causer une élévation du taux de cellules somatiques et induire un biais dans la détection des mammites.

Les vaches sont plus sensibles aux mammites durant les périodes de lactation. De fait, la majorité des infections surviennent lors des trois premiers mois de la lactation, et environ 80% d'entre elles peuvent durer jusqu'à la fin de la lactation si elles ne sont pas traitées (Rainard & Poutrel, 1982). Cela explique pourquoi les vaches les plus âgées et donc qui ont eu le plus de lactations sont plus fréquemment infectées. La durée et la nature du traitement antibiotique conditionnent le taux de guérison des mammites (Barkema *et al.*, 2006).

Les mammites à *S. aureus* sont également un problème de santé publique potentiel puisque plus de la moitié des souches isolées de lait de glande infectées possèdent des gènes d'entérotoxines

(Le Loir *et al.*, 2003; Rall *et al.*, 2014). Le relargage depuis les glandes infectées vers le lait est généralement modéré (moins de 10 000 UFC/mL), mais la contamination du lait de tank peut conduire à des intoxications alimentaires dans les produits fermentés non pasteurisés (Le Loir *et al.*, 2003; Le Maréchal *et al.*, 2011a).

Les autres pathogènes majeurs en contexte mammite

Escherichia coli

Escherichia coli est un bacille à Gram négatif provenant des fèces des animaux et se développant dans la litière ou les aires de couchage souillées. Il cause des mammites dites environnementales. *Escherichia coli* présente une grande variabilité génomique, mais il semblerait qu'il n'y ait pas de corrélation entre les gènes de virulences et la gravité des symptômes de mammites (Wenz *et al.*, 2006). Contrairement aux mammites à *S. aureus*, la sévérité des symptômes dépend plus de l'animal et de sa réaction immunitaire (Burvenich *et al.*, 2003). La réponse inflammatoire lors des mammites à *E. coli* est généralement plus sévère que lors des mammites à *S. aureus* (Fu *et al.*, 2013). Les facultés d'adhésion d'*E. coli* aux CEM sont inférieures à celles de *S. aureus* (Döpfer *et al.*, 2001), toutefois, certaines souches sont capables d'envahir les cellules épithéliales et sont responsables de mammites chroniques (Almeida *et al.*, 2011; Dogan *et al.*, 2012). Cette chronicité serait fréquemment due à l'incapacité du système immunitaire de l'hôte à résorber totalement l'infection ou à un traitement antibiotique mal adapté (Burvenich *et al.*, 2003; Dogan *et al.*, 2006). Il pourrait également s'agir de souches qui se sont adaptées à l'environnement de la glande mammaire. Les facteurs d'adhésion, dont les fimbriae (F17, P et S), les adhésines et les intimines, jouent un rôle important dans les mammites à *E. coli* (Le Bouguéneq & Bertin, 1999; Girardeau *et al.*, 2003).

Quelques souches de *E. coli* isolées de mammites sont bien caractérisées et reproduisent des mammites soit chroniques, soit aiguës (Dogan *et al.*, 2006, 2012; Dufour *et al.*, 2011). La souche P4, la seule séquencée à ce jour, a été isolée d'une mammite aiguë et est fréquemment utilisée dans le cadre d'infections expérimentales pour reproduire des mammites (Blum *et al.*, 2012; Bramley, 1976; Dufour *et al.*, 2011).

Streptococcus uberis

Streptococcus uberis est généralement responsable de mammites cliniques. Tout comme *E. coli*, il est présent dans l'environnement, dans les aires de couchage souillées par les fèces des animaux, mais aussi sur la peau et les muqueuses ainsi que les trayons et leurs lésions, et le matériel de traite où il peut persister (Zadoks *et al.*, 2003, 2005). *S. uberis* colonise les canaux galactophores et est capable, par des adhésines, de se fixer sur les cellules épithéliales, lui permettant de ne pas être évacué lors de la traite. Il produit une hyaluronidase qui pourrait être responsable de la désorganisation des barrières tissulaires (Matthews *et al.*, 1994), favorisant son passage dans le parenchyme. A ce stade, le quartier atteint peut devenir un réservoir mammaire de germes et on peut observer un passage à la chronicité (Tamilselvam *et al.*, 2006). *S. uberis* présente un caractère polyclonal : de nombreux clones différents peuvent être identifiés au sein d'un même élevage. Cependant, il est possible qu'un nombre réduit de souches soient responsables des mammites d'une exploitation. Les mammites à *S. uberis* sont en général aiguës avec une inflammation du quartier, une hyperthermie et des caillots dans le lait.

Tout comme *E. coli*, il existe quelques souches modèles de *S. uberis* pour étudier les mammites (Almeida & Oliver, 2006; Hill, 1988; Lasagno *et al.*, 2012). A ce jour, seule la souche *S. uberis* 0140J a été séquencée (Ward *et al.*, 2009).

2. Sources de contamination

On recense de nombreuses sources de contamination par *S. aureus*, telles que l'air ambiant, la salle de traite, les aires de couchage, la présence d'abcès ou de lésions, la peau des jarrets ou des trayons, le vagin, le contact entre les animaux ou encore les mouches. Plusieurs études ont montré que le portage nasal est un réservoir important chez les ruminants (Alves *et al.*, 2009; Vautor *et al.*, 2009). Par exemple, une souche isolée d'une mammites gangréneuse chez une brebis a également été trouvée dans les naseaux d'un autre animal dans la même exploitation (Vautor *et al.*, 2009). Une glande mammaire infectée est aussi un réservoir non négligeable (Roberson *et al.*, 1994; Vautor *et al.*, 2009). Différentes espèces de staphylocoques peuvent être isolées au niveau du trayon avant et après la traite (Gougoulis *et al.*, 2007; Haveri *et al.*, 2008; Skoufos *et al.*, 2006).

En ce qui concerne les mammites chez les ruminants laitiers, l'unité épidémiologique est le troupeau : l'environnement contaminé ou des animaux infectés causent la plupart des épidémies. Les vaches peuvent être porteuses saines de *S. aureus* au niveau de la peau du trayon, du rectum ou des cavités nasales (Roberson *et al.*, 1994). Des études ont démontré que les sites les plus contaminés dans l'environnement de la mamelle sont la peau du trayon et les gobelets de la machine à traire. Les staphylocoques sont principalement transmis de pis à pis durant la traite, via la machine à traire ou les mains de l'éleveur. La transmission est également possible entre les animaux et les éleveurs (Sakwinska *et al.*, 2011). Bien que *S. aureus* puisse survivre quelques temps dans l'environnement, ce pathogène a besoin de coloniser l'animal pour assurer sa survie et sa multiplication, ce qui explique probablement pourquoi certains élevages n'ont pas de mammites à *S. aureus*. Si aucun animal du troupeau n'est porteur, il est peu probable que *S. aureus* vienne de l'environnement. En revanche, une fois qu'un des animaux du troupeau est contaminé, il y a des risques élevés pour que la bactérie soit transmise à d'autres animaux.

3. Processus infectieux

Les différents stades de la pathogénèse de *S. aureus* en contexte mammites sont encore mal connus, c'est pourquoi les étapes présentées ci-dessous relèvent de l'hypothèse, notamment les étapes qui suivent l'inoculation de la citerne de la glande mammaire (Figure 6).

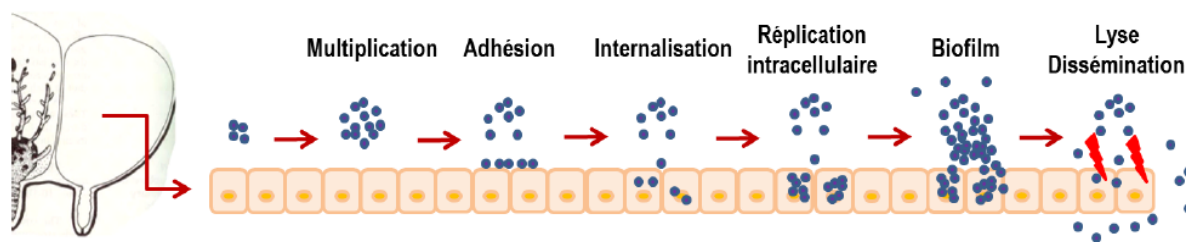


Figure 6 : Cycle infectieux présumé de *S. aureus* dans la glande mammaire (d'après Sinha & Fraunholz, 2010)

La première étape du processus infectieux est la contamination de l'extrémité du trayon. La colonisation du canal du trayon augmente la probabilité d'infection dans cette région. Après avoir passé le canal du trayon, *S. aureus* peut accéder à la lumière de la glande mammaire, qui contient toujours du lait, même après la traite. Lorsque les bactéries ont passé ce canal, elles se disséminent. Une charge infectieuse de moins de 100 UFC dans la citerne est suffisante pour induire une mammite dans une glande saine, avec une probabilité de succès élevée (Le Maréchal *et al.*, 2011b; Poutrel & Lerondelle, 1978; Schukken *et al.*, 2013). Cela montre l'importance du canal du trayon dans la protection de la mamelle. Une mamelle peut avoir un statut clinique sain (absence préalable de pathogène et faible taux de cellules somatiques dans le lait) mais reste tout de même hautement sensible à *S. aureus*. Par ailleurs, les techniques utilisées pour induire des mammites lors d'infections expérimentales ne sont pas parfaites. L'injection de bactéries dans le trayon permet de connaître la quantité de bactéries qui a causé l'infection mais elle n'est pas représentative des conditions d'infections naturelles. Au contraire, l'infusion des trayons est plus naturelle mais ne permet pas de savoir précisément la quantité de bactéries qui est entrée dans la glande mammaire.

Les conditions de croissance peuvent être drastiques dans le lait. Malgré la présence de nombreux nutriments, la biodisponibilité du fer est faible (10^{-18} M) du fait de la concentration élevée en protéines liant le fer (iron binding proteins) telles que la lactoferrine ou la transferrine (Andrews *et al.*, 2003). La lactoferrine présente une activité inhibitrice de *S. aureus* et sa concentration augmente dans le lait en cas de mammite clinique (Chaneton *et al.*, 2008; Lacasse *et al.*, 2008). Cependant, *S. aureus* est capable de capter le fer lié à la transferrine via des sidérophores (staphyloferrine A et B) et des systèmes de transporteurs à haute affinité (respectivement Sir et Hts) (Beasley *et al.*, 2011). Par ailleurs ces sidérophores jouent un rôle important durant l'infection : une souche dépourvue de sidérophores survit moins bien *in vivo* (Dale *et al.*, 2004). *S. aureus* présente également à sa surface des molécules capables de fixer la lactoferrine (Naidu *et al.*, 1991). L'adjonction d'un agent chélateur du fer à un milieu (autre que le lait) est ainsi utilisée pour imiter les conditions rencontrées en contexte infectieux (Allard *et al.*, 2006; Le Maréchal *et al.*, 2009). De plus, *S. aureus* est capable de se développer mais de manière plus lente en absence d'oxygène. Dans le lait, la pression partielle en oxygène est faible (23 mm Hg) et l'est encore plus en cas de mammite : le niveau d'oxygène est environ dix fois moindre que dans le lait sain (Mayer *et al.*, 1988).

A. Adhésion aux cellules épithéliales mammaires

L'étape suivante du processus infectieux intra-mammaire serait l'adhésion des staphylocoques aux CEM dans la citerne de la glande mammaire et les canaux galactophores. Plusieurs études *in vitro* ont démontré que *S. aureus* peut adhérer aux cellules épithéliales et que cette capacité est souche dépendante (Bouchard *et al.*, 2013; Hensen *et al.*, 2000a). L'adhésion de *S. aureus* aux tissus épithéliaux n'est pas aisée à démontrer *in vivo*. Cependant, plusieurs auteurs ont rapporté l'interaction

de *S. aureus* avec l'épithélium mammaire suite à des infections expérimentales (Brenaut *et al.*, 2014; Hensen *et al.*, 2000a). *S. aureus* pourrait adhérer de façon plus forte au niveau des sites de microlésions de l'épithélium, qui permettent l'exposition du tissu et de la matrice extracellulaire pour lesquels *S. aureus* a de nombreuses adhésines.

B. Internalisation dans les cellules épithéliales

L'étape suivante serait l'entrée de *S. aureus* dans les cellules épithéliales, qui pourrait expliquer en partie la persistance et la chronicité des mammites staphylococciques. Ce mécanisme est documenté pour d'autres pathologies chroniques causées par *S. aureus* chez l'humain, comme la rhinosinusite (Clement *et al.*, 2005; Plouin-Gaudon *et al.*, 2006) ou l'ostéomyélite, où *S. aureus* colonise les cellules osseuses et modifie son métabolisme pour s'adapter à un mode de vie intracellulaire et altérer les tissus infectés (Cassat *et al.*, 2013; Kalinka *et al.*, 2014; Rasigade *et al.*, 2011; Sanchez *et al.*, 2013). L'entrée dans les cellules hôtes est un mécanisme utilisé pour échapper aux défenses du système immunitaire. Un panel de facteurs de virulence exposés à la surface (protéine A, fibronectin- et fibrinogen-binding protein), sécrétés (entérotoxines, hémolysines et coagulases) permet la colonisation et la multiplication dans les tissus de l'hôte (Heilmann, 2011; Le Maréchal *et al.*, 2011b, c).

Il est prouvé que *S. aureus* peut adhérer aux CEM bovines (lignée MAC-T) et être internalisé. Le taux d'internalisation de *S. aureus in vitro* est variable selon les souches isolées de mammites, notamment selon leur système *agr* (Bayles *et al.*, 1998; Bouchard *et al.*, 2013; Buzzola *et al.*, 2007; Wesson *et al.*, 1998). Les staphylocoques isolés de mammites sont capables d'infecter les cellules épithéliales en culture primaire et le degré d'infection est lié à l'efficacité d'adhésion (Hensen *et al.*, 2000b). Les Fnb semblent nécessaires pour l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* (Edwards *et al.*, 2010; Lammers *et al.*, 1999). L'internalisation nécessite une polymérisation des filaments de F-actine dans les cellules épithéliales, ce qui laisse penser que *S. aureus* induit un remodelage du cytosquelette de la cellule hôte pour pénétrer via des vacuoles d'endocytose (Almeida *et al.*, 1996). Il s'agit d'un processus actif qui nécessite une synthèse de protéines et d'acides nucléiques *de novo* de la part de *S. aureus* et de la cellule hôte (Almeida *et al.*, 1997). Après l'internalisation, *S. aureus* est capable de se libérer des endosomes et les cellules ainsi infectées entrent alors en apoptose (Bayles *et al.*, 1998). Si l'apoptose est suivie d'une exfoliation de l'épithélium mammaire, cela pourrait constituer un mécanisme de clairance du pathogène durant la lactation, mais cela peut aussi être un moyen pour *S. aureus* de se disséminer dans les tissus alvéolaires adjacents. Il a été montré que les cellules épithéliales et les macrophages isolés de lait de glandes naturellement infectées peuvent contenir *S. aureus*, qui est généralement cultivable, indiquant que la bactérie peut survivre dans les cellules suite à l'internalisation (Hébert *et al.*, 2000).

Il est également possible que *S. aureus* entre dans un état de métabolisme ralenti appelé « Small Colony Variant » (SCV) qui lui permet de persister dans les cellules ou les tissus de l'hôte.

Les SCVs se forment sous l'influence des conditions imposées par les défenses immunitaires de l'hôte ou les antibiotiques. Ils ont la capacité de revenir à un phénotype sauvage lorsque les conditions redeviennent favorables, ce qui induit des infections persistantes (Proctor *et al.*, 1995). Chez *S. aureus*, les SCV sont des variant défectueux pour la chaîne respiratoire, causés par une altération du transport d'électrons et sont généralement auxotrophes pour l'hémine ou la ménadione. Dans le cas des mammites, une souche isolée de mammite chronique est capable de former des SCV en présence de gentamicine et revient à un phénotype sauvage en absence d'antibiotique (Atalla *et al.*, 2008). Cette souche a une expression réduite des gènes *agr*, *coa* et *hla*. Elle induit des symptômes moins sévères que la souche parente qui ne produit pas de SCV (Atalla *et al.*, 2009). Elle est également capable de persister plus longtemps dans les CEM *in vitro* (Atalla *et al.*, 2010).

Bien que l'invasion des cellules épithéliales n'ait pas été démontrée *in vivo*, celle du tissu interstitiel a été observée durant la mammite clinique : l'observation de coupes histologiques a montré des staphylocoques en amas sous-épithéliaux (Gudding *et al.*, 1984; Hensen *et al.*, 2000a).

C. Dissémination dans les tissus adjacents et persistance

La mamelle n'est pas complètement envahie par les bactéries. Les examens histologiques ont montré des sites localisés d'infection et il est probable que l'infection se propage dans les tissus mammaires via les canaux galactophores. De proche en proche, la majorité des tissus de la glande mammaire se retrouvent infectés, y compris le parenchyme. A une phase plus tardive du processus infectieux, *S. aureus* pourrait s'organiser en micro-colonies pour ensuite former des biofilms. Cependant, même si une proportion importante de souches isolées de mammites (40 à 60%, selon les études) sont capables de former des biofilms *in vitro* (Fox *et al.*, 2005; Szweda *et al.*, 2012), la formation de biofilms dans la glande mammaire n'a jamais été mise en évidence lors d'observations histologiques contrairement à ce qui a pu être observé dans des cas d'ostéomyélites (Buxton *et al.*, 1987). Il n'y a pas de surface solide dans la glande mammaire qui permette à *S. aureus* de former un biofilm comme sur les os ou les implants chirurgicaux. Toutefois, la nécessité de surface solide est discutable car *Escherichia coli* est capable de former des pseudo-biofilms intracellulaires dans un contexte d'infections urinaires (Anderson *et al.*, 2003, 2010).

Un autre mode de persistance au sein des tissus mammaires serait la formation d'abcès. Plusieurs protéines d'adhésion sont impliquées à différents stades de la formation de l'abcès, dont les SERAMs ainsi que les protéines de liaison au fibrinogène ClfA et ClfB (Cheng *et al.*, 2009, 2010).

4. Virulence

A. Facteurs de virulence de *S. aureus*

La pathogénie de *S. aureus* repose sur trois catégories de facteurs de virulence : les protéines de surface, les exoenzymes et les exotoxines.

a. Les protéines de surface
Les facteurs d'adhésion

L'adhésion est une étape clé, que ce soit pour former des biofilms ou induire une infection. Chez *S. aureus*, on distingue deux catégories de protéines impliquées dans l'adhésion : les MSCRAMMs (pour Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules) qui sont des adhésines liées de manière covalente au peptidoglycane (Patti & Höök, 1994), et les SERAMs (pour Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules) qui sont des adhésines sécrétées (Chavakis *et al.*, 2005).

Parmi les MSCRAMMs, on trouve les protéines de liaison à la fibronectine, FnbA et FnbB (Fibronectin binding protein) (Jönsson *et al.*, 1991), la protéine de liaison au collagène Cna (Switalski *et al.*, 1989) et les protéines de liaison au fibrinogène ClfA et ClfB (Clumping factors) (McDevitt *et al.*, 1994; Ní Eidhin *et al.*, 1998). Elles présentent des caractéristiques structurales communes, avec un peptide signal en N-terminal qui permet l'adressage extracellulaire, un domaine d'ancrage à la membrane séparé par une séquence LPXTG dans la région C-terminale d'insertion dans la paroi (Foster & Höök, 1998). Ces protéines jouent un rôle dans l'adhésion à la matrice extracellulaire et aux cellules de l'hôte.

Les SERAMs comprennent les protéines Eap (Extracellular adherence protein), Emp (Extracellular matrix binding protein), Efb (Extracellular fibrinogen binding protein) et les coagulases Coa et vWbp (la protéine de liaison au facteur von Willebrand). Ces protéines se lient de façon hydrophobe aux protéines de la matrice extracellulaire comme le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine, la laminine, le collagène, les sialoprotéines, la prothrombine ou l'élastine (Chavakis *et al.*, 2005). Une fois liées, elles sont reconnues par des protéines de surface de la bactérie pour permettre son adhésion à la matrice extracellulaire (Hussain *et al.*, 2001). Ces protéines ont également des propriétés immunomodulatrices et limitent l'infiltration des leucocytes, empêchent l'opsonisation en bloquant l'activation du complément et en inhibant l'agrégation des plaquettes (Chavakis *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Shannon & Flock, 2004). La coagulase se lie à la prothrombine, formant un complexe appelé staphylothrombine qui peut cliver le fibrinogène en fibrine, ce qui provoque la coagulation du plasma (Kawabata *et al.*, 1985).

La protéine A

La protéine A (Spa) est une protéine majeure, ancrée à la surface de *S. aureus*. Elle est impliquée dans différents mécanismes de virulence. Elle est composée de différents domaines capables de fixer le fragment Fc des immunoglobulines G et M, ce qui permet à *S. aureus* de couvrir sa surface d'immunoglobulines mal orientées (Atkins *et al.*, 2008), lui permettant de résister à l'opsonisation et à la phagocytose, et empêche la fixation du complément. Ces domaines de liaison lui permettent aussi de fixer le facteur von Willebrand (O'Seaghda *et al.*, 2006) et provoquent l'agrégation des plaquettes. Spa favorise l'adhésion de *S. aureus* aux ostéoblastes ainsi qu'aux cathéters (Claro *et al.*, 2011; Henry-

Stanley *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2000). Elle permet à *S. aureus* d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Falugi *et al.*, 2013) et a également des propriétés immunomodulatrices, dont notamment une activité superantigénique et pro-apoptotique sur les lymphocytes B (Goodyear & Silverman, 2003; Kristiansen *et al.*, 1994). Elle est capable d'activer le complément (Espersen, 1985) et d'activer la réponse immunitaire en se fixant sur les récepteurs au TNF α (Gómez *et al.*, 2004).

La capsule

La plupart des souches isolées de mammites n'ont pas de capsule à proprement parler (déterminé *in vitro* par le test à l'encre de Chine) mais plutôt une microcapsule formée de polysides de sérotype 5 ou 8 (Poutrel *et al.*, 1988), codés par les opérons *cap5* et *cap8* respectivement. Chez les vaches, le sérotype 5 est retrouvé majoritairement (51,4%) alors que le sérotype 8 est majoritaire chez les brebis et les chèvres (75,8 et 68,5% respectivement) (Alves *et al.*, 2009; Poutrel *et al.*, 1988). Il existe également des souches de *S. aureus* non typables (dépourvues de capsule) isolées de mammites. Ces souches induisent des mammites chroniques chez la souris et internalisent en plus grand nombre dans les cellules épithéliales mammaires (CEM) (Tuchscherr *et al.*, 2005) alors que les souches de sérotype 5 et 8 sont plus virulentes chez l'animal (Thakker *et al.*, 1998).

Les gènes capsulaires sont activés par le système *agr* en fin de phase exponentielle de croissance. Chez les souches qui expriment les antigènes capsulaires, on retrouve davantage de sérotype 8 (Bardiau *et al.*, 2014). Ces sérotypes ne sont associés qu'à deux types de système *agr* : les types I et II. De manière générale, le sérotype 8 est associé au système *agr* de type II alors que le sérotype 5 est associé au système *agr* de type I (Bardiau *et al.*, 2014). Selon, Buzzola *et al.* (Buzzola *et al.*, 2007), la perte des opérons *cap5* et *cap8* chez les souches de type 1 serait une évolution vers un mode de vie intracellulaire.

b. Les exoenzymes

S. aureus produit des enzymes qui lui permettent de disséminer et d'étendre son foyer infectieux en dégradant la matrice extracellulaire. Ces enzymes sont de type metalloprotéase (Staphopaine A ScpA, Staphopaine B SspB, auréolysine Aur), lipase, hyaluronidase, élastase ou encore collagénase (Lowy, 1998; Nickerson *et al.*, 2010). Certaines de ces protéines, comme les staphopaines, sont impliquées dans la dissémination des biofilms (Mootz *et al.*, 2013).

Les sérines protéases V8 sont capables de cliver les chaînes lourdes des immunoglobulines et de modifier la capacité de *S. aureus* à se lier aux fibronectines. Ces protéases sont régulées par le système *agr* et pourraient être impliquées dans une transition d'un mode adhérent lors de la phase de croissance à un mode libre lorsque la biomasse atteint un seuil critique, permettant à la bactérie de coloniser de nouveaux tissus (McGavin *et al.*, 1997). Certaines protéases de type V8, telles que l'auréolysine ou les staphopaines sont capables de perturber le système immunitaire en inhibant

l'action du complément (Jusko *et al.*, 2014; Laarman *et al.*, 2011). CtpA une sérine peptidase de la famille S41 est également impliquée dans la virulence de *S. aureus* (Carroll *et al.*, 2014).

SplA, SplB et SplC sont capables de dégrader la caséine (Reed *et al.*, 2001; Stec-Niemczyk *et al.*, 2009). Chez *Listeria monocytogenes*, ClpP est impliquée dans la dégradation de la caséine (Zeiler *et al.*, 2013). Une protéine homologue existe chez *S. aureus* et on peut s'attendre à ce qu'elle présente les mêmes propriétés. *S. aureus* semble donc bien équipé pour se développer dans l'environnement de la glande mammaire, ou tout du moins dans le lait.

c. Les exotoxines

Entérotoxines

Les entérotoxines staphylococciques (SE) sont des exoprotéines produites par *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* et d'autres espèces de staphylocoques à coagulase positive. Elles ont des propriétés pyrogéniques et émétiques et sont responsables de symptômes observables lors des toxico-infections alimentaires dues à *S. aureus* (vomissements, diarrhées, crampes abdominales...). Les gènes qui les codent ont la particularité d'être portés par des éléments génétiques mobiles (MGE) : plasmides, phages tempérés ou défectifs, îlots génomiques ou îlots de pathogénicité, à l'exception de *selX* (codant une entérotoxine-like de type X) qui est portée par le génome central. Ces gènes sont parfois organisés en clusters (enterotoxin gene cluster ; *egc*) dont l'agencement et la composition sont variables d'une souche à une autre (Jarraud *et al.*, 2001; Viçosa *et al.*, 2013).

Les entérotoxines ont également la propriété d'activer les lymphocytes T (LT) par le biais d'une activité superantigénique. En temps normal, les LT sont activés lorsque leur T cell receptor (TCR) reconnaît un peptide immunogène présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) d'une cellule présentatrice d'antigène, de ce fait seule une sous population des LT est spécifiquement activée. Les entérotoxines permettent l'interaction stable et non spécifique du TCR avec le CMH malgré l'absence de peptide immunogène. De ce fait, contrairement à un antigène classique qui active jusqu'à 0,01% des LT, un superantigène peut activer 50% de tous les LT d'un organisme (Wilson *et al.*, 2011). Ce mécanisme fait que le nombre de LT activés est plusieurs milliers de fois supérieur au nombre de LT activés par un antigène, avec une prolifération des LT et une libération massive d'interleukines. Cette activation exagérée cause le syndrome de choc toxique (Wilson *et al.*, 2011).

Hémolysines

Les hémolysines sont des toxines qui forment des pores à la surface des cellules et dont les effets cytopathogènes ont été initialement décrits sur les érythrocytes, mais elles sont également capables de lyser d'autres types cellulaires. Différents types d'hémolysines ont été identifiés chez *S. aureus*, qui ont des cibles et des mécanismes différents.

Hémolysine alpha

L'hémolysine alpha (Hla) est une toxine qui forme des pores dans la membrane cellulaire. Elle interagit avec le récepteur membranaire ADAM10 (Inoshima *et al.*, 2011) et s'assemble sous forme d'homo-heptamères pour former un pré-pore qui mature ensuite en pore transmembranaire en baril β (Bhakdi & Trantum-Jensen, 1991). Cela conduit à la mort par nécrose de la cellule ciblée à cause de la perte en ion Ca^{2+} et K^+ . Les cellules les plus sensibles à son effet cytopathogène sont les érythrocytes, mais aussi les cellules épithéliales (Cifrian *et al.*, 1996; Gouaux *et al.*, 1994).

Hémolysine bêta

Contrairement aux autres toxines de type porines (formant des pores), l'hémolysine bêta (Hlb) ne forme pas de pores à la surface des cellules cibles. Il s'agit d'une sphingomyélinase neutre qui hydrolyse la sphingomyéline, un lipide de la membrane plasmique. Cette activité enzymatique est nécessaire à son activité hémolytique (Huseby *et al.*, 2007). La lyse des érythrocytes pourrait résulter de la déstabilisation des membranes plasmiques et du changement de fluidité de la bicouche lipidique (Vandenesch *et al.*, 2012). Comme Hla, Hlb est également capable de lyser les CEM bovines (Cifrian *et al.*, 1996).

Hémolysine delta et les Phenol-soluble modulins (PSMs)

L'hémolysine delta est une petite protéine amphipathique avec une structure en hélice alpha. Trois modes d'action sont proposés pour expliquer son effet hémolytique (Verdon *et al.*, 2009). A faible concentration, elle se fixe à la membrane pour créer des pores. Lorsque la concentration augmente, elle interagit avec les lipides membranaires et déstabilise la membrane en modifiant son rayon de courbure. Il a également été proposé qu'elle s'intercale dans la bicouche lipidique, entraînant un phénomène d'efflux du matériel cytoplasmique et un flip-flop des lipides membranaires. A forte concentration, elle induit la solubilisation de la membrane et sa dégradation en structures micellaires, conduisant à la lyse cellulaire.

Hld présente une activité hémolytique sur un large spectre d'espèces animales et de types cellulaires. Elle est capable de solubiliser les membranes lipidiques de certains organites cytoplasmiques, tels que les lysosomes, les vacuoles ou les protoplastes (Kreger *et al.*, 1971). Elle est particulièrement efficace sur les érythrocytes de lapins (Dinges *et al.*, 2000). Hld et Hlb ont un effet synergique sur des érythrocytes de moutons (Kreger *et al.*, 1971).

Les PSM sont des peptides sécrétés par *S. aureus* sans la présence de peptide signal. A ce jour, elles sont au nombre de 7 chez *S. aureus*. Elles sont organisées en hélice α avec une répartition des acides aminés hydrophiles d'un côté de l'hélice et les acides aminés hydrophobes de l'autre côté. De manière générale, l'expression de ces peptides est activée par le système Agr.

La cytolysse des cellules eucaryotes est une des principales activités des PSM de *S. aureus*. Il semblerait qu'il s'agisse d'un mécanisme indépendant des récepteurs de surface, contrairement aux

toxines telles que l'hémolysine α ou les leucocidines à deux composants qui ciblent particulièrement certains types cellulaires (Löffler *et al.*, 2010). Cependant, toutes n'ont pas les mêmes potentiels de lyse. Par exemple, PSM α 3 est la plus cytolytique sur les érythrocytes et les leucocytes alors que les PSM β ne le sont pas (Cheung *et al.*, 2012a; Wang *et al.*, 2007).

Du fait de leur conformation amphipatique, elles déstabilisent les membranes lipidiques et permettent à *S. aureus* de se libérer des vacuoles d'endocytose ou du cytoplasme des cellules eucaryotes. Elles ont également un rôle de surfactant et interviennent dans la structuration des biofilms (Periasamy *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011).

Toxines à deux composants

Les leucocidines et l'hémolysine gamma sont des toxines formées de deux sous-unités différentes : une sous-unité F (pour « fast ») et une sous-unité S (pour « slow »), nommées ainsi d'après leur vitesse de migration électrophorétique. Cette catégorie de toxines comprend l'hémolysine gamma (Hlg), correspondant aux deux combinaisons de composants S (HlgA et HlgC) avec un composant F (HlgB), la leucocidine de Pantone-Valentine (PVL) formée de LukF-PV et LukS-PV (Panton & Valentine, 1932), LukMF' (Choorit *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997), LukED (Morinaga *et al.*, 2003) et LukGH (Ventura *et al.*, 2010) également connue comme LukAB (DuMont *et al.*, 2011). Ces différentes toxines partagent un fort degré d'homologie chez *S. aureus* (observations personnelles, DuMont *et al.*, 2011), ce qui rend compliqué l'annotation des génomes.

Chacune des sous-unités se fixe à la surface des cellules sous forme de monomère, ou d'hétérodimères dans le cas de LukAB/GH (DuMont *et al.*, 2014). Elles s'assemblent en octamère, avec quatre sous-unités S et quatre sous-unités F alternées, pour former un pore dans la membrane cellulaire (Yamashita *et al.*, 2011), induisant la lyse de la cellule par dépolarisation membranaire.

De manière générale, ces toxines ciblent majoritairement les cellules du système immunitaire, même si l'efficacité de lyse est variable selon le type de toxine et de cellule cible. Elles sont particulièrement toxiques pour les neutrophiles, les monocytes et les macrophages. LukED et Hlg ont une activité hémolytique (Morinaga *et al.*, 2003) mais la PVL et LukAB/GH en sont incapables (Yanai *et al.*, 2014). Cette spécificité cellulaire provient du type de récepteur membranaire qui permet la reconnaissance par la toxine. Par exemple, LukED se fixe aux récepteurs CCR5 des leucocytes (Alonzo *et al.*, 2013), ce récepteur étant également ciblé dans des traitements anti-VIH, certaines drogues inhibent l'activité cytolytique de la toxine. La PVL cible les récepteurs au complément C5aR et C5L2 (Spaan *et al.*, 2013), LukAB/GH cible les récepteurs CD11b (DuMont *et al.*, 2014), LukM/F' cible spécifiquement les cellules myéloïdes, plus particulièrement chez les bovins (Fromageau *et al.*, 2010). HlgC reconnaît la même cible que LukS-PV (Gauduchon *et al.*, 2001), c'est-à-dire les récepteurs C5aR et C5L2. Toutefois, Hlg semble également reconnaître les phosphocholines pour se fixer à la surface des cellules (Noda *et al.*, 1980; Potrich *et al.*, 2009). Il est donc probable que ce soit ce mécanisme qui soit à l'origine de la lyse des érythrocytes. Il semblerait que la reconnaissance des

cibles membranaires se fasse via la sous-unité S de la toxine mais que la sous unité F soit nécessaire pour avoir l'activité cytolytique (Meyer *et al.*, 2009).

De plus, il est possible d'avoir des interactions croisées avec les sous unités de différentes toxines (Dalla Serra *et al.*, 2005). Par exemple, HlgB peut entrer en compétition avec LukS-PV et LukD pour interagir avec LukF-PV (Meyer *et al.*, 2009). Cela suggère l'existence de toxines hybrides qui augmentent potentiellement le nombre de types cellulaires ciblés mais il existe peu d'études sur ce sujet.

B. Systèmes de régulation de la virulence

S. aureus est capable de s'adapter à une multitude d'environnements différents. La faible taille de son génome et son adaptabilité suggèrent un haut degré de plasticité génomique, avec la capacité d'acquérir de nouveaux gènes ou de se défaire de gènes inutiles dans certaines conditions (Holden *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 2013; Rolain *et al.*, 2009). Etant donné le nombre important de facteurs de virulence présents chez *S. aureus*, et la spécificité de niche que certains de ces facteurs confèrent, l'expression des gènes correspondants doit être finement régulée durant le processus infectieux afin de coordonner leur expression de manière efficace. Dans ce contexte, les facteurs de transcription jouent un rôle important dans la régulation en activant ou en réprimant les gènes en réponse à des changements environnementaux ou physiologiques.

Parmi les facteurs de transcription de *S. aureus*, on trouve des facteurs σ , des systèmes senseur/régulateur à deux composants, des protéines qui se fixent à l'ADN, des ARNs régulateurs et un système de quorum sensing (Agr). A partir de la souche USA300-FPR3757, 135 facteurs de transcription ont été identifiés, répartis en 36 familles (Ibarra *et al.*, 2013). Il s'avère qu'environ 40% de ces facteurs ne sont pas encore caractérisés, mais il est possible de prédire le rôle de la plupart d'entre eux par homologie de séquence avec d'autres protéines bien connues. Les facteurs de transcription les plus représentés sont les protéines de la famille de MarR (18 membres), qui inclue la sous-famille Sar, et les systèmes senseur/régulateur à deux composants (16 membres) (Cheung *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 2013).

L'expression de nombreux facteurs de virulence est notamment régulée par le système *agr* (Figure 7). Il s'agit d'un système de régulation de la transcription lié au quorum sensing. Il est composé de 2 ARN divergents, l'ARN II, correspondant à la composante structurelle du système *agr* (opéron *agrBDCA*) et l'ARN III, correspondant à l'effecteur du système. AgrD produit un propeptide autoinducteur (pro-AIP) qui est sécrété et modifié par AgrB sous forme d'AIP. Celui-ci est reconnu par AgrC qui phosphoryle et active AgrA pour induire la transcription de l'opéron *agrBDCA* et de l'ARNIII. Ce dernier active la transcription de la plupart des gènes codant des protéines extracellulaires et réprime la plupart des gènes codant des protéines de surface (Novick, 2003).

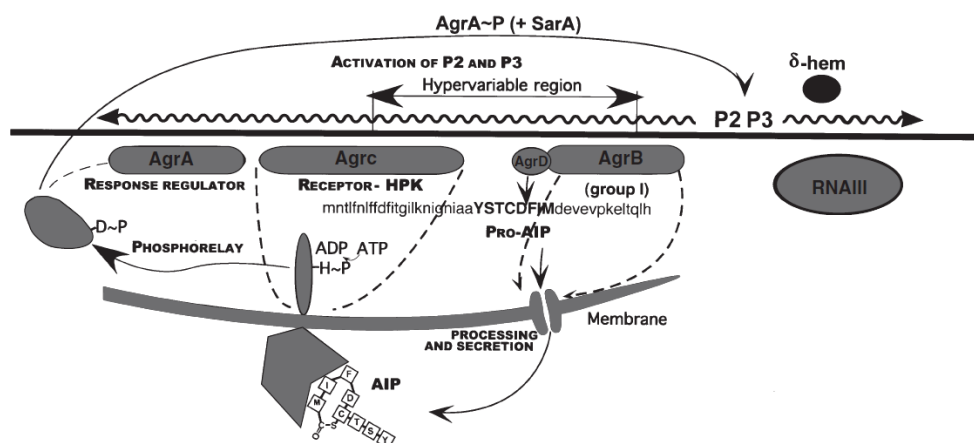


Figure 7 : Représentation du système *agr* (D'après Novick, 2003).

En règle générale, lorsque la population bactérienne est faible ou en croissance, le système est réprimé et les bactéries produisent plus de protéines liées à l'adhésion aux surfaces ou aux cellules, ou à la formation de biofilms. Lorsque la population est élevée et que la croissance ralentit, il y a une autoinduction du système *agr* qui fait que les bactéries passent d'une forme fixée à une forme libre.

Les membres de la famille MarR sont nommés ainsi à cause de leur homologie avec la protéine d'*Escherichia coli* « Multiple Antibiotic Resistance Regulator », qui régule un opéron codant une pompe à efflux pour des drogues. Les protéines homologues à MarR sont bien adaptées comme régulateurs de l'expression de gènes de virulence car elles peuvent répondre au changement environnemental lié à l'occupation d'une nouvelle niche écologique. Par exemple, chez *S. aureus*, SarA active l'expression des hémolysines α , β et δ à l'entrée en phase stationnaire directement en se fixant au promoteur et indirectement via l'activation du système *agr* (Cheung *et al.*, 2004).

Les systèmes senseur/régulateur à deux composants représentent une part importante des facteurs de transcription chez *S. aureus*, ce qui est cohérent avec sa capacité d'adaptation à de multiples environnements. Ils sont au nombre de 16 chez *S. aureus* et sont notamment impliqués dans la résistance à certains antibiotiques (Meehl *et al.*, 2007; Sakoulas *et al.*, 2002). Ce sont des systèmes de transduction des signaux environnementaux spécifiques des bactéries. Ils sont constitués d'un senseur présentant une activité histidine kinase en présence d'un stimulus, et d'un régulateur qui va être activé par phosphorylation et va aller activer la transcription des gènes cibles (Hoch, 2000).

Les ARNs régulateurs agissent pour la plupart en s'associant aux protéines ou aux ARNm. En plus de ces petits ARNs, certains ARNm sont sensibles à la concentration de certains métabolites, qui vont réguler leur structure et activer ou réprimer la traduction (Fechter *et al.*, 2014; Felden *et al.*, 2011). Ces systèmes de régulation sont encore mal connus mais ont une importance capitale dans la physiologie bactérienne. De manière générale, ces ARNs régulateurs sont impliqués dans le

métabolisme, l'adaptation aux stress et la virulence (Felden *et al.*, 2011). Ce sont de petits ARNs qui ne sont pas traduits en protéines mais interviennent dans la régulation de l'expression de certains gènes. Certains de ces gènes peuvent être impliqués dans la virulence de *S. aureus*, notamment ils peuvent être présents sur des éléments génétiques mobiles et être acquis par transferts génétiques (Pichon & Felden, 2005).

Différents mécanismes peuvent intervenir dans la régulation (Felden *et al.*, 2011). Pour les riboswitchs, la présence ou l'absence de certains métabolites modifie la structure secondaire de l'ARN et libère ou emprisonne le site de fixation du ribosome, régulant ainsi l'expression du gène et la synthèse du métabolite impliqué. Dans le cas des T-Boxes, les gènes impliqués dans la synthèse des ARNt sont directement régulés par ces derniers par interaction ARN-ARN. D'autres cas plus particuliers existent, tels que l'interaction de l'ARN SprD au niveau du site de fixation du ribosome l'ARNm de *sbi* pour empêcher sa traduction (Felden *et al.*, 2011).

Le principal exemple d'ARN non codants impliqué dans la virulence chez *S. aureus* est l'ARNIII (Novick, 2003), régulé par le système Agr. Il régule l'expression de plusieurs autres facteurs de régulation tels que *rot*, *spa* ou *coa* (Boisset *et al.*, 2007; Felden *et al.*, 2011). La famille des gènes *Rsa* est également largement impliquée dans la régulation de multiples fonctions physiologiques tels que la réponse aux stresses (Romilly *et al.*, 2014).

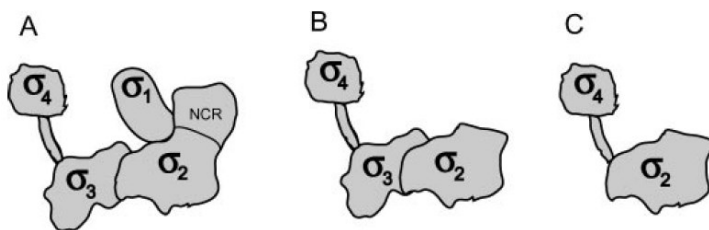


Figure 8 : Représentation des domaines de différents groupes de facteurs σ^{70} . A : Groupe 1, B : Groupe 3, C : Groupe 4 (ou ECF). (D'après Gruber & Gross, 2003).

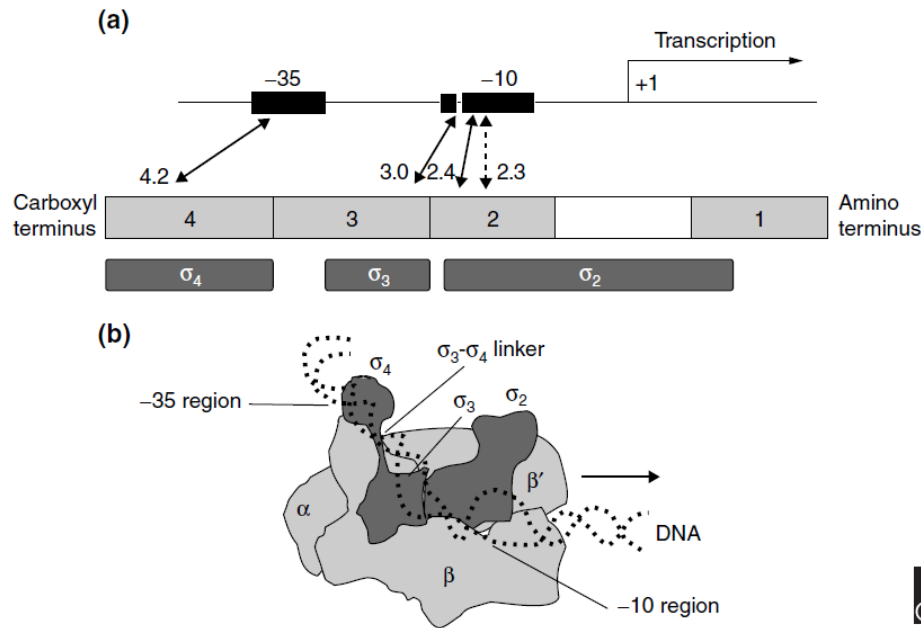


Figure 9 : Caractéristiques structurales des facteurs σ^{70} . (a) Les régions conservées des facteurs σ et leurs fonctions. Les quatre régions conservées ainsi que la région non conservée (NCR) sont indiquées avec les différents domaines σ . Le schéma d'un promoteur typique permet de montrer quelles sont les régions du facteur σ qui permettent la reconnaissance (indiquées par des flèches). (b) Un modèle d'interaction de l'ARN polymérase holoenzyme (avec les sous-unités $\alpha\beta\beta'$ en gris clair et σ en gris foncé) avec la séquence ADN d'un promoteur. La flèche indique le sens de transcription (D'après Paget & Helmann, 2003)

Il existe deux familles de facteurs σ (*a priori* sans lien entre elles) : σ^{70} et σ^{54} , et la majorité des facteurs σ appartient à la famille σ^{70} (Gruber & Gross, 2003). En se basant sur les similarités de séquence et les domaines des protéines, plusieurs groupes ont été identifiés dans cette famille. Les facteurs σ essentiels (groupe 1) et leurs paralogues non essentiels (groupe 2) comportent les 4 domaines différents et caractéristiques des σ^{70} , appelés domaines σ^1 à σ^4 (Figures 8 et 9), ainsi qu'une région non conservée (NCR) dans la région σ^2 (Gruber & Gross, 2003). Le groupe 3, dépourvu de domaine σ^1 et de région NCR, regroupe les facteurs σ impliqués dans l'adaptation aux chocs thermiques et la sporulation. Le groupe le plus important et aussi le plus diversifié est le groupe 4 et regroupe les facteurs σ ECF (Helmann, 2002). Ils ne sont constitués que des domaines σ^2 et σ^4 qui sont nécessaires pour l'interaction avec l'ARN polymérase et la reconnaissance des promoteurs. Ces facteurs σ ont été décrits comme étant un groupe de protéines qui partagent une faible homologie de séquence et fonctionnent comme des facteurs σ alternatifs (Lonetto *et al.*, 1994). Ils répondent à certains stimuli au niveau de la surface cellulaire ou des systèmes de transport.

La reconnaissance des promoteurs par l'ARN polymérase, composée des sous-unités $\alpha\beta\beta'\omega\delta\sigma$, est principalement dirigée par le facteur σ , une sous-unité de l'ARN polymérase (Helmann & Chamberlin, 1988). Toutes les bactéries possèdent un facteur σ principal (de ménage), qui est

responsable de l'expression basale de la plupart des gènes. Par ailleurs, la majorité des espèces bactériennes, et plus particulièrement celles qui sont capables de s'adapter à différents modes de vie, possède des facteurs σ alternatifs. Ceux-ci peuvent rediriger l'ARN polymérase pour initier la transcription de promoteurs alternatifs (Helmann & Chamberlin, 1988). En absence de stimulus, la plupart des facteurs σ alternatifs sont maintenus inactifs par un anti- σ , généralement co-transcrit (Brown & Hughes, 1995). Les facteurs σ alternatifs, et plus particulièrement les facteurs σ ECF, permettent l'adaptation aux conditions environnementales variables rencontrées chez l'hôte au cours de l'infection. La sous-unité delta de l'ARN polymérase est également capable de guider la reconnaissance des promoteurs de gènes impliqués dans la virulence (Weiss *et al.*, 2014).

Certaines espèces bactériennes peuvent avoir de nombreux facteurs σ . Par exemple, *Streptomyces coelicolor* en possède 65 (Bentley *et al.*, 2002), dont 45 facteurs σ ECF. De manière intéressante, *S. aureus* ne possède que 4 facteurs σ : un facteur σ de ménage σ^A (Basheer & Iordanescu, 1991; Deora & Misra, 1996) qui a une demie-vie courte lors de stress thermique mais son interaction avec l'ARN polymérase permet de le stabiliser (Mondal *et al.*, 2010), deux facteurs σ alternatifs σ^B et σ^H (Morikawa *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 1996) et un facteur σ aux fonctions extra-cytoplasmiques (facteur σ ECF) σ^S (Shaw *et al.*, 2008). Cette faible quantité de facteurs σ fait qu'il est probable que *S. aureus* utilise des systèmes de régulation de la transcription complémentaires.

Parmi les facteurs sigma, σ^B est le plus étudié chez *S. aureus*, ses effets sont observables dans de nombreux processus cellulaires. Son absence, chez une souche mutée, altère l'expression de facteurs de virulence (Cheung *et al.*, 2009; Entenza *et al.*, 2005; Kullik & Giachino, 1997; Kusch *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2008) mais ne modifie pas la réponse immunitaire de l'hôte lors de l'infection par rapport à la souche sauvage (Depke *et al.*, 2012). Il est également impliqué dans des mécanismes de résistance tels que la formation de Small Colony Variant et la persistance intracellulaire (Mitchell *et al.*, 2010a, b; Moisan *et al.*, 2006), la formation de biofilms (Jäger *et al.*, 2009; Rachid *et al.*, 2000) et de capsule (Meier *et al.*, 2007), la résistance aux stress oxydatif et alcalin (Kullik *et al.*, 1998), la résistance à la méthicilline et aux glycopeptides (Schulthess *et al.*, 2009). Il régule également l'expression de facteurs de régulation dont *yabJ/spoVG* et donc indirectement l'expression de nucléases, protéases et lipases (Schulthess *et al.*, 2011) et il régule la synthèse d'ARN non codants qui régulent eux-mêmes la transcription d'autres gènes de régulation (Romilly *et al.*, 2014).

Le facteur σ^H a tout d'abord été décrit dans la régulation de la compétence naturelle chez *S. aureus* (Morikawa *et al.*, 2003) puis dans l'intégration et l'excision de prophages (Tao *et al.*, 2010). Sa propre régulation semble complexe car dans certaines souches le gène semble être dupliqué dans le génome et forme de nouveaux gènes chimériques avec la séquence promotrice d'un autre gène (Morikawa *et al.*, 2012). Un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle permet de limiter les

effets de cette duplication. Une séquence inversée-répétée se trouvant sur l'ARN permet de séquestrer le site de fixation du ribosome (Morikawa *et al.*, 2012) ce qui inhibe la traduction.

Le dernier facteur σ à avoir été identifié chez *S. aureus* est le facteur σ^S (codé par le gène *sigS*), par homologie aux facteurs σ^M et σ^{YlaC} de *Bacillus subtilis* (Shaw *et al.*, 2008). Il comporte bien les deux régions σ^2 et σ^4 présentes chez les facteurs σ ECF et est suivi d'un gène, potentiellement co-transcrit, qui pourrait être un anti- σ du fait de sa position à la suite de *sigS* dans le génome et de la présence d'un motif H(LETN)C(VFH)C similaire au motif H(XXX)C(XX)C porté par certains facteurs σ ECF de *S. coelicolor* et *Mycobacterium tuberculosis* (Helmann, 2002; Paget & Helmann, 2003). Un mutant *sigS* chez *S. aureus* SH1000 est plus sensible et présente une mortalité plus élevée en conditions de carences nutritionnelles (Shaw *et al.*, 2008). Par ailleurs, sa virulence est impactée dans un modèle d'arthrite chez la souris : le mutant *sigS* induit une mortalité et une perte de poids plus faibles, des symptômes d'infection moins marqués et une production d'IL-6 plus faible que chez les souris auxquelles a été injectée la souche parentale (Shaw *et al.*, 2008). De plus, le mutant persiste moins dans les tissus infectés.

Une étude plus récente de la même équipe, portant sur l'activation de *sigS*, a montré que le niveau de transcription de ce gène était variable selon les souches (Miller *et al.*, 2012). Il y a une activation de *sigS* lorsque la bactérie est mise en contact avec des substances qui perturbent la paroi (SDS, triton-X100, ampicilline, phosphomycine) ou qui causent des dommages à l'ADN (H_2O_2 , NaOH, MMS). SigS permet également à la bactérie de résister au système immunitaire inné. Un mutant *sigS* est plus sensible aux composants du sérum et à la phagocytose, qui induisent la transcription de *sigS*. Il semblerait que ces effets soient plus marqués chez les souches 8325-4 et RN4220 qui ont une activité σ^B réduite, contrairement aux souches SH1000 et USA300 qui ont un σ^B actif (Miller *et al.*, 2012).

5. La réponse immunitaire de l'hôte dans la mamelle

Quand *S. aureus* entre dans la glande mammaire, il induit systématiquement une inflammation, au bout de quelques heures à quelques jours post-infection selon la taille de l'inoculum, de la souche de *S. aureus* et de l'individu infecté. Cette inflammation provoque le recrutement des cellules polymorphonucléaires neutrophiles, le type de cellules somatiques le plus représenté en cas de mammite (Riollet *et al.*, 2001) et autres leucocytes (monocytes, lymphocytes) en grande quantité. Une augmentation du taux de cellules est observée dans le lait, pouvant atteindre plusieurs million/mL. Ces cellules produisent des médiateurs responsables des symptômes cliniques et leur efficacité antibactérienne détermine le déroulement de l'infection. Cependant, malgré le recrutement important de cellules immunitaires, le lait provenant de mammites subcliniques contient peu de cytokines. Dans les laits de mammites à *S. aureus*, on ne détecte pas ou peu d'interleukine (IL)-1 β , d'IL-8, de TNF α et

de protéine C5a du complément activé, alors que ces molécules sont habituellement présentes en concentrations élevées dans les laits de mammites à *E. coli* (Bannerman *et al.*, 2004; Riollet *et al.*, 2000). Toutefois, les CEM sont capables de reconnaître *S. aureus* et de produire du TNF α et de l'IL-8 *in vitro* (Wellnitz & Kerr, 2004). *S. aureus* induit la production de TGF β qui réduit l'activité des neutrophiles (Bannerman *et al.*, 2006). Ce mécanisme pourrait expliquer la faible production de cytokines pro-inflammatoires lors des mammites staphylococciques, entraînant une baisse de l'activité bactéricide des cellules phagocytaires (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

Il y a peu d'informations sur les facteurs de virulence produits par *S. aureus* qui induisent l'inflammation. Il semble que les CEM expriment des récepteurs de type Toll (TLR2 et TLR4) à leur surface, qui leur permettent de reconnaître les acides lipotéichoïques et de produire en réponse des médiateurs pro-inflammatoires (Strandberg *et al.*, 2005).

A part les immunoglobulines, il y a peu de défenses immunitaires humorales dans la glande mammaire. Le système du complément seul n'est pas bactéricide pour *S. aureus*. La lactoferrine, qui a normalement un rôle bactériostatique, est peu opérationnelle du fait de la concentration élevée en citrate dans le lait (Bishop *et al.*, 1976; Rainard & Riollet, 2006). En effet, le citrate est un des précurseurs de la synthèse des staphyloferrines A et B (Beasley & Heinrichs, 2010; Cheung *et al.*, 2012b). Comme mentionné précédemment, la transferrine n'est pas efficace non plus car *S. aureus* est capable de capter le fer lié à cette protéine (Beasley *et al.*, 2011). Les défensines semblent être capables d'agir sur *S. aureus in vitro* mais leur effet n'a pas été étudié dans le lait, qui n'est pas un milieu favorable à leur action antibactérienne. Cependant certaines semblent produites de façon inductible par les CEM (Goldammer *et al.*, 2004; Swanson *et al.*, 2004) et il faudrait davantage d'études pour confirmer leur efficacité dans la glande mammaire, auquel cas elles pourraient avoir un rôle déterminant dans la protection de la mamelle.

La phagocytose reste la meilleure méthode de lutte de la glande mammaire contre *S. aureus*, à condition d'avoir une opsonisation de la bactérie. La fixation de protéines telles que les immunoglobulines IgM et IgG2 à la surface de la bactérie facilite l'interaction de celle-ci avec le phagocyte (Guidry *et al.*, 1993).

Les toxines staphylococciques sont également la cible des immunoglobulines, qui permettent leur inactivation (Larkin *et al.*, 2010). Cependant, cela présuppose un épisode infectieux sévère car, généralement, les gènes de toxines de *S. aureus* sont induits lorsque la concentration bactérienne est importante. Ainsi, ces immunoglobulines n'interviennent que contre les formes de mammites sur-aiguës et gangréneuses (Anderson *et al.*, 1986).

6. Degré de virulence et chronicité

Dans la littérature scientifique, le terme de virulence peut être utilisé de manière assez large, englobant aussi bien la production de toxines, que la modulation du système immunitaire de l'hôte ou

bien la persistance dans les tissus. Dans ce manuscrit, nous différencierons le terme de virulence pour désigner la production d'exo-enzymes et les dommages tissulaires qu'elles engendrent, de la chronicité qui est liée à la capacité de *S. aureus* à persister dans les tissus et à échapper au système immunitaire.

A. Toutes les souches de *S. aureus* n'ont pas le même degré de virulence

Les mammites causées par une infection bactérienne peuvent présenter plusieurs types de symptômes qui sont liés à la sévérité de l'infection. Selon les bactéries impliquées dans cette infection, l'évolution de la mammité ne sera pas la même. En règle générale, les mammites causées par *E. coli* sont aiguës et dépendent fortement des facteurs de l'hôte (Cf encadré sur *E. coli*). Au contraire, les mammites causées par *S. aureus* dépendent davantage des facteurs des souches. Les différents facteurs que la bactérie est capable d'exprimer influent sur la réponse immunitaire de l'hôte (Zbinden *et al.*, 2014).

En effet, une analyse de différentes souches de *S. aureus* montre que les génomes sont relativement homogènes, avec un génome central représentant en moyenne 84% du génome (Ben Zakour *et al.*, 2009). Toutes les souches séquencées de *S. aureus* contiennent un seul chromosome, dont la taille varie de 2,7 à 2,9 Mb. Lorsqu'ils sont présents, les gènes sont conservés en moyenne à 98% entre deux souches. La principale source de variation inter-souches est due au transfert de MGE. La transduction phagique est le mécanisme de transfert le plus commun. L'insertion sous forme de prophage dans le génome bactérien permet l'apport de facteurs de virulence à la bactérie hôte, participant ainsi au degré de virulence différent entre les souches (Novick, 2003). La conjugaison permet à *S. aureus*, à condition que la souche possède les gènes nécessaires, d'échanger du matériel génétique (Stout & Iandolo, 1990). *S. aureus* peut également capter de l'ADN exogène libre dans son environnement par compétence naturelle (Morikawa *et al.*, 2012).

Cette capacité de *S. aureus* à acquérir des gènes de virulence est étroitement liée à la capacité d'adaptation à un hôte et au degré de virulence variable selon les souches (Figure 10). Certaines souches possèdent donc des gènes de virulence en grande quantité, qui leur permettent d'échapper au système immunitaire de l'hôte, d'induire une forte inflammation en libérant des toxines ou de s'internaliser dans les cellules de l'hôte, alors que d'autres souches sont incapables de coloniser la glande mammaire et sont immédiatement éliminées par le système immunitaire en ne causant qu'une légère inflammation (Tableau 2).



Figure 10 : Typologie des mammites ovines (D'après Le Maréchal, 2010)

Outre la sévérité, la chronicité est un facteur important à prendre en compte dans les mammites à *S. aureus*. Selon la Fédération Internationale de Laiterie, une mammite chronique est une inflammation de la mamelle qui perdure sur une longue période de temps. Une mammite chronique peut présenter des épisodes cliniques ou subcliniques. Une mammite récurrente correspond à plusieurs cas de mammites dans le même quartier causées par le même pathogène sans élimination de la bactérie entre des épisodes cliniques (IDF, 2011). La description est plus précise pour les vétérinaires : « une mammite chronique est le plus souvent secondaire à une mammite aiguë. Les symptômes locaux sont discrets, lentement le quartier évolue vers l'atrophie du fait de l'installation de zones de fibrose cicatricielle. La mamelle devient noueuse à la palpation. La sécrétion n'est souvent modifiée qu'en début de traite. L'évolution est lente vers le tarissement de la sécrétion au bout de plusieurs mois » (Barrot-Debreil, 2008).

Dans la suite de ce manuscrit, nous utiliserons la définition vétérinaire lorsque nous mentionnerons les mammites chroniques.

Tableau 2 : Caractéristiques des différents types de mammites

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

*(FIL-IDF, 2011)

B. Certaines souches de *S. aureus* font des infections chroniques

Une des difficultés de traitement liées aux mammites à *S. aureus* est la fréquente chronicité de ces infections, un phénomène moins fréquent chez *E. coli*. Il est possible que la propension de *S. aureus* à induire des mammites chroniques soit liée à la moindre activation du système immunitaire et donc une élimination moins rapide par rapport à *E. coli* (Fu *et al.*, 2013).

La chronicité d'une souche de *S. aureus* peut être due à sa capacité à s'internaliser dans les cellules de l'hôte, ce qui la protège de la phagocytose et limite fortement l'efficacité des antibiotiques. Suite au passage intracellulaire, l'apparition du phénotype SCV est également une façon de survivre de manière prolongée dans le tissu infecté. La bactérie entre dans un état de métabolisme ralenti qui lui permet de subsister plus longtemps dans les cellules infectées et la rend moins sensible aux antibiotiques (Cf Internalisation dans les cellules épithéliales). La formation d'abcès est également un

mode de persistance dans la mamelle, en se protégeant des cellules polynucléaires neutrophiles. Ce mécanisme est à l'origine de la fibrose cicatricielle et de la perte progressive de production de lait dans la mamelle. La formation de biofilms pourrait être impliquée dans la chronicité des infections mais ce mécanisme n'a jamais été mis en évidence en contexte mammite bien que les souches isolées de mammites soient fréquemment capables de former des biofilms (Cf Dissémination dans les tissus adjacents et persistance).

Chronicité des infections à *S. aureus* en médecine humaine

Les infections chroniques à *S. aureus* décrites dans la littérature sont principalement associées à des pathologies humaines. En médecine humaine, *S. aureus* est retrouvé de manière chronique dans les ostéomyélites, des rhino-sinusites ou encore les infections broncho-alvéolaires.

S. aureus est naturellement présent en portage nasal chez environ 30 % de la population. Le passage d'un mode de vie commensal à un mode de vie infectieux n'est pas encore bien connu. *S. aureus* est présent et se multiplie dans le mucus sans induire d'inflammation (Clement *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2012). La présence de polypes semble augmenter le risque de rhino-sinusite et la formation de biofilms (Van Cauwenberge *et al.*, 2008; Sachse *et al.*, 2010).

Dans le cas de l'ostéomyélite, les bactéries internalisées dans les cellules hôtes restent en « dormance » en étant protégées des traitements antibiotiques et du système immunitaire et sont susceptibles de se réactiver après des années (Stevens *et al.*, 2007). Les tissus infectés se nécrosent et une opération chirurgicale est nécessaire pour retirer les tissus morts afin que les bactéries ne s'en servent pas pour former un biofilm (Cassat *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'augmentation de l'incidence de souches MRSA dans les ostéomyélites complexifie les antibiothérapies (Hatzenbuehler & Pulling, 2011; Vardakas *et al.*, 2013).

Dans chacune de ces pathologies, *S. aureus* est capable de pénétrer à l'intérieur des cellules des tissus touchés (Cassat *et al.*, 2013; Garzoni *et al.*, 2007; Sachse *et al.*, 2010) et de former des biofilms (Buxton *et al.*, 1987; Oncel *et al.*, 2010). Le passage intracellulaire permet aussi l'apparition du phénotype SCV (von Eiff *et al.*, 2001; Rit, 2014; Tan *et al.*, 2014). Ces mécanismes sont également décrits dans des cas d'infections broncho-alvéolaires chez des patients atteints de mucoviscidose (Mitchell *et al.*, 2011; Moisan *et al.*, 2006).

7. Méthodes de contrôle et prophylaxie

De précédentes études ont défini des procédures de contrôle pour maîtriser les mammites contagieuses. Les principales mesures incluent les procédures de traite, une désinfection correcte des trayons après la traite, la mise à l'écart ou la réforme des animaux infectés et la limitation de l'introduction d'animaux infectés dans le contexte de renouvellement d'un troupeau. Pour éviter la dissémination de l'infection au sein d'un troupeau, les quartiers infectés par *S. aureus* doivent être identifiés et diagnostiqués rapidement pour pouvoir les traiter et pour que les animaux soient isolés ou réformés. Pour cela, de nouvelles techniques sont en cours de développement afin de déterminer le plus rapidement possible, voire en temps réel, si des vaches sont en train de développer une mammite. Notamment un système de caméra infrarouge a été mis au point pour mesurer la température externe des pis afin de détecter les éventuelles inflammations (Metzner *et al.*, 2014).

L'efficacité des antibiothérapies varie considérablement, de 4% à 92% de taux de guérison, selon les antibiotiques utilisés (Barkema *et al.*, 2006). Parmi les infections intra-mammaires, la mammite à *S. aureus* est la plus difficile à traiter, avec des taux de guérison souvent inférieurs à 25% lors de la lactation. Ces échecs en antibiothérapie ne sont pas liés à une antibiorésistance. L'incidence de l'antibiorésistance parmi les souches de ruminants est effectivement faible à la fois chez les petits et chez les grands ruminants, excepté pour la pénicilline (25-85% selon les zones géographiques) (Alves *et al.*, 2009; Barkema *et al.*, 2006; Moser *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2012; Tel & Bozkaya, 2012). De manière étonnante, le taux de réussite des traitements est faible lorsque la mammite est causée par une souche résistante à la pénicilline, même lorsque le traitement n'est pas basé sur des antibiotiques de la famille des bêta-lactames. Puisque la résistance à la pénicilline est portée par des îlots de pathogénicité, ce phénotype peut être accompagné par d'autres gènes de virulence, ce qui peut expliquer ce phénomène (Barkema *et al.*, 2006). Certains auteurs recommandent de tenir compte de certains critères tels que l'âge de la vache, la productivité, la sensibilité de la souche aux antibiotiques, pour évaluer si le traitement antibiotique est approprié et de ne pas traiter certaines vaches qui ont des mammites afin de ne pas sélectionner de souches résistantes et de limiter les coûts de traitement (Barkema, 2006). Les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA), un dérivé de la pénicilline, sont très rares chez les ruminants. L'utilisation de méthicilline est proscrite du traitement des mammites chez les ruminants, ce qui fait que les souches isolées de ruminants ne subissent pas la même pression de sélection que les souches humaines (Ferreira *et al.*, 2012). Quelques cas sporadiques de mammites causées par des souches de MRSA ont été rapportés (Verkade & Kluytmans, 2014), souvent causées par des souches provenant de lignées humaines (cf encadré).

L'internalisation et la localisation intracellulaire (dans les neutrophiles ou les cellules épithéliales mammaires), la formation de micro-abcès ou de biofilms intra-mammaires et la persistance *in vivo* des SCV peuvent expliquer les échecs de ces traitements. Ceux-ci sont généralement administrés via le canal du trayon (injection intra-mammaire), parfois en association avec une thérapie parentérale.

Cas particulier des MRSA

Les premières souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline sont apparues en 1961, soit deux ans après le début d'utilisation de la méthicilline (Jevons, 1961). Dans les premiers temps, les souches résistantes sont restées confinées au domaine hospitalier. Le terme « Hospital-Associated » (HA)-MRSA décrit le comportement épidémiologique de ces souches particulières, qui peuvent être endémiques à certains établissements de soins. Les clones de HA-MRSA sont dominants dans ce type d'infections, même si un faible nombre de clones est véritablement efficace pour induire des infections (Cockfield *et al.*, 2007; Lindsay, 2013; Stefani *et al.*, 2012). Les premiers clones HA-MRSA ne se sont pas propagés rapidement et leur incidence était faible. Dans la plupart des pays développés, des clones épidémiques de MRSA sont apparus dans les années 1980-90, suite à l'évolution de nouveaux clones (Chambers & Deleo, 2009; Knight *et al.*, 2012).

Par la suite, à la fin des années 1990, des souches de MRSA ont été retrouvées dans des populations sportives, militaires ou carcérales (Chambers, 2001), d'où l'appellation de ces clones de « Community associated » (CA-) MRSA. Les personnes contractant des infections avec ces clones sont généralement en bonne santé et ne présentent pas de liens avec des établissements de soins. Les CA-MRSA causent majoritairement des infections de la peau et des tissus mous (Otto, 2013a), souvent très douloureuses, mais généralement moins sévères que les infections causées par des HA-MRSA (Miller *et al.*, 2005).

Le premier isolement de MRSA chez l'animal a eu lieu en 1972 en Belgique, à partir d'une mammite bovine (Devriese *et al.*, 1972). Par la suite d'autres clones MRSA ont été isolés d'animaux (essentiellement mammifères et oiseaux). La première description de MRSA chez des porcs a eu lieu en France et a démontré l'appartenance du clone isolé au complexe clonal (CC) 398 (Armand-Lefevre *et al.*, 2005). Par la suite, plusieurs cas de colonisation d'individus par des « Livestock-associated » (LA-) MRSA CC938, en contact direct ou indirect avec des porcs, ont été décrits aux Pays-Bas (Voss *et al.*, 2005), puis dans d'autres pays en Europe, Amérique du Nord et Asie (Smith & Pearson, 2011). Les souches LA-MRSA CC398 partagent des caractéristiques génotypiques et phénotypiques : (1) elles ne sont pas typables par PFGE en utilisant *SmaI* (Bens *et al.*, 2006) ; (2) la plupart d'entre elles appartiennent au ST398 ou à un ST proche, associé au CC398 (Graveland *et al.*, 2010; van Loo *et al.*, 2007) ; (3) elles portent une cassette *SCCmec* de type IVa ou V qui sont différentes de celles trouvées chez les souches communautaire ou hospitalières (Li *et al.*, 2011) ; (4) elles sont fréquemment co-résistantes à d'autres antibiotiques non β lactam (Argudín *et al.*, 2011) ; et (5) la majorité ne portent pas de toxines telles que la PVL ou les entérotoxines (Hallin *et al.*, 2011). Une étude épidémiologique du CC398 laisse penser qu'il s'agissait à l'origine d'un clone humain sensible à la méthicilline, qui s'est répandu dans les élevages et a acquis la résistance à la méthicilline tout en perdant une partie des gènes de virulence chez l'humain (Price *et al.*, 2012).

Ces LA-MRSA CC398 ont également été retrouvés dans des élevages de chevaux (van den Eede *et al.*, 2009), de veaux à viande (Graveland *et al.*, 2010), de poulets (Mulders *et al.*, 2010) et de dindes ainsi que dans les abattoirs associés (Richter *et al.*, 2012).

Récemment un autre groupe de souches LA-MRSA, portant le gène *mecC*, un variant de *mecA* (García-Álvarez *et al.*, 2011; Shore *et al.*, 2011) a été découvert dans des élevages laitiers au Royaume-Uni. Elles ont été identifiées chez des lignées (CC130, ST425, CC1943) qui étaient considérées comme spécifiques des bovins mais étaient portées ou trouvées dans des isolats cliniques chez les humains (García-Álvarez *et al.*, 2011; Holmes & Zadoks, 2011). De plus, les tests PCR de routine, qui permettent de rechercher le gène de résistance à la méthicilline *mecA*, n'identifient pas *mecC* dans ces souches (Becker *et al.*, 2014).

Pour répondre à des demandes sociétales et éviter l'émergence de souches résistantes, des méthodes alternatives pour maîtriser les mammites sont actuellement étudiées afin de réduire l'utilisation massive d'antibiotiques dans les élevages.

La vaccination serait particulièrement adaptée pour limiter les infections mammaires. Cependant, le développement de vaccins contre les mammites à *S. aureus* s'est révélé complexe et ceux qui sont actuellement disponibles n'ont qu'une efficacité limitée dans les conditions d'élevage. Bien que de nombreux types de vaccin aient été testés et décrits dans la littérature (Bharathan & Mullarky, 2011; Pereira *et al.*, 2011), développer un vaccin efficace contre *S. aureus* reste le Saint Graal.

Certains des premiers vaccins étaient des bactérines contenant une ou plusieurs souches tuées généralement représentatives des souches endémiques (Lee *et al.*, 2005). Des toxoïdes (toxines inactivées) peuvent aussi être ajoutées aux bactérines. Comme elles sont produites par presque toutes les souches bovines, les hémolysines alpha et bêta sont souvent utilisées (Lee *et al.*, 2005; Watson *et al.*, 1996). Les polysaccharides de capsule ont également été testés (Prenafeta *et al.*, 2010). Des vaccins commerciaux ont été développés à partir de ces approches (Tableau 3). Cependant, bien qu'ils aient démontré une réduction de l'incidence des mammites à *S. aureus*, aucun n'est totalement satisfaisant et ne confère une protection complète (Middleton, 2008; Middleton *et al.*, 2006, 2009; Pankey *et al.*, 1985). Les vaccins bactérine-toxoïde font effet en améliorant la rémission spontanée et peuvent souvent réduire significativement le comptage des cellules somatiques (SCC) et les mammites chroniques mais ne sont pas adaptés pour empêcher les nouveaux cas de mammites.

Tableau 3 : Exemples de vaccins commerciaux contre les mammites staphylococciques

Nom	Référence	Composition du vaccin
Patent No. WO2006106166(A1)	(Martínez-Pulgarín <i>et al.</i> , 2009)	Souche recombinante atténuée de <i>S. aureus</i> (mutée pour les gènes <i>kata</i> et <i>hnb</i>)
Spanish patent No. 9200223	(Amorena <i>et al.</i> , 1994)	<i>S. aureus</i> 1A et <i>S. stimulans</i> C388 inactivés, exotoxines et exopolysaccharides purifiés de <i>S. aureus</i> , sulfate de dextran, liposomes contenant des exopolysaccharides
Mastivac I® (patent No. PTC/IL98/00627)	(Leitner <i>et al.</i> , 2003)	Toxoïde composée d'extraits des souches BS449, ZO3984, VLVL8407 et de sumageant de VLVL8407 avec un adjuvant de Freund incomplet
Lysigin®/Somato-Saph® (US Vet. Lic. No. 124)	(Ma <i>et al.</i> , 2004)	Bactérine composée de 5 souches de <i>S. aureus</i>
Ovax MGS®	Fatro (Italie)	<i>S. aureus</i> isolé de mammite gangréneuse, inactivé
Startvac®	Laboratorios Hipra, (Espagne)	<i>S. aureus</i> exprimant des antigènes capsulaires avec un adjuvant à base d'huile.
ISCOMATRIX™	(Camussone <i>et al.</i> , 2014)	<i>S. aureus</i> CP5 avec l'adjuvant ISCOMATRIX™

Des vaccins à base de *S. aureus* atténué ont également été testés, avec des résultats encourageants (Buzzola *et al.*, 2007; Pellegrino *et al.*, 2008, 2010). Cependant, la plupart ont été testés sur souris et les extrapolations du modèle murin au bovin n'ont pas toujours donné les résultats escomptés.

D'autres études décrivent l'utilisation de déterminants antigéniques purifiés (généralement des protéines de surface) comme vaccins. Plusieurs types ont été testés seuls ou en combinaison : FnbA (Mamo *et al.*, 1994), la protéine A (Pankey *et al.*, 1985), ClfA et la capsule (Tuchscher *et al.*, 2008), la glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (GapC/B) (Perez-Casal *et al.*, 2006). Ces vaccins améliorent les taux de guérison ou réduisent l'incidence des mammites sévères, la quantité de bactéries produites et les dommages tissulaires (Mamo *et al.*, 1994, 2000; Pankey *et al.*, 1985). Cependant, à nouveau, ces vaccins n'ont été testés que sur modèle murin, et bien que prometteurs, ces résultats ont besoin d'être validés chez des ruminants. MastVac, un vaccin disponible sur le marché, est basé sur un

mutant recombinant pour l'entérotoxine C staphylococcique (SEC) et a montré une efficacité dans la prévention de nouvelles infections par une souche virulente de *S. aureus* qui sécrète les entérotoxines A-D (Chang *et al.*, 2008). Un autre vaccin, basé sur SEC combinée à la glutathion-S-transférase modifie de manière efficace le développement des mammites (Cui *et al.*, 2010). Des stratégies plus récentes, telles que les vaccins à ADN ont également été considérées. Différentes protéines de surface ont été testées dans un contexte mammitaire : le clumping factor (ClfA) (Brouillette *et al.*, 2002), FnBP et ClfA (Shkreta *et al.*, 2004), une fibrinogen-binding protein (Efb), FnbA, ClfA et Cna (Castagliuolo *et al.*, 2006), ou GapB et GapC (Kerro-Dego *et al.*, 2006). Ces vaccins à ADN ont été testés lors de mammites expérimentales sur modèles murins. Cependant Shkreta *et al.* ont testé la combinaison de Fnb et de ClfA en vaccins chez des vaches et ont montré que malgré une réponse cellulaire et humorale dirigée vers Fnb et ClfA, les vaches n'étaient pas totalement protégées des infections à *S. aureus* (Shkreta *et al.*, 2004). Allard *et al.* ont montré que des souches mutées pour une exotoxine et pour le système de transport *vraFG* induisaient des mammites moins sévères et ont donc proposé d'utiliser les protéines codées par ces gènes dans un vaccin (Allard *et al.*, 2013). Un adjuvant, ISCOMATRIX™ (Isconova, Uppsala, Suède), permet d'obtenir une réponse humorale prometteuse contre une souche de *S. aureus* CP5 chez des vaches primipares (Camussone *et al.*, 2013, 2014).

Du fait du manque d'études indépendantes montrant l'efficacité de la protection conférée, la vaccination n'est pas encore une mesure prophylactique majeure. En contexte mammitaire, ce type d'approche nécessite de plus amples études afin d'avoir une meilleure compréhension des facteurs de virulence de *S. aureus*, afin d'identifier de nouveaux candidats pour les vaccins (par exemple en utilisant des approches de séquençage du génome et en identifiant les protéines candidates par Serological Proteome Analysis (SERPA) (Le Maréchal *et al.*, 2009; Tedeschi *et al.*, 2009) et pour améliorer les protocoles de vaccination chez les ruminants.

Les bactériocines de lactocoques ont aussi été testées comme stratégie alternative de lutte contre les mammites bovines. La lacticine 3147, produite par *Lactococcus lactis* DPC3147, une bactérie lactique isolée de grains de kéfir, a été combinée à un « teat seal » (Crispie *et al.*, 2005; Klostermann *et al.*, 2010) et a montré une réduction du nombre de *S. aureus* dans un trayon naturellement infecté (Klostermann *et al.*, 2008). La lacticine NK34 a également été testée sur un modèle murin, qui a présenté une survie de 80% dans le groupe traité alors que le groupe témoin n'avait que 7,5% de survie lors d'infection expérimentales avec *S. aureus* (Kim *et al.*, 2010). La nisine, une autre bactériocine de lactocoque, a été testée dans une formulation germicide comme « teat dip/solution de trempage » pour éviter les mammites. Ce germicide était plus efficace que 4 autres produits contenant des iodophores (1%, 0,5%, 0,1%) ou du digluconate de chlorhexidine (0,5%), et n'entraînait pas une irritation du trayon (Sears *et al.*, 1992). Les taux de traitement de vaches souffrant de mammites à *S. aureus* ont aussi été améliorés (Cao *et al.*, 2007). La nisine est le principe actif dans Concept (une solution de trempage ; Applied Microbiology, Inc., New York, NY) et Wipe-Out (une lingette ; Applied Microbiology) (Ryan *et al.*, 1998).

D'autres stratégies sont aussi envisagées en matière de prévention voire de traitement des mammites. Parmi celles-ci, l'utilisation de bactéries lactiques comme probiotiques mammaires est un concept émergent et prometteur. Des infusions intra-mammaires avec *L. lactis* DPC3147 chez des vaches ayant des mammites chroniques subcliniques ou cliniques ont été testées et se sont montrées efficaces pour la prévention des mammites, et aussi efficaces que l'antibiothérapie pour le traitement (Crispie *et al.*, 2008; Klostermann *et al.*, 2008). D'autres travaux ont montré que l'inoculation intra-mammaire de *Lactobacillus perolens* CRL 1724 dans la mamelle de vaches en tarissement n'aboutit à aucune altération structurelle de la mamelle ni modification d'aspect du lait. *L. perolens* s'associe aux cellules épithéliales *in vitro* et *in vivo* sans causer la moindre modification morphologique ou cellulaire et est capable d'inhiber l'adhésion de différentes bactéries pathogènes aux cellules épithéliales du trayon *in vitro* (Frola *et al.*, 2012, 2013). Il reste cependant à confirmer cet effet protecteur en conditions de mammites expérimentales. De même, trois souches de *Lactobacillus casei* ont montré une capacité à inhiber l'adhésion et l'invasion de *S. aureus in vitro* sur des cellules épithéliales mammaires bovines (Bouchard *et al.*, 2013). L'utilisation de bactéries lactiques probiotiques apparaît comme une alternative intéressante pour la prévention et le traitement des mammites contagieuses.

La phagothérapie (utilisation de phages pour lutter contre les bactéries) n'a pas eu de succès pour le moment. Le bactériophage K, un bactériophage lytique actif sur *S. aureus*, a été inoculé dans la glande mammaire de vaches atteintes de mammites subcliniques à *S. aureus* mais ces essais n'ont pas conduit à la guérison des vaches. De plus, l'infusion de phages dans la glande mammaire saine induit une augmentation des SCC. Des observations similaires ont été faites suite à l'inoculation de bactériophage K pour traiter des mammites induites expérimentalement (Lerondelle & Poutrel, 1980). Il a été montré que les protéines de lactosérum qui se fixaient à la surface de *S. aureus* bloquaient l'accès au bactériophage K, expliquant ainsi, au moins en partie, l'échec de la phagothérapie dans la glande mammaire (Gill *et al.*, 2006). Cependant, la phagothérapie reste une piste pour lutter contre les mammites, et d'autres bactériophages ont été étudiés. Ils ont montré une efficacité de lyse intéressante *in vitro* sur des pathogènes de la glande mammaire dont *S. aureus* (Dias *et al.*, 2013; Li & Zhang, 2014; Schmelcher *et al.*, 2012).

La sélection génétique des ruminants pour la résistance aux mammites, basée sur les SCC (un SCC faible est corrélé à une faible incidence des mammites) (Pantoja *et al.*, 2009), est étudiée à la fois chez les grands et les petits ruminants (Pighetti & Elliott, 2011; Rupp *et al.*, 2009; Sugimoto *et al.*, 2011; Windig *et al.*, 2010). Des études ont également identifié des « quantitative trait loci » (QTL) pour les SCC et les mammites cliniques (Nilsen *et al.*, 2009; Sahana *et al.*, 2008; Sørensen *et al.*, 2008). Une stratégie plus directe est d'élever des vaches transgéniques capables de produire de la lysostaphine directement dans leur lait (Wall *et al.*, 2005). Le lait produit par ces animaux était capable de lyser *S. aureus* et, dans un contexte de mammites expérimentales, les vaches étaient totalement protégées contre 2 souches différentes de *S. aureus*. Cependant, l'acceptabilité sociale de l'utilisation de tels animaux est un obstacle majeur dans de nombreux pays. Une autre limite de ce modèle est la

présence résiduelle de lysostaphine, même après la fabrication du fromage, et le développement éventuel de résistances à la lysostaphine par transfert horizontal depuis des staphylocoques à coagulase négative (SCN) (Rainard, 2005).

III. *Staphylococcus aureus* en médecine vétérinaire

1. Infections à *S. aureus* chez les animaux (hors mammites)

Chez les animaux, comme chez les humains, *S. aureus* est retrouvé chez des porteurs sains et peut induire une large gamme d'infections allant des maladies de peau superficielles aux infections profondes et septicémies. En théorie, toutes les espèces animales à sang chaud peuvent être porteuses saines ou infectées par *S. aureus*. La fréquence de portage varie selon les études, avec une moyenne de 20% chez les humains (Acton *et al.*, 2009). Elle est estimée à 90% chez les poulets (Nagase *et al.*, 2002), 42% chez les porcs (Nagase *et al.*, 2002), 29% chez les moutons (Vautor *et al.*, 2005), entre 14 et 23% chez les vaches (Nagase *et al.*, 2002; Roberson *et al.*, 1994) et jusqu'à 35% chez les génisses (les naseaux et les trayons étant les principaux sites de colonisation) (Roberson *et al.*, 1994). Bien que rares, des cas de portage et d'infections chez des reptiles ont été reportés (Adkesson *et al.*, 2007). Chez les humains, les principales zones de portage sont les cavités nasales, le cuir chevelu et les mains. De plus en plus d'études se focalisent également sur le portage intestinal (Acton *et al.*, 2009). Chez les humains, le portage de *S. aureus* peut être permanent ou transitoire (Creech *et al.*, 2009). Une partie de la population humaine n'est jamais colonisée ce qui suggère que le fond génétique de l'hôte interfère avec la colonisation (van Belkum *et al.*, 2007). Pour le moment, cet aspect n'a pas été étudié chez les animaux.

La littérature portant sur les différentes infections à *S. aureus* est plus ou moins abondante selon l'espèce animale prise en compte. Cette disparité peut être due à la fréquence des infections mais également à l'impact économique qu'elles ont sur la chaîne de production et sur la qualité du produit fini (par exemple les œufs, la viande, le lait) et sur l'espérance de vie (pour les animaux de ferme). En effet, les cas d'endocardites et d'ostéomyélites sont rarement décrits chez des animaux de ferme, qui n'ont généralement pas le temps de développer de telles infections. A l'opposé, la dermatite est décrite plus fréquemment. Elle est facilement observable ce qui alerte les propriétaires d'animaux et les éleveurs qui recourent alors aux soins vétérinaires.

Des espèces animales (telles que les chiens) sont plus sensibles aux staphylocoques coagulase positifs autres que *S. aureus* (p. ex. *S. pseudintermedius*) (Tableau 4). Depuis l'émergence et la dissémination des souches de MRSA chez les animaux, les animaux de compagnie sont souvent considérés comme porteurs de MRSA, et largement étudiés en tant que réservoirs de MRSA et en tant que risque potentiel de transmission de l'homme à l'animal (Morris *et al.*, 2012) et *vice versa* (Bramble *et al.*, 2010; Verkade & Kluytmans, 2014).

La littérature sur *S. aureus* chez les animaux sauvages est très limitée, bien que des cas de portage sain ou d'infections aient été décrits chez les écureuils roux (dermatite exsudative ; Simpson *et al.*, 2013), les ours noirs (endocardites ; McBurney *et al.*, 2000), les zèbres (granulome cutané ; Pandey *et al.*, 1998), les rats-laveurs (botriomyose ; Hamir, 2010), les dauphins (meningocéphalite pyogène ; Colgrove & Migaki, 1976), les phoques communs ou veau-marins

(infections systémiques, portage sain de MRSA ; Van Pelt & Dietrich, 1973; Stewart *et al.*, 2014), les rhinocéros noirs (infections cutanées, septicémies ; Clausen & Ashford, 1980), les sangliers (portage nasal ; Meemken *et al.*, 2013; Porrero *et al.*, 2014), les macaques rhésus (portage nasal ; van den Berg *et al.*, 2011), les grands singes (portage nasal et septicémies ; Nagel *et al.*, 2013), les pinsons (portage sain ; Paterson *et al.*, 2012), les canards Colvert (septicémie, Wobeser & Kost, 1992), les chamois et les chevreuils (portage nasal et infections des tissus mous ; Luzzago *et al.*, 2014), les rats sauvages (portage nasal et oropharyngé ; Himsworth *et al.*, 2014) et les bouquetins, les cerfs élaphe ainsi que les vautours fauves (portage cutané et/ou nasal ; Porrero *et al.*, 2013, 2014).

Tableau 4 : Infections les plus communes causées par des staphylocoques à coagulase chez les animaux (d'après Pellerin, 2009)

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

Les maladies de peau représentent la majorité des infections staphylococciques rapportées chez les animaux. La dermatite suppurative (pyodermite), superficielle ou profonde, a été décrite chez le bétail (Foster, 2012) et chez d'autres espèces animales. Chez les chiens, *S. intermedius* et *S. pseudintermedius* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées alors que *S. aureus* est trouvé plus rarement. L'otite externe canine est une des pathologies les plus fréquentes en pratique vétérinaire. L'otite externe infectieuse est généralement une complication d'un facteur primaire qui a déclenché une inflammation dans l'oreille. *S. pseudintermedius* est souvent présent dans les oreilles saines et est l'agent étiologique le plus fréquent. *S. aureus* est isolé plus rarement (Penna *et al.*, 2010).

Chez les chevaux, les infections à *S. aureus* telles que les abcès cutanés ou les cellulites sont souvent décrites (Devriese *et al.*, 1985). Chez les porcs, l'épidermite exsudative est une infection sérieuse causée par des souches de *S. hyicus* qui produisent des toxines exfoliatives (similaires aux

toxines exfoliatives de *S. aureus*), qui dégradent de manière sélective les desmoglénines 1 porcines. Les symptômes sont une exfoliation de la peau, un érythème et de fortes exsudations. La maladie touche principalement les porcelets et peut conduire à une déshydratation et à la mort (Fudaba *et al.*, 2005).

S. aureus peut également être associé à des infections oto-rhino-laryngologiques (otites, surinfections des voies respiratoires hautes chez le chien et le chat), infections des voies urinaires chez plusieurs espèces, métrites (vache, chien), cystites (toutes les espèces), abcès (pulmonaires, périrénaux), ostéomyélites, endocardites, pleurésies, péritonites ou encore des arthrites, plus particulièrement chez la volaille (Tableau 4).

S. aureus peut aussi causer des botryomycoses, des inflammations pyogranulomateuses de la mamelle chez les vaches, juments et truies (mammites) et du cordon spermatique chez les chevaux, après castration. Les animaux sauvages sont également atteints par ces infections (ex. les rats laveurs) (Hamir, 2010). Il s'agit d'une réponse rare aux infections à *S. aureus* (et autres bactéries). Les granules d'éosinophiles qui se forment lors de la botryomycose ressemblent à ceux des infections avec les Actinomyces. La botryomycose pulmonaire est rare chez les chevaux et les humains (Bersoff-Matcha *et al.*, 1998), et touche rarement le bétail (Miller *et al.*, 2001). Des cas de botryomycose ont été décrits chez des porcs au Danemark sous forme d'éléphantiasis (œdème lymphatique causé par l'infection à *S. aureus*) (Kvist *et al.*, 2002).

Chez plusieurs espèces domestiques, *S. aureus* est un des principaux agents responsables de mammites, une maladie qui a un impact économique important sur la production laitière. C'est pourquoi la mammite est probablement la pathologie la plus documentée chez les animaux.

Chez les petits ruminants, *S. aureus* est un des principaux agents responsables de mammites. Il cause aussi des septicémies, qui peuvent être d'origine thromboembolique et dérivent d'une suppuration primaire d'un abcès dans le sang ou d'une contamination d'origine médicale (ex. cathéters contaminés) (Pyrah *et al.*, 1994). Les infections à *S. aureus* peuvent également être secondaires à des infestations avec différents parasites (ex. *Psoroptes ovis*) (Bates, 2003). Chez les agneaux, la pyohémie (septicémie à germes pyogènes) à tiques peut être causée par des souches de *S. aureus*, appartenant à la flore cutanée normale, injectées par la morsure de la tique. De telles infections évoluent soit en toxémies fatales, soit en maladies chroniques avec la formation d'abcès disséminés. Chez les chèvres également, l'infection staphylococcique peut survenir à la suite d'une infection primaire au virus parapox, qui conduit à une gale chorioptique ou une dermatite pustulaire contagieuse (Foster, 2012).

Staphylococcus aureus subsp. anaerobius est l'agent étiologique de la « maladie des abcès » ou « maladie de Morel » chez les petits ruminants, une lymphadénite qui affecte surtout les jeunes individus. *S. aureus subsp. anaerobius* est très proche de *S. aureus* et produit des facteurs de virulence extracellulaires en lien avec la pathogénicité, tels que TSST-1, ClfA, ou une protéine de liaison au fibrinogène (Goyache *et al.*, 1990; 'UniProt', n.d.). Des résultats récents indiquent que cette maladie

est due à un unique clone bactérien (ST1464) qui, suite à une longue adaptation, est restreint aux petits ruminants (de la Fuente *et al.*, 2010, 2011).

La « maladie des abcès » provoque des abcès caractéristiques au niveau des ganglions lymphatiques superficiels. Ces abcès sont les seules manifestations visibles et sont généralement localisés dans la région mandibulaire, bien qu'on puisse les observer également au niveau des ganglions cervicaux, sous-iliaques et poplités. Cette pathologie cause des pertes économiques importantes du fait que les animaux infectés ont une croissance moins rapide et que leurs carcasses sont déclassées dans les abattoirs (de la Fuente *et al.*, 2011).

2. L'adaptation de *S. aureus* à l'hôte

A. Biotypes et génotypes hôtes-spécifiques

Il a été démontré que les souches de *S. aureus* isolées d'animaux présentent des caractéristiques phénotypiques variables selon l'hôte d'origine. Six biotypes ont été définis selon la réaction des souches à six tests simples (Tableau 5) : humain, humain β -hémolytique, bovin, ovine-caprine, aviaire-abattoir et sans spécificité d'hôte. Depuis lors, ce concept de biotypes n'a pas été remis en question par d'autres méthodes de caractérisation (Devriese, 1984; Isigidi *et al.*, 1990; Shimizu *et al.*, 1991). En effet, en utilisant la « Multilocus enzyme electrophoresis » (MLEE), les populations de *S. aureus* isolées à partir de l'humain, le bovin et l'ovine sont classifiables selon des profils électrophorétiques qui sont rarement partagés entre les souches humaines et animales, suggérant une spécificité d'hôte et une transmission limitée de *S. aureus* entre les trois espèces hôtes testées (Musser & Selander, 1990). Les méthodes de génotypage basées sur le polymorphisme de profils de macrorestriction de l'ADN, telles que la « pulse field gel electrophoresis » (PFGE), ont confirmé que les souches appartenant à un même biotype sont regroupées dans un même (ou très proche) pulsotype (Hennekinne *et al.*, 2003). D'autres méthodes de typage ADN telles que l'« amplified fragment length polymorphism » (AFLP), appliquées à des souches isolées de mammites bovines ou chez des éleveurs et des personnes sans lien avec les animaux, ont montré que les isolats humains sont très similaires et assez distincts des isolats de vaches (Sakwinska *et al.*, 2011).

Les techniques basées sur les séquences d'ADN permettent de déterminer la structure d'une population de manière précise. La « Multi Locus Sequence Typing » (MLST) est une méthode de typage puissante, largement utilisée dans les études épidémiologiques, qui permet de déterminer le « sequence type » (ST) d'une souche. La banque de données MLST de *S. aureus* (<http://saureus.mlst.net>) contient plus de 2700 ST déterminés pour des souches isolées de différents hôtes (avec toutefois une large prédominance des isolats humains) (McCarthy *et al.*, 2012). Les données de MLST montrent clairement que certains complexes clonaux (CC ; un ensemble de ST très proches génétiquement) sont prédominants chez et clairement associés à un hôte donné. Les isolats de *S. aureus* associés aux élevages appartiennent à un petit nombre de clones trouvés chez les animaux

(Fitzgerald *et al.*, 1997; McCarthy *et al.*, 2012; Sakwinska *et al.*, 2011). Par exemple, les souches isolées de mammites cliniques sont principalement associées avec les complexes clonaux CC97, CC133, CC130, CC126 et CC705. Ce dernier, comporte le ST151, qui comprend des isolats trouvés uniquement chez des vaches. De plus, des isolats appartenant au CC133 sont trouvés chez des vaches, des brebis ou des chèvres et sont plus largement disséminés parmi les espèces de ruminants (Guinane *et al.*, 2010; Ben Zakour *et al.*, 2009).

Par ailleurs, les souches de *S. aureus* isolées d'infections de volailles ou de lapins appartiennent principalement aux ST5 et ST121, respectivement. Ces deux ST comportent également des souches d'origine humaine, ce qui suggère qu'elles partagent un ancêtre commun (Smyth *et al.*, 2009; Vancraeynest *et al.*, 2006). Récemment, des souches appartenant au CC8 ont été identifiées dans des isolats de mammites bovines. Le CC8 est bien documenté dans les cas d'infections et de portages humains, mais malgré sa proximité avec le CC8 humain, ce nouveau génotype CC8 bovin n'a été trouvé que dans un échantillon humain (éleveur ou non) collecté pour cette étude, ce qui suggère que ce nouveau clone adapté aux bovins est dû à un récent transfert de l'humain vers la vache, avec une perte d'aptitude à recoloniser l'humain (Sakwinska *et al.*, 2011).

Tableau 5 : Tests phénotypiques permettant la discrimination des différents biotypes de *S. aureus* (d'après Devriese, 1984; Isigidi *et al.*, 1990; Shimizu *et al.*, 1991).

Biotypes	Phenotypic characteristics			
	Staphylokinase	β -Haemolysin	Coagulation of bovine plasma within 6 h	Type of growth on crystal violet
<i>Host specific</i>				
Human	+	-	-	C/A
Human β -haemolytic	+	+	-	C/A
"True" avian (protein A-)/Abattoir (protein A+)	-	-	-	A
Bovine	-	+	+	A
Ovine	-	+	+	C
<i>Non host specific</i>				
K ⁻ β ⁺ Bov ⁻ CVType : C	-	+	-	C
K ⁻ β ⁺ Bov ⁻ CVType : A	-	+	-	A
K ⁺ β ⁻ Bov ⁺ CVType : A	+	-	+	A
K ⁺ β ⁺ Bov ⁺ CVType : A	+	+	+	A
K ⁻ β ⁻ Bov ⁻ CVType : C	-	-	-	C

Abbreviations: K = staphylokinase; β = β -haemolysin; Bov = coagulation of bovine plasma within 6 h; CV Type = type of growth on nutrient agar with crystal violet.

La construction d'un arbre phylogénétique à partir de résultats de MLST montre que la plupart des souches de *S. aureus* présentent tout d'abord une association avec l'être humain, et que les souches associées à des espèces animales découlent d'une lignée humaine (Shepherd *et al.*, 2013; Smyth *et al.*, 2009). Des analyses phylogénétiques récentes montrent de probables événements de transfert d'hôte, dont une majorité d'anthropo-zoonose (passage de l'humain à l'animal) et de zoo-antroponoses (passage de l'animal vers l'humain) (Shepherd *et al.*, 2013).

Cependant, il faut noter que la vision actuelle de la structure de la population doit tenir compte d'un biais potentiel induit par le déséquilibre entre le grand nombre de souches humaines présentes dans les banques de données MLST et le petit nombre de souches animales. Il apparaît que les souches animales (ou tout du moins les clones associés aux élevages) sont apparues à partir de souches humaines suite à un passage de l'humain vers l'animal, avec une spécialisation ultérieure qui a

empêché une transmission en retour de l'animal vers l'humain, comme cela est montré avec la transmission de la vache à l'humain (Sakwinska *et al.*, 2011). Une transmission limitée a également été mise en évidence entre d'autres hôtes animaux, telle que la transmission du chat au chien (Sasaki *et al.*, 2012). De la même manière, des études basées sur la détermination de biotypes et de pulsotypes ont montré une limite dans la transmission de la volaille à l'homme (Rodgers *et al.*, 1999). Par exemple, les souches adaptées à la volaille ont perdu leur protéine A. Cette dernière est en effet inutile (absence de sélection positive du gène) puisque les oiseaux n'ont pas d'IgG ou IgM dans leur répertoire immunitaire, mais des IgY qui ne se lient pas à la protéine A (Devriese, 1984; Lowder & Fitzgerald, 2010). On peut alors penser qu'un retour d'une souche aviaire à l'hôte humain serait pénalisé par l'absence de ce déterminant. Néanmoins, *S. aureus* est capable de passer d'un hôte à un autre et de s'adapter à son nouvel hôte, même après une longue période de ségrégation chez une espèce hôte donnée (Shepherd *et al.*, 2013).

La spécificité, en ce qui concerne la colonisation d'un hôte, a été étudiée expérimentalement *in vitro* en mesurant l'adhésion de six souches de *S. aureus*, appartenant à des lignées clonales associées à l'humain ou au porc, sur des cornéocytes humains ou porcins, et *in vivo* en étudiant la transmission verticale sur un modèle de colonisation chez le porcelet nouveau-né. Ces deux expériences combinées montrent que certaines lignées ont clairement des préférences d'hôtes (ST22 et ST36 chez l'humain, ST433 chez le porc) alors que d'autres semblent avoir un plus large spectre d'hôtes (ST398 et ST8) (Moodley *et al.*, 2012). De manière similaire, des « Extended-Host Spectrum Genotypes » (EHSGs) ont été décrits récemment chez des clones de *S. aureus* impliqués dans des infections chez le chien. Ces souches canines ont de fortes similitudes avec les souches humaines, qu'elles soient résistantes ou sensibles à la méthicilline (Vincze *et al.*, 2013). Bien que des lignées spécifiques à un hôte aient été décrites, d'autres semblent ne pas avoir de tropisme d'hôte. En effet, certains CCs sont partagés entre l'humain et plusieurs hôtes animaux, tel qu'il a été démontré pour le clone MRSA ST398. Cette lignée clonale était initialement associée aux infections communautaires puis elle est passée chez le porc et a rapidement essaimé dans le monde. Sa transmission à l'humain a conduit à la fois à des portages sains et à des infections sévères (Schijffelen *et al.*, 2010). Depuis, il a été mis en évidence chez les ruminants, la volaille, les chevaux et les animaux de compagnie (McCarthy *et al.*, 2012).

B. Bases moléculaires de la spécificité d'hôte

Des analyses comparatives de génomes par des approches d'hybridation (hybridation ADN-ADN ou microarray) et/ou « whole genome PCR scanning » (WGPS) ont montré que la spécificité d'hôte est observable au niveau du génome en termes de structure du génome, de contenu génique et de variation d'allèles. En prenant les isolats humains comme référence, ces études ont montré que plusieurs gènes sont conservés dans les souches humaines mais sont variables ou absents dans certaines lignées animales. Il y a des variations notables au niveau des MGE entre les souches

humaines et les souches animales. Les données suggèrent également que des échanges de MGEs, tels que les bactériophages et les îlots de pathogénicité, peuvent se passer entre les lignées humaines et animales. En accord avec les données de MLST, certaines lignées animales sont très proches des lignées humaines (ex les souches bovines) alors que d'autres semblent être davantage spécifiques d'un hôte particulier (ex les petit ruminants). De plus, seuls quelques gènes ou combinaisons de gènes semblent être impliqués dans l'adaptation à l'hôte et dans la spécificité (Sung *et al.*, 2008; Ben Zakour *et al.*, 2009). Ces études ont montré que le génome central de *S. aureus* est fortement conservé et que les MGE jouent un rôle crucial dans l'adaptation à l'hôte. L'acquisition (ou la perte) de tels éléments peut contribuer à la capacité de *S. aureus* à coloniser des hôtes animaux particuliers et/ou causer des maladies.

Les méthodes de comparaison des génomes par hybridation sont limitées par la quantité d'information génétique qui peut être déposée sur la puce. A cause du peu d'informations génomiques disponibles sur les souches animales, certains gènes spécifiques d'un hôte peuvent être absents et par conséquent peuvent ne pas être identifiés par ces méthodes.

La publication récente de génomes de souches animales a permis d'améliorer ces approches de génomique comparative et de génomique fonctionnelle, qui ont montré que certaines souches de *S. aureus* ont effectivement évoluées selon une diversification, menant à des phénotypes hôtes spécifiques.

De nombreux facteurs de virulence sont impliqués afin de contourner les défenses de l'hôte ou de moduler la sévérité des infections. L'adaptation à l'hôte passe par l'adaptation à ses défenses immunitaires. Comme toutes les espèces hôtes n'ont pas des systèmes immunitaires qui fonctionnent de la même façon, il est nécessaire pour la bactérie de s'y adapter pour ne pas être détruite. Les paragraphes qui suivent illustrent cette adaptation.

C. L'adaptation aux ruminants

S. aureus est un des principaux agents responsables de mammites. Relativement peu de lignées clonales sont impliquées dans les mammites chez les ruminants, avec une prédominance pour CC97, ST151, CC130 et CC126 pour les infections bovines et CC133 chez les petits ruminants.

Des analyses génétiques ont montré que les souches de ruminants ont émergé suite à un passage de l'humain à l'animal, il y a ensuite une évolution adaptative qui a conduit aux clones spécifiquement adaptés aux ruminants (Guinane *et al.*, 2010). Weinert *et al.* ont estimé le taux de substitution à partir de génomes complets de *S. aureus* avec des dates d'isolement connues. En utilisant un éventail de souches représentatives de la diversité de *S. aureus*, ils ont montré que la transmission de l'humain au bovin avait eu lieu il y a environ 5500 ans, durant le Néolithique et la diffusion de l'agriculture (Weinert *et al.*, 2012).

Les séquences génomiques de souches de ruminants sont à présent disponibles et ont largement contribué à clarifier les bases moléculaires de l'adaptation de *S. aureus* aux ruminants (Bouchard *et al.*, 2012; Hernandez *et al.*, 2013; Herron-Olson *et al.*, 2007; Le Maréchal *et al.*, 2011c, d; Resch *et al.*, 2013). En particulier, la séquence de la souche bovine RF122 (ET3-1), première séquence d'une souche animale à être publiée, a mis en évidence la présence de plusieurs MGEs qui n'avaient pas été identifiés dans les souches humaines. Notamment, un bactériophage tempéré d'origine bovine portant les deux composants LukM et LukF d'une leucocidine ayant des caractéristiques bovines. En effet, les souches isolées de mammites chez les ruminants produisent fréquemment les leucocidines LukM/F'-PV, Luke/D et l'hémolysine gamma. LukM/F'-PV est particulièrement active sur les neutrophiles de ruminants (Rainard *et al.*, 2003) et est la cytotoxine la plus efficace sur les neutrophiles bovins (Barrio *et al.*, 2006). Le gène *lukM* est présent chez presque toutes les souches isolées de mammites ovines, dans 2/3 des souches de mammites caprines et dans 10% des souches de mammites bovines (Rainard *et al.*, 2003). Lors de mammites expérimentales sur des chèvres, une production élevée de LukM/F'-PV a été associée au développement de mammites gangréneuses (Rainard, 2007). Les souches isolées de mammites gangréneuses sont généralement capables de produire des niveaux élevés d'hémolysine alpha et LukM/F'-PV (Le Maréchal *et al.*, 2011b, c, d; Rainard *et al.*, 2003). Cependant, quand la leucocidine LukM/F' purifiée est injectée seule, elle ne déclenche pas d'inflammation dans la glande mammaire (Fromageau *et al.*, 2011), ce qui suggère que l'association avec d'autres facteurs de virulence est nécessaire pour déclencher des symptômes sévères.

La leucocidine de Panton-Valentine (PVL) est un autre exemple de facteur de virulence porté par les phages. La PVL est peu active sur les neutrophiles bovins, alors que LukM/F' est moins efficace contre les cellules polymorphonucléaires humaines (Prevost *et al.*, 2001). De ce fait, il n'est pas surprenant de trouver le gène *pvl* dans le génome des souches humaines mais absent chez les souches de ruminants tandis que l'inverse est vrai pour le gène *lukM* (Bouchard *et al.*, 2012; Fueyo *et al.*, 2005; Guinane *et al.*, 2010; Herron-Olson *et al.*, 2007; Le Maréchal *et al.*, 2011b, c; Resch *et al.*, 2013).

La distribution des autres gènes et allèles varie selon l'hôte, ce qui indique la mise en œuvre de différentes stratégies d'infection ou une évolution de *S. aureus* avec son hôte (Tableau 6). Un exemple d'adaptation divergente est le cluster d'échappement au système immunitaire (immune evasion cluster, IEC), qui inclue les gènes *scn*, *chp*, *sak* et *sea* (van Wamel *et al.*, 2006). L'inhibiteur du complément (staphylococcal complement inhibitor : SCIN ; produit par *scn*) et l'inhibiteur du chimiotactisme (chemotaxis inhibitory protein of *S. aureus* : CHIPS ; produit par *chp*) sont très spécifiques de leur cible moléculaire humaine et ne réagissent pas avec l'équivalent bovin (Rooijackers *et al.*, 2005). La séquence peptidique du récepteur C5aR, qui interagit avec le CHIPS chez l'humain, diffère du C5aR bovin. De la même manière, la staphylokinase (produit par *sak*) chez les souches humaines n'est pas active sur le plasminogène de ruminants (Collen *et al.*, 1993).

Tableau 6 : Exemples de caractères spécifiques d'un hôte et leurs déterminants génétiques chez *S. aureus* (d'après Peton & Le Loir, 2013)

Gene	Function	Host-specificity	Genetic support	Reference
<i>vwb</i>	Plasma clotting	Equine <i>vwb</i> product clots ruminant and equine plasma	SaPIeq1	Viana et al. (2010)
<i>selx</i>	Superantigen	Distinct Vb activation profiles for human and bovine lymphocytes	Core genome	Wilson et al. (2011)
Lack of IEC	Immune evasion cluster	Human niche-specific activity	ΦAvβ	Lowder et al. (2009)
Loss of <i>sspA</i> function	Maturation of SspB that contributes to blood clot formation	Absent in poultry strain		Lowder et al. (2009)
Interrupted <i>spA</i>	Adherence to lung epithelium, binding to human platelets, inhibition of opsonophagocytosis resulting from non-specific binding of the Fc region of IgG	Absent in poultry strain	Core genome	Lowder et al. (2009)
<i>lukM-lukP-PV</i>	Cytotoxicity on neutrophils	Most active leukotoxin on ruminant neutrophils	prophage	Barrio et al. (2006) and Rainard et al. (2003)
<i>lukM-lukP</i>	Cytotoxicity on neutrophils	Weakly active on human polymorphonuclear cells	prophage	Prevost et al. (1998)
<i>scn</i>	Staphylococcal complement inhibitor (SCIN)	high specificity for their human target molecules/do not react with bovine targets	prophage	Rooijackers et al. (2005)
<i>chp</i>	chemotaxis inhibitory protein of <i>S. aureus</i> (CHIPS)	high specificity for their human target molecules/do not react with bovine targets	prophage	Rooijackers et al. (2005)
<i>sak</i>	staphylokinase	human strains not active on ruminant plasminogen	prophage	Collen et al. (1993)
<i>pvl</i>	Panton and Valentine Leukotoxin	weakly active on bovine neutrophils	prophage	Prevost et al. (1998)

Les îlots de pathogénicité de *S. aureus* (SaPIs) sont des MGE bien documentés qui portent des facteurs de virulence avec, notamment, des variants de gènes de virulence spécifiques de l'hôte. Viana *et al.* ont montré récemment que certaines souches de ruminants et de chevaux portaient un paralogue du gène *vwb* qui code la protéine de liaison au facteur von Willebrand (vWbp). Ces allèles de *vwb* sont portés par des SaPIs très mobiles et leur expression est régulée indépendamment (sous contrôle de SaeRS) de celle de la copie chromosomique de *vwb*. Ces allèles activent la prothrombine et confèrent une activité de coagulation spécifique du plasma de ruminants pour les souches porteuses. De façon intéressante, un autre variant de *vwb* a été trouvé sur un SaPI spécifique du cheval (appelé SaPIeq1) qui coagule le plasma de ruminants et de chevaux, alors que l'allèle bovin ne coagule que les plasmas de ruminants (Viana *et al.*, 2010).

Seuls quelques gènes codant des exoprotéines permettent de faire la distinction entre des souches humaines et ruminantes : *lukM/F'* n'est pas retrouvé dans les souches d'origine humaine, alors que *pvl* est associé à certaines pathologies sévères chez l'humain, mais est rarement trouvée chez les souches de ruminants. Le gène *sak* est également rare chez les souches ruminantes (Monecke *et al.*, 2007). Notons que certaines souches isolées de mammites portent ce gène. Ce sont probablement des souches humaines qui ont contaminé une vache laitière, des souches de ruminants qui ont échangé du matériel génétique avec une souche humaine ou des souches du biotype NHS (non-host-specific). Des différences de prévalence existent aussi pour d'autres gènes. Par exemple, *tst*, qui encode le superantigène TSST-1, est fréquent parmi les isolats de mammites. Ce gène est fréquemment associé avec les entérotoxines C et L (*sec* et *sel*), qui sont également des superantigènes, dont les gènes sont portés sur le SaPIbov (Fitzgerald *et al.*, 2001). Il faut aussi tenir compte des variants alléliques dans des analyses plus détaillées. Un variant bovin de *sec* est associé au SaPIbov, et la protéine variante

SECbov n'a pas les mêmes effets prolifératifs sur les lymphocytes humains et bovins. SECbov nécessite entre 10 et 1000 fois plus de toxine pour induire la prolifération de PBMCs humains ou bovins, comparé à SEC1 et SECov (le variant ovin) (Deringer *et al.*, 1997). De même, des variants de *lukD* (Herron *et al.*, 2002) et *hlg* (Fueyo *et al.*, 2005) peuvent aussi être spécifiques des bovins.

Environ la moitié des souches de mammites portent au moins un gène d'entérotoxine staphylococcique (SE), avec des variations significatives selon la région ou le pays (Le Loir *et al.*, 2003). La combinaison de gènes de SE caractéristiques du SaPIbov, ou de l'« enterotoxin gene cluster » (*egc*), sont fréquents chez les souches bovines (Ote *et al.*, 2011; Smyth *et al.*, 2005; Viçosa *et al.*, 2013) et ont également été décrits dans les souches de petits ruminants (Gharsa *et al.*, 2012; Le Maréchal *et al.*, 2011a, c). Les SE pourraient jouer un rôle dans la pathogénèse des mammites, mais leur mode d'action doit encore être éclairci. Une des hypothèses est que l'effet immunomodulateur dû à leur activité superantigénique favorise une réponse immunitaire de type Th2, qui est inefficace dans l'élimination des infections (Park *et al.*, 2006).

Curieusement, une autre toxine superantigénique, *selX* (staphylococcal enterotoxin-like X), a été identifiée dans le génome central de *S. aureus*, en dehors des MGEs. Ce gène *selX* est retrouvé chez 95% des souches phylogénétiquement divergentes isolées d'infections humaines ou animales. Il présente des activités biologiques caractéristiques d'un superantigène (mitogénicité spécifique du V β des lymphocytes T, pyrogénicité et potentialisation de certaines endotoxines). Cependant, les clones spécifiques des ruminants ou des humains expriment des variants de SEIX qui présentent un recouvrement partiel mais ont profil d'activation de V β distinct pour les lymphocytes humains ou bovins respectivement. Cela montre que le gène *selX* a subi une diversification fonctionnelle de SEIX dans les différentes espèces hôtes (Wilson, 2011).

Pratiquement toutes les souches de mammites produisent des toxines actives sur les neutrophiles. Toutes contiennent au moins une leucotoxine : un variant de *hlg* est présent dans toutes les souches, LukED est présent dans la plupart des souches et LukMF' dans 15-86% des souches (Monecke *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2005). Le gène *hla* est présent dans la plupart des souches et *hnb* est plus fréquent dans les souches bovines que dans les souches humaines, où le gène est fréquemment inactivé par l'insertion d'un prophage $\Phi\beta$ -HC (Goerke *et al.*, 2006; Resch *et al.*, 2013). Chacune de ces toxines pourrait avoir un rôle dans la pathogénèse des mammites (Bramley *et al.*, 1989).

Une proportion significative des souches de mammites (40-60%, selon les études) sont capables de former des biofilms *in vitro* (Fox *et al.*, 2005; Szweda *et al.*, 2012). La formation de biofilms *in vivo* n'a jamais été clairement démontrée dans des conditions de mammite, mais elle pourrait être associée à une diminution de la sensibilité aux antimicrobiens, conduisant à des traitements infructueux, particulièrement durant les infections de longue durée (Melchior *et al.*, 2011). Cucarella *et al.* ont démontré que sur un total de 195 souches de mammites, une grande proportion (95%) portait l'opéron *ica* (« intercellular adhesin ») et certaines de ces souches (25%) portaient aussi le gène *bap* codant la protéine Bap (« Biofilm-associated protein »), identifié à l'origine dans une

souche bovine (Cucarella *et al.*, 2004) et est associé à un îlot de pathogénicité (SaPIbov2). Il n'a été trouvé dans aucune souche humaine testée à ce jour (Latasa *et al.*, 2006; Valle *et al.*, 2012; Vautor *et al.*, 2008) mais certains staphylocoques à coagulase négatif possèdent un orthologue de *bap* (Tormo *et al.*, 2005). Les souches qui portent *ica* et *bap* semblent induire des mammites moins sévères (inflammation modérée) mais persistantes (Cucarella *et al.*, 2004).

Ces constats soulèvent la question de si ces caractéristiques reflètent une spécificité d'hôte ou plutôt une spécificité de tissu de ces souches dans la glande mammaire (van Leeuwen *et al.*, 2005). Une analyse par pulsotype des souches de *S. aureus* isolées de portage nasal et d'échantillons de lait chez différentes espèces ruminantes suggère une spécificité d'hôte plutôt que de tissu chez les souches qui colonisent les espèces ruminantes. Cela suggère également une transmission limitée de ces isolats entre les grands ruminants (bovins) et les petits (ovins-caprins) (Alves *et al.*, 2009).

IV. Question et stratégie de recherche

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

Parmi les questions relatives aux interactions hôte-pathogène, un des éléments remarquables dans les mammites à *S. aureus* est la diversité des tableaux cliniques associés à ce pathogène. Malgré quelques pistes déjà explorées (recherche de gènes associés à un type de mammite, production de certains facteurs de virulence, phénotypes particuliers) aucune n'a permis d'expliquer complètement ces différences de tableaux cliniques.

L'objectif de ce travail est d'identifier les facteurs staphylococciques impliqués dans la virulence et la chronicité des mammites. Les différences de tableaux cliniques et la capacité d'une souche à persister sont-elles dues à la présence/absence de certains gènes dans les souches de *S. aureus* ? A des altérations dans la séquence des gènes ? Au niveau d'expression de certains facteurs ou régulateurs de virulence ?

A. Chronicité de l'infection.

La souche N305 a été utilisée en expérimentation animale pour induire des mammites chez la vache. Il ressort de ces travaux que N305 provoque des mammites modérées et à caractère chronique (Bannerman *et al.*, 2004; Hensen *et al.*, 2000a). Après avoir séquencé le génome de cette souche (Bouchard *et al.*, 2012), nous avons donc cherché à identifier ce qui lui conférait cette chronicité en la caractérisant dans le détail, aux niveaux génomique, protéomique et phénotypique. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec la souche RF122, représentante du clone majeur associé aux mammites bovines au niveau mondial, dont le génome est disponible (Herron-Olson *et al.*, 2007) et qui provoque des mammites aiguës en modèle souris (Guinane *et al.*, 2008).

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Damien Bouchard dans le cadre d'un autre projet de thèse.

B. Degré de virulence.

Au cours d'une thèse précédente (Caroline Le Maréchal, 2007-2010), des travaux menés sur deux souches ovines de *S. aureus* ont permis de montrer que ces souches induisaient de façon reproductible des symptômes sévères (souche O11) ou modérés (O46) lors de mammites expérimentales chez la brebis. La caractérisation -omique de ces souches (génomique, transcriptomique, protéomique et séro-protéomique) a aussi permis d'identifier des gènes candidats, potentiellement impliqués dans le processus de pathogénèse et dans la sévérité des symptômes associés aux mammites à *S. aureus*. Il en ressort que O11 (mammites sévères) aurait un métabolisme d'acquisition et de détoxification du fer plus efficace, ainsi qu'une surexpression de protéases et toxines. O46, de son côté, se caractérise par la présence d'un phage supplémentaire (dont les gènes sont de fonction inconnue) et une copie tronquée d'un de ses facteurs sigma (*sigS*). C'est ce dernier gène que nous avons caractérisé afin de déterminer s'il intervenait ou non dans la différence de degré de virulence observée entre les souches O11 et O46.

Chapitre II

Identification de facteurs staphylococciques
impliqués dans la chronicité des mammites

Les souches de *S. aureus* isolées des infections intramammaires peuvent présenter des tableaux cliniques très différents. Plusieurs études *in vivo* ont permis d'établir expérimentalement une corrélation entre certaines caractéristiques de souches de *S. aureus* et un tableau clinique plus ou moins sévère. Dans ce contexte, deux souches de *S. aureus*, RF122 et Newbould 305 (N305), isolées de mammites bovines sont particulièrement bien caractérisées et constituent des modèles utilisés en infections expérimentales pour induire, respectivement, des mammites cliniques sévères et modérées (Herron-Olson *et al.*, 2007; Prasad & Newbould, 1968). Les mammites subcliniques sont souvent corrélées à une persistance intramammaire avec l'absence de signes cliniques entraînant à long terme une forme d'infection chronique (Almeida *et al.*, 1996, 1997; Atalla *et al.*, 2010; Ferens & Bohach, 2000).

Dans ce chapitre, nous avons utilisé ces deux souches RF122 et N305 comme représentatives de souches de degrés de virulence aigüe ou modérée et induisant respectivement des mammites aiguës ou chroniques modérées. Au départ de ce travail, alors que les deux souches avaient été utilisées dans des infections expérimentales, seule la souche RF122 avait été entièrement séquencée. Nous avons donc entamé un travail de caractérisation fine de la souche N305 pour pouvoir, par comparaison avec RF122, déterminer et comprendre quels sont les facteurs staphylococciques impliqués dans le degré de virulence et plus précisément quels sont les caractéristiques impliquées dans la chronicité des infections chez *S. aureus*. La stratégie suivie consiste en la réalisation d'une étude comparative aux niveaux génomique, phénotypique et protéomique.

Dans un premier temps, nous avons séquencé le génome de la souche Newbould 305, une souche isolée d'un cas de mammite clinique bovine en 1958, au Canada (Bouchard *et al.*, 2012).

Dans un second temps, nous avons comparé N305 à RF122 aux niveaux génomique, phénotypique et protéomique afin de caractériser au mieux la souche N305. D'après la littérature scientifique, la capacité à former des biofilms, la cytotoxicité et l'invasion tissulaire sont les critères prédominants pour la formation d'infections chroniques (Costerton *et al.*, 1999; Cucarella *et al.*, 2004; Fraunholz & Sinha, 2012; Heilmann, 2011; Le Maréchal *et al.*, 2011b; Otto, 2013b; Rumi *et al.*, 2013; Viana *et al.*, 2010). Ces trois critères ont été pris en compte dans nos comparaisons. Cela nous a permis d'accroître nos connaissances sur ces deux souches modèles, mais nous a surtout donné des premiers éléments de réponse quant aux facteurs intervenant dans la chronicité de l'infection observée avec la souche de *S. aureus* N305.

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Damien Bouchard, dont le sujet de thèse portait sur la compréhension des interactions entre *S. aureus*, la glande mammaire et son microbiote pour lutter contre les mammites à *S. aureus*.



Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a Strain Associated with Mild Bovine Mastitis

Damien Bouchard,^{a,b} Vincent Peton,^{a,b} Sintia Almeida,^{a,b,c} Caroline Le Maréchal,^{a,b,*} Anderson Miyoshi,^c Vasco Azevedo,^c Nadia Berkova,^{a,b} Lucie Rault,^{a,b} Patrice François,^d Jacques Schrenzel,^d Sergine Even,^{a,b} David Hernandez,^d and Yves Le Loir^{a,b}

INRA, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, Rennes, France^a; AGROCAMPUS OUEST, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, Rennes, France^b; UFMG, ICB, Departamento de Biologia Geral, Belo Horizonte, MG, Brazil^c; and Genomic Research Laboratory, University Hospitals of Geneva (HUG), Geneva, Switzerland^d

***Staphylococcus aureus* is a major etiological agent of mastitis in ruminants. We report here the genome sequence of bovine strain Newbould 305, isolated in the 1950s in a case of bovine mastitis and now used as a model strain able to reproducibly induce chronic mastitis in cows.**

Staphylococcus aureus is one of the main pathogens responsible for ruminant mastitis. Staphylococcal mastitis severity is highly variable, ranging from subclinical to gangrenous infection. *S. aureus* strains isolated from bovine or ovine/caprino hosts differ from human isolates, as documented previously (4). However, detailed genomic data regarding ruminant isolates are still scarce (4, 5, 8, 10, 11). There is thus a need for genomic data to better understand mastitis and identify bacterial factors responsible for the severity of the disease.

We previously characterized *S. aureus* bovine strain Newbould 305 (ATCC 29740) (12), which was isolated in 1958 from a cow in Orangeville, Ontario, Canada, with a clinical case of mastitis (4, 12). Newbould 305 reproducibly induces chronic mastitis with mild symptoms in cases of experimental cow mastitis (2, 6). It was previously shown to be clonally related to other bovine strains in ST115, whereas *S. aureus* RF122, another well-documented bovine strain (8) associated with severe mastitis symptoms, clustered in ST151 and was more closely related to ovine and caprine strains yet at a considerable genetic distance (4).

We sequenced the Newbould 305 genome using an Illumina HiSeq 2000 genome analyzer (Fasteris, Geneva, Switzerland). Base calling was performed using the HiSeq Control Soft v. 1.4.8 Pipeline 1.4.0 software. After barcode selection, 12.8 million pair reads of 100 bases in length were obtained. Sequence reads were *de novo* assembled using the Edena assembler (7), version 120430dev. Assembly resulted in 28 contigs (sum, 2.79 Mbp; N_{50} , 503 Kbp; maximum, 729 Kbp; minimum, 219 bp). One of the contigs (3,379 bases) was reported as a potential complete plasmid. A total of 2,755 predicted coding sequences (CDSs) were detected by using Glimmer3 (PubMed identification no. [PMID] 17237039). More than 55% of the genes were assigned to specific subsystem categories by RAST (1). Gene products were subjected to protein location prediction using the software package SurfG (3). The Newbould 305 sequence was compared to that of RF122 (ET3-1) using MUMmer (9). The overall Newbould 305 genome shows high similarity to that of RF122. The majority of the genes ($n = 2,518$) were common to both strains (E value, $1E^{-5}$; identity, 70%). A total of 48,371 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found in Newbould 305 compared to RF122. Among the SNPs located in CDSs, 10,470 were nonsynonymous and 1,690 corresponded to insertions or deletions. They were evenly distributed among the contigs and did not correlate with protein

location. Newbould 305 analysis revealed the presence of a putative prophage containing 45 CDSs (contig 5) and of two putative *S. aureus* pathogenicity islands (SaPI) containing 16 genes (contig 2) and 17 genes (contig 6). Most of these genes had homology to SaPI genes in *S. aureus* strains of bovine (RF122), ovine (O46), or human (MW2) origin. The contig that was reported as a potential plasmid was further confirmed by homology and was designated pNewbould305.

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

Nucleotide sequence accession numbers. This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession number **AKYW00000000**. The version described in this paper is the first version, AKYW01000000.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (NABAB project). Caroline Le Maréchal was the recipient of an INRA-ANSES Ph.D. grant. Sintia Almeida is the recipient of a CAPES-COEFUCB grant (project number 720/11). Damien Bouchard and Vincent Peton are recipients of a Ph.D. grant from the French Ministry of Research and from INRA and Region Bretagne, respectively.

We are thankful to P. Rainard (INRA Tours), who kindly provided the strain.

REFERENCES

1. Aziz RK, et al. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**:75.
2. Bannerman DD, et al. 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**:463–472.
3. Barinov A, et al. 2009. Prediction of surface exposed proteins in *Streptococcus pyogenes*, with a potential application to other Gram-positive bacteria. *Proteomics* **9**:61–73.
4. Ben Zakour NL, et al. 2008. Genome-wide analysis of ruminant Staph-

Received 2 July 2012 Accepted 29 August 2012

Address correspondence to Yves Le Loir, Yves.LeLoir@rennes.inra.fr.

*Present address: Caroline Le Maréchal, ANSES, Ploufragan, France.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.01188-12

- Staphylococcus aureus reveals diversification of the core genome. *J. Bacteriol.* **190**:6302 – 6317.
1. **Guinane CM, et al.** 2010. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol. Evol.* **2**:454 – 466.
 2. **Hensen SM, Pavicic MJ, Lohuis JA, de Hoog JA, Poutrel B.** 2000. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J. Dairy Sci.* **83**:1966 – 1975.
 3. **Hernandez D, Francois P, Farinelli L, Osteras M, Schrenzel J.** 2008. De novo bacterial genome sequencing: millions of very short reads assembled on a desktop computer. *Genome Res.* **18**:802 – 809.
 4. **Herron-Olson L, Fitzgerald JR, Musser JM, Kapur V.** 2007. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **2**:e1120. doi:10.1371/journal.pone.0001120.
 5. **Kurtz S, et al.** 2004. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol.* **5**:R12. doi:10.1186/gb-2004-5-2-r12.
 6. **Le Marechal C, et al.** 2011. Genome sequences of two *Staphylococcus aureus* ovine strains that induce severe (strain O11) and mild (strain O46) mastitis. *J. Bacteriol.* **193**:2353 – 2354.
 7. **Le Marechal C, et al.** 2011. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS One* **6**:e27354. doi:10.1371/journal.pone.0027354.
 8. **Prasad LB, Newbould FH.** 1968. Inoculation of the bovine teat duct with *Staph. aureus*: the relationship of teat duct length, milk yield and milking rate to development of intramammary infection. *Can. Vet. J.* **9**:107 – 115.

RESEARCH

Open Access

Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines

Vincent Peton^{1,2†}, Damien S Bouchard^{1,2†}, Sintia Almeida³, Lucie Rault^{1,2}, Hélène Falentin^{1,2}, Julien Jardin^{1,2}, Gw  na  l Jan^{1,2}, David Hernandez⁴, Patrice Fran  ois⁴, Jacques Schrenzel⁴, Vasco Azevedo³, Anderson Miyoshi³, Nadia Berkova^{1,2}, Sergine Even^{1,2} and Yves Le Loir^{1,2*}

Abstract

S. aureus is a major aetiological agent of ruminant mastitis worldwide. The chronic nature of *S. aureus* mastitis makes it difficult to cure and prone to resurgence. In order to identify the bacterial factors involved in this chronicity, Newbould 305 (N305), a strain that can reproducibly induce mild and chronic mastitis in an experimental setting, was characterized in depth. We employed genomic and proteomic techniques combined with phenotype characterization, in order to comprehensively analyse N305. The results were compared with data obtained on *S. aureus* RF122, a strain representative of the major clone involved in severe bovine mastitis worldwide. Five mobile genetic elements were identified in the N305 genome as carrying virulence factors which correlated with phenotypic features such as cytotoxicity, mammary epithelial cell invasion or host-adaptation. In particular, the presence and characteristics of surface exposed proteins correlated well with the greater adhesion and internalization capacities of N305 in bovine mammary epithelial cells. N305 also displayed less diversity of toxin genes but secreted larger quantities of these toxins, associated with a higher cytotoxicity potential. Our data are consistent with the invasiveness and host-adaptation features which contribute to the chronicity of *S. aureus* mastitis. Mobile genetic elements, exoproteins and surface exposed proteins constitute good targets for further research to explore the underlying mechanisms related to mastitis chronicity.

Introduction

Mastitis is an inflammation of the mammary gland, which commonly results from a bacterial infection. This infection first induces local benign symptoms and can rapidly evolve towards general and severe symptoms and result in systemic infection. Mastitis dramatically impacts animal health and milk quality, and causes considerable economic losses throughout the global milk production chain [1]. *Staphylococcus aureus* is a major aetiological agent of ruminant mastitis, which is often difficult to cure and is prone to resurgence and chronicity [2]. There is therefore a need to better understand the mechanisms underlying the chronicity phenomenon

in order to efficiently tackle and prevent *S. aureus* mastitis. Unlike *Escherichia coli* mastitis, the severity of which is mainly determined by host factors and not strain features, the severity of *S. aureus* mastitis mostly derives from inter-strain variations in terms of virulence potential [3,4]. Indeed, some *S. aureus* strains have reportedly induced chronic mastitis associated with mild symptoms, while others can cause severe mastitis.

Several hypotheses have been put forward to explain the chronicity of *S. aureus* mastitis, amongst which cytotoxicity, biofilm formation and tissue invasion have been the most widely investigated. *S. aureus* strains that secrete high levels of Panton-Valentine leukocidin and alpha toxin are associated with severe but not persistent mastitis [5-7]. By contrast, low-level cytotoxicity may facilitate persistence of the infection. Biofilm formation may also help *S. aureus* to resist antibiotic therapy and host defenses. The genetic loci *bab* and *ica*, which are

* Correspondence: yves.leloir@rennes.inra.fr

†Equal contributors

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

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

Full list of author information is available at the end of the article

58 involved in biofilm formation, are indeed associated with
59 strains that cause less severe but more persistent mas-
60 titis [8]. Finally, the ability to invade and survive within
61 mammary epithelial cells may also enable *S. aureus* to
62 evade the host immune response and the curative treat-
63 ments. All the evasive tactics that have been developed by
64 *S. aureus* probably influence the rate of cures achieved by
65 antibiotic therapies, and thus make *S. aureus* mastitis an
66 infection difficult to treat.

67 In contrast with the huge efforts dedicated to the devel-
68 opment of preventive and treatment strategies against *S.*
69 *aureus* mastitis, little is still known about the genomics of
70 *S. aureus* ruminant isolates. Compared to the hundreds of
71 fully sequenced human isolates, only one bovine strain
72 (RF122) and one ovine strain (ED133) have been fully se-
73 quenced, the former in 2007 [9] and the latter in 2010
74 [10]. We recently completed the set of publicly available
75 genomic data on ruminant isolates through the sequen-
76 cing and characterization of two ovine strains [3,11] and
77 the recent release of three bovine *S. aureus* S1 [12], M186
78 [13], Newbould 305 (N305) genomes [14].

79 N305, a strain isolated in 1958 from a clinical case of
80 cow mastitis in Orangeville, Ontario, Canada [15] has
81 been used as a model strain of *S. aureus* mastitis isolates
82 during numerous studies relative to vaccine development
83 [16,17], antibiotic treatments [18], in vitro characterization
84 [19] or in vivo experiments on bovine [20] and mouse
85 models [21]. In particular, N305 was shown to reproduc-
86 ibly induce mild and chronic mastitis in the context of
87 experimental infections [22,23]. But despite its widespread
88 use as a prototype strain for chronic infections during aca-
89 demic and industrial research projects, N305 remains
90 poorly characterized. A clearer understanding of how a
91 strain is able to induce chronic mastitis is crucial to find-
92 ing the Achilles heel in the pathogenicity of *S. aureus* and
93 then developing more effective control strategies. In a pre-
94 vious work, we showed that *S. aureus* N305 and RF122
95 displayed different capacities for adhesion and internaliza-
96 tion in bovine mammary epithelial cells [24]. To gain fur-
97 ther insight into the characteristics of *S. aureus* that
98 correlate with the hypotheses evoked to explain the chron-
99 icity of mastitis, we have now characterized N305 in depth
100 at the genome, proteome and phenotype levels, and com-
101 pared our findings with those obtained on *S. aureus*
102 RF122. The results revealed that several features of N305
103 may contribute to the development of chronic mastitis, in-
104 cluding mobile genetic elements (MGEs) and the types
105 and production levels of toxins and surface proteins.

106 Materials and methods

107 Bacterial strains, growth conditions

108 *Staphylococcus aureus* Newbould 305 (hereinafter re-
109 ferred to as N305) [15] and RF122 [9] were isolated from

110 cases of bovine mastitis. These strains are well character- 110
111 ized and can reproducibly induce severe mastitis (RF122; 111
112 [25]; JR. Fitzgerald, University of Edinburgh, personal 112
113 communication) or mild mastitis (N305) under experi- 113
114 mental conditions [9,15]. N305 was kindly provided by Dr 114
115 F. Gilbert (INRA Tours) and received as a lyophilized vial 115
116 provided by D.S. Postle (College of Veterinary Medicine, 116
117 Cornell University, Ithaca, New York) in 1975 and pre- 117
118 pared from the original Newbould 305 isolate supplied by 118
119 F.H.S. Newbould. One can therefore consider it is close to 119
120 the original isolate (F. Gilbert and P. Rainard, INRA Tours, 120
121 personal communication). Subcultures prior to invasion 121
122 assays were performed overnight as follows. *S. aureus* 122
123 strains were grown in brain heart infusion medium (BHI; 123
124 Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) at 37 °C 124
125 under agitation (180 rpm). The cultures were washed 125
126 once with phosphate-buffered saline (PBS) and sus- 126
127 pended at different concentrations in Dulbecco's modi- 127
128 fied Eagle's medium (DMEM; pH 7.4; D. Dutscher, 128
129 Brumath, France). Bacterial concentrations in subcul- 129
130 tures were estimated by spectrophotometric measure- 130
131 ments at 600 nm (OD₆₀₀). They were further confirmed 131
132 using a micromethod, as previously described [26]. The 132
133 resulting *S. aureus* populations (in CFU/mL) were de- 133
134 termined on mannitol salt agar (MSA; D. Dutscher, 134
135 Brumath, France) after 24 h of incubation at 37 °C. 135

136 Genome comparison of RF122 and N305

137 The N305 strain was fully sequenced using the Illumina 137
138 technique. The whole genome sequencing and assembly 138
139 strategies are described in Bouchard et al. [14]. The 139
140 N305 genome sequence was analysed using SurfG+ to 140
141 predict protein locations (potentially surface exposed 141
142 (PSE), secreted, membrane and cytoplasmic proteins) 142
143 [27], and PIPS, a software suite designed for the predic- 143
144 tion of pathogenicity islands which, in an integrative 144
145 manner, utilizes multiple features (such as atypical G + C 145
146 content, codon usage deviation, virulence factors, hypo- 146
147 theoretical proteins, transposases, flanking tRNA and the 147
148 absence of this structure in non-pathogenic organisms) 148
149 to detect pathogenicity islands [28]. For the PIPS ana- 149
150 lysis, the genome sequences of the strains *Staphylococ-* 150
151 *cus xylosus* C2a (kindly provided by R. Talon and S. 151
152 Leroy, INRA Clermont-Ferrand) and *Staphylococcus car-* 152
153 *nosus* TM300 [29] were used as references. The assign- 153
154 ment of protein function to the coding sequences 154
155 (CDSs) of the two genomes (N305 and RF122) was per- 155
156 formed manually using the results from BLASTP and 156
157 the COG (Clusters of Orthologous Groups) [30]. 157

158 These genome sequences are available at DDBJ/EMBL/
159 GenBank under the accession numbers AKYW000000000
160 (N305) and NC_007622 (RF122). 160

161 Phenotype characterization

162 Biofilm formation

163 The two *S. aureus* strains were assayed for biofilm formation using crystal violet staining. The bacteria were subcultured twice in BHI before adjusting the OD_{600nm} to 0.004 (corresponding approximately to 10⁶ CFU/mL) in BHI containing 4 g/L glucose (hereinafter named BHIglu), in order to promote biofilm formation. Growth was performed in 96-well microtiter plates with 200 µL of bacterial suspension per well. BHIglu alone was used as a negative control. The biofilm staining assays were performed following an incubation period of 24 h at 37 °C. The microtiter plates were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), fixed for 20 min at 80 °C and stained for 10 min with 1% (w/v) crystal violet solution, freshly diluted 10-fold in distilled water. The plates were then washed twice with distilled water and allowed to dry at room temperature. The crystal violet was dissolved in 200 µL of acetic acid solution (33% in distilled water) for 10 min under gentle agitation. Optical density was measured at 595 nm using a Spectramax spectrometer. The *S. aureus* strain MW2 was used as an internal normalization standard and biofilm formation by N305 and RF122 was expressed as a ratio OD_{N305}/OD_{MW2}, and OD_{RF122}/OD_{MW2}.

186 Cytotoxicity

187 To assess their cytotoxic effect, the viability of MAC-T cells was measured during their incubation with a culture supernatant at 24 h post-infection using methylthiazolyl-diphenyltetrazolium bromide (MTT), as previously described [31]. Briefly, the strains were pre-cultured in RPMI 1640 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) supplemented with 2.2'-dipyridyl (200 mM, Sigma) and then diluted 1000-fold in fresh RPMI + deferoxamine mesylate (152 mM, Sigma). These iron-depleted conditions were previously shown to mimic the mastitis context and to increase the expression of virulence factors [32]. *S. aureus* strains were grown without agitation at 37 °C under microaerophilic conditions, in 50 mL tubes. After 24 h of growth, the cultures were centrifuged and the supernatants were filtered on 0.22 µm units before being diluted in fresh DMEM at a ratio of 1:1. The cells were incubated for 24 h in this medium and then 0.5 mg/mL MTT were added for 4 h at 37 °C in 5% CO₂. The medium was removed and isopropanol was added for 30 min under shaking at 350 rpm. Absorbance was read at 570 nm with a background at 690 nm. Cells treated with PBS diluted in DMEM (ratio 1:1) were used as a negative control (100% viability). Relative viability was expressed versus PBS-treated cells.

210 Proteolysis

211 Proteolysis capacity of *S. aureus* strains was assessed using a simple plate assay to visualize milk protein degradation.

Briefly, culture supernatants were prepared as described in cytotoxicity assays, filtered on 0.22 µm units, and concentrated 10x in a Speed Vac Concentrator (Savant, Thermo Scientific). Fifty µL of these supernatants were deposited in wells in PCA agar medium supplemented with 5% of skimmed milk. A translucent halo around the wells indicates the casein lysis.

Plasma coagulation

To confirm the presence in N305 of a bovine variant of von Willebrand binding protein, plasma samples from cows and goats were prepared from blood collected in EDTA-coated tubes (blood samples kindly provided by Jacques Lassalas, UMR1348 PEGASE, INRA Agrocampus Ouest, Rennes, France). Rabbit plasma (Sigma) was used as a positive control for coagulase activity. A volume corresponding to 10⁸ CFU of N305 or RF122 (overnight culture on BHI) was pelleted, washed once in PBS and re-suspended in 300 µL serum. Coagulation was checked after 4 h of incubation at 37 °C by inverting the tubes.

2-Dimensional gel electrophoresis for the total proteome and secretome of RF122 and N305

For 2D-PAGE, protein samples were prepared as described previously, with some minor changes [3]. Briefly, *S. aureus* strains were pre-cultured in RPMI 1640 supplemented with 2.2'-dipyridyl (200 µM) to chelate extracellular iron and consequently reduce intracellular iron stocks. The cultures were then diluted 1:1000 in fresh RPMI 1640 with deferoxamine (152 µM). *S. aureus* strains were grown without agitation at 37 °C under microaerophilic conditions, in 500 mL flasks for the supernatant fraction or in 50 mL tubes for the total fraction and shaving experiments. These conditions were previously shown to best mimic growth in vivo during mastitis [32]. The cultures were centrifuged at 7000 g for 10 min and the supernatants were filtered through a 0.22 µm filter unit. Total cell lysate proteins were obtained from bacterial pellets, as previously described [32]. The supernatant proteins were precipitated with 10% TCA at 4 °C overnight. The samples were centrifuged at 9000 g for 1 h at 4 °C. Protein pellets were washed three times with 96% ethanol and then dried. Proteins were solubilized in urea 8 M. The protein concentration was determined using a Bradford test (Sigma). A constant amount of proteins was used for each acrylamide gel so as to enable determination of a relative abundance of a given protein with respect to the total of secreted proteins. Three biological replicates were used for each analysis.

To purify the protein extracts, a 2D Clean Up kit (GE Healthcare, Orsay, France) was used according to the manufacturer's instructions, and then the samples were treated as described previously [3]. Images of the gels

265 were analysed using SameSpot software (TotalLab Ltd.,
 266 Proteomics consult, Belgium), as previously described
 267 [1,32,33]. Spot volumes were determined and normalized
 268 with regard to the total volume of the gel. After this
 269 normalization, spots with a minimal fold change of 2
 270 and an ANOVA e-value lower than 0.005 were selected
 271 for mass spectrometry analysis. The gel pieces were
 272 processed exactly as described previously [3,34]. A shaving
 273 technique was used to analyse the PSE proteins. *S.*
 274 *aureus* cultures were centrifuged at 7000 g for 10 min
 275 and the total cell and supernatant fractions were treated
 276 separately. The pellets were washed twice with PBS. The
 277 bacteria were re-suspended in PBS with sufficient 5 mM
 278 DTT to reach 20 units of OD_{600nm}. Five hundred µL of
 279 this suspension were incubated with 20 µg trypsin for
 280 1 h at 37 °C under agitation (180 rpm) and then centri-
 281 fuge at 10 000 g. The supernatants were filtered
 282 through a 0.22 µm filter and incubated overnight with
 283 1 µg trypsin at 37 °C under agitation. Trypsin digestion
 284 was stopped by adding 15 µL 5% TFA. The controls did
 285 not display any significant loss of viability from the
 286 counts of CFUs before and after shaving.

287 Identification of proteins

288 Proteins were identified using NanoLC-ESI-MS/MS as
 289 described by Le Maréchal et al. [1] with some minor
 290 modifications. Peptides were identified using the X! Tan-
 291 dem software. The database used for protein identifica-
 292 tion was composed of predicted proteins based on the
 293 RF122 and N305 genome sequences [9,14], together with
 294 protein data on *Staphylococcus aureus* (taxon 1280) in
 295 the UniProtKB database [35], in order to obtain a statisti-
 296 cally significant identification. To achieve valid identifi-
 297 cation with a high degree of confidence, each protein
 298 must have a minimum of two peptides corresponding to
 299 a *p*-value lower than 0.05. An auto-validation of peptides
 300 from the X!Tandem search results was performed using
 301 X!TandemPipeline [36]. Prediction of the sub-cellular
 302 localization of proteins was achieved using PSORTb
 303 3.0.2 software [37]. Validated and identified proteins
 304 were then sorted by Clusters of Orthologous Groups
 305 (COGs) using EggNOG 3.0 software [38].

306 Regarding proteins identified by trypsin shaving, only
 307 those identified with at least two peptides in one strain
 308 and less than two peptides in the other strain were con-
 309 sidered as more abundant in the first strain.

310 Statistical analysis

311 All experiments were carried out in triplicates (biological
 312 repeats). The differences in biofilm formation and cyto-
 313 toxicity assays were assessed using paired Student's *t*
 314 tests considering a *P* value lower than 0.05. In proteome
 315 analyses, proteins were considered as over expressed in
 316 total proteome or exoproteome when ANOVA e-value

given by SameSpot software was lower than 0.005 and 317
 the minimal fold change was 2. 318

319 Results

320 Comparison of the gene contents of *S. aureus* RF122 and 321 Newbould 305

322 The general features of the N305 genome are summa-
 323 rized in Table 1, which also includes the general features T1
 324 of RF122 [9]. Predicted proteins were functionally cate-
 325 gorized using the COGs database. The COGs distribu-
 326 tions were similar in the two genomes (see Additional
 327 file 1). The majority of the genes (*n* = 2518) were com-
 328 mon to both strains. The core genome covers up to
 329 91.5% and 94.5% of the CDSs of N305 and RF122, re-
 330 spectively. However, a comparison of the sequences of
 331 N305 and RF122 revealed some differences in their over-
 332 all genome content. A total of 48 371 single nucleotide
 333 polymorphisms (SNPs) were found in N305 when com-
 334 pared to RF122. Among the SNPs located in the CDSs,
 335 10 470 were non-synonymous and 1690 corresponded to
 336 insertions or deletions. In order to better understand the
 337 genomic features responsible for the phenotypic differ-
 338 ences between N305 and RF122, we further analysed the
 339 gene content of *S. aureus* N305 in terms of putative
 340 MGE, which appeared to be the principal source of vari-
 341 ability between the two genomes.

342 Analysis of the N305 genome using the PIPS pipeline
 343 [28] predicted the presence of five putative *S. aureus*
 344 Pathogenicity Islands (SaPIs). SaPI-N305_1 (contig 1)
 345 contained 35 predicted CDSs markedly similar to the
 346 CDSs of vSaβ already described in RF122 and *S. aureus*
 347 MW2 (Figure 1a). SaPI-N305_2 (contig 1) contained 15 F1
 348 CDSs markedly similar to a SaPIbov found in strain D30
 349 (isolated in the context of human nasal carriage) [39]
 350 (Figure 1b). SaPI-N305_3 and SaPI-N305_4 were two ad-
 351 jacent putative SaPIs (contig 2) containing 19 and 28
 352 CDSs, respectively. SaPI-N305_3 shared marked similarity

Table 1 General features of Newbould 305 and t1:1
 comparison to RF122 genome t1:2

CORE N305 x RF122	2518 (e-value = 1 ^{e-5} /identity > 70%)		t1:3
Pseudogenes	6	76	t1:4
Protein coding genes with COGs	2052 (70.53%)	1903 (70.74%)	t1:5
rRNA genes	5S rRNA = 7	5S rRNA = 6	t1:6
	16S rRNA = 6	16S rRNA = 5	t1:7
	23S rRNA = 7	23S rRNA = 5	t1:8
tRNA genes	56	64	t1:9

353 with SaPIbov4 and SaPIbov5, which both carry a bovine
 354 variant of von Willebrand factor binding protein (*vwb*^{Sbo5})
 355 (Figure 1c). SaPI-N305_4 shared similarity with SaPI_N2,
 356 which was first described in the human *S. aureus* strain,
 357 N315 [40] (Figure 1d). SaPI-N305_5 (contig 6) contained
 358 35 CDSs, 17 of which were found to be very similar to
 359 SaPI2. PIPS analysis also revealed the presence of two pu-
 360 tative bacteriophages, on contig 5, containing 34 CDSs
 361 and 19 CDSs with homology to Bacteriophage 80alpha
 362 and bacteriophage 187, respectively.

363 We further analysed the N305 genome while focusing
 364 on genes suspected of being implicated in the chronicity
 365 of infections, i.e. genes reportedly involved in biofilm
 366 formation, cytotoxicity and invasiveness (Table 2). This
 367 revealed differences between the RF122 and N305
 368 strains. Some genes were only found in N305, encoding
 369 proteins such as the delta-hemolysin (Hld), the bovine

variant of the von Willebrand binding protein (*vWb*^{Sbo5}),
 fibronectin binding protein B (FnbB), *S. aureus* surface
 protein G (SasG) and 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate
 acyltransferase (PlsC). These factors are involved in the
 colonization of host tissue (*vWb*^{Sbo5}, FnbB, SasG, and
 PlsC) or cytotoxic effects (Hld). A cluster of *set* genes
 (staphylococcal enterotoxins) was also found in SaPI-
 N305_4 (Figure 1d and Table 2). None of the strains
 possess the *bap* gene, which encodes a protein impli-
 cated in biofilm synthesis in *S. aureus*. However, they
 both have the *icaADBC* operon and the *icaR* regulator.
 In terms of virulence regulation, the accessory gene
 regulator (*agr* system) of N305 is of type I (while RF122
 is *agr*II), as shown by the genome sequence analysis.

Some genes were only found in RF122, encoding for
 leukocidin M (LukM) and Panton-Valentin leukocidin F
 (LukF^{PV}), toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1),

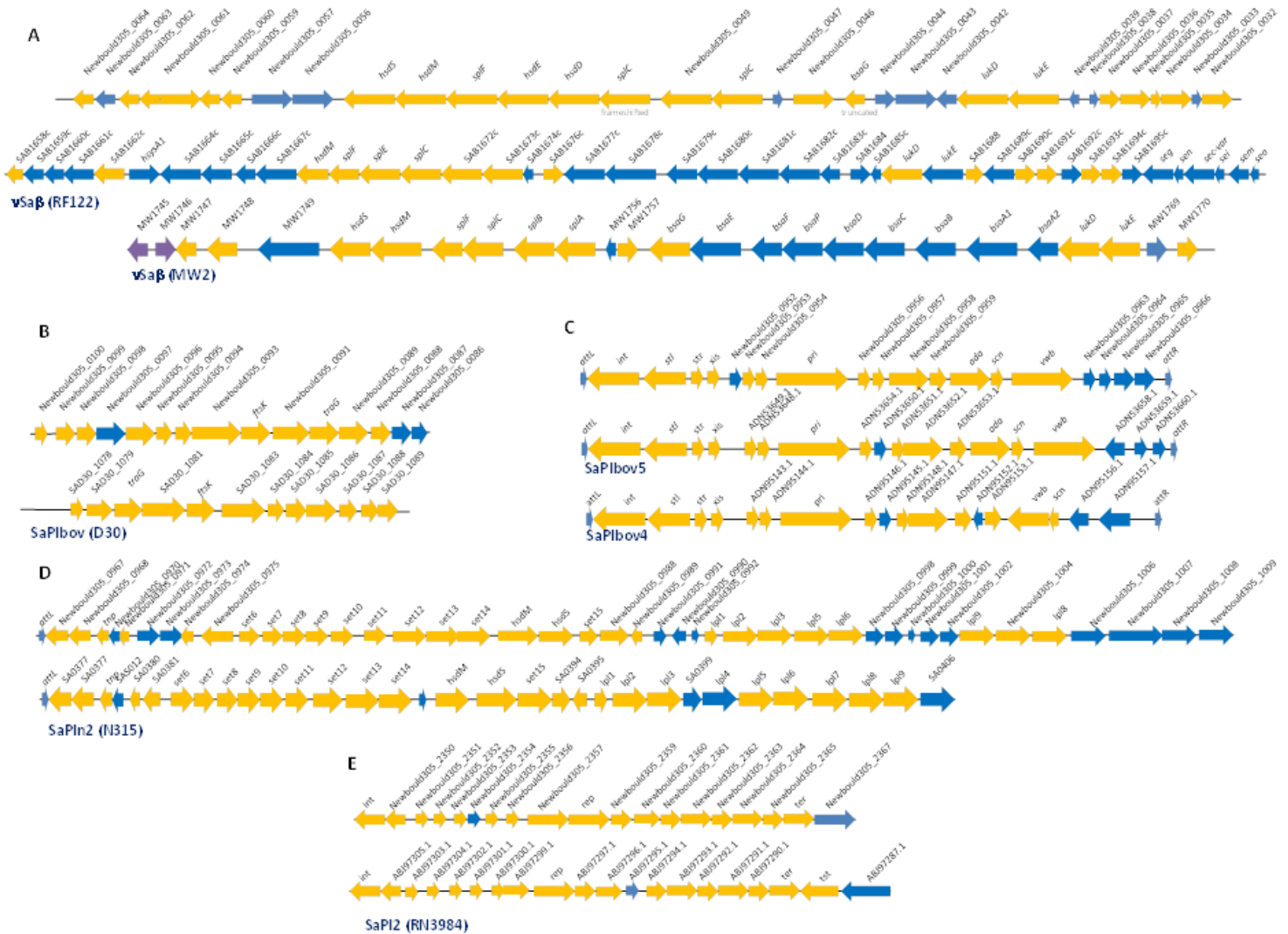


Figure 1 Putative SaPIs found in the Newbould 305 genome. Putative SaPIs of N305 are presented in the upper lines, and compared with the most closely related SaPI found in public databases. a. Comparison of the pathogenicity island SaPIN305_1 with vSaβ in the RF122 and MW2 strains. b. Comparison of the pathogenicity island SaPIN305_2 with SaPIbov found in the *S. aureus* D30 strain [39]. c. Comparison of the pathogenicity island SaPIN305_3 with SaPIbov5 and SaPIbov4. d. Comparison of the pathogenicity island SaPIN305_4 with SaPI_N2 found in the *S. aureus* strain N315 [40]. e. Comparison of the pathogenicity island SaPIN305_5 with SaPI2 found in *S. aureus* RN3984 [41]. Arrows represent open reading frames and their orientations. Orange: common genes shared with the most closely related SaPI represented on the Figure; blue: additional or different

t2:1 Table 2 Presence (+) or absence (-) of virulence-associated genes in RF122 and Newbould 305

t2:2	Gene name	Function	NB305	RF122
t2:3	Biofilm formation	Function	NB305	RF122
t2:4	<i>ica</i> operon	Biofilm synthesis <i>ica</i> operon	+	+
t2:5	<i>bap</i>	Biofilm associated protein	-	-
t2:6	<i>aap</i>	Accumulation-associated protein (associated to biofilm formation)	+*	-
t2:7	<i>ypfP</i> , <i>ItaA</i> , <i>S</i> , <i>tag</i> and <i>dlt</i> operons	Teichoic and Lipoteichoic acid synthesis	+	+
t2:8	<i>cap</i> operon	Capsular polysaccharide biosynthesis	+	+
t2:9	Secreted toxins	Function	NB305	RF122
t2:10	<i>lukE</i>	Leukocidin LukE precursor	+	+
t2:11	<i>lukD</i>	Leukocidin LukD precursor	+	+
t2:12	<i>lukM</i>	Leukocidin chain lukM precursor	-	+
t2:13	<i>lukF</i> ^{PV}	Panton-Valentine leukocidin LukF ^{PV} chain	-	+
t2:14	<i>lukF</i>	Leukocidin F subunit	+	+
t2:15	<i>lukS</i>	leukocidin/hemolysin toxin subunit S	+	+
t2:16	<i>hla</i>	Alpha-hemolysin precursor	+	+
t2:17	<i>hly</i>	Beta-hemolysin precursor	+	+
t2:18	<i>hlg</i> (subunits A, B, C)	Gamma-hemolysin component	+	+
t2:19	<i>hld</i>	Delta-hemolysin	+	-
t2:20	<i>atl</i>	Bifunctional autolysin precursor	+	+
t2:21	<i>tst</i>	Toxic shock syndrome toxin 1	-	+
t2:22	<i>eta</i>	Exfoliative A	+	+
t2:23	<i>etb</i>	Exfoliative B	-	+
t2:24	<i>sea</i>	Staphylococcal enterotoxin A	+	+
t2:25	<i>sec bov</i>	Bovine variant of Staphylococcal enterotoxin C	-	+
t2:26	<i>seg</i>	Staphylococcal enterotoxin G	-	+
t2:27	<i>sei</i>	Staphylococcal enterotoxin I	-	+
t2:28	<i>sel</i>	Staphylococcal enterotoxin L	-	+
t2:29	<i>sen</i>	Staphylococcal enterotoxin N	-	+
t2:30	<i>seo</i>	Staphylococcal enterotoxin O	-	+
t2:31	Colonisation factors	Function	NB305	RF122
t2:32	<i>vwb</i>	Secreted von Willebrand factor-binding protein (Wbp) precursor	+	+
t2:33	<i>vwb</i> ^{Sbo5}	SaPI-encoded variant of Wbp carried by SaPIbov5	+	-
t2:34	<i>clfA</i>	Clumping factor A	+	+
t2:35	<i>clfB</i>	Clumping factor B	+	+
t2:36	<i>fnbA</i>	Fibronectin binding protein A	+	+
t2:37	<i>fnbB</i>	Fibronectin binding protein B	+	-
t2:38	<i>stl</i>	Transcriptional Repressor SaPI	+	+
t2:39	<i>eap</i>	Extracellular adherence protein	+	+
t2:40	<i>sasG</i>	<i>S. aureus</i> surface protein G	+	-
t2:41	<i>plsC</i>	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	+	-
t2:42	<i>sak</i>	Staphylokinase	-	-
t2:43	<i>spa</i>	Immunoglobulin G binding protein A precursor	+	+

t2:44 *Newbould 305_2513 possess a CWA domain and is 67% similar to *aap* gene of *S. epidermidis* (GeneBank accession number YP_189945).

387 exfoliative toxin B (Etb) and the enterotoxins Cbov/G/I/
388 L/N/O (SECbov, SEG, SEI, SEL, SEN, SEO). All these
389 proteins are secreted toxins.

390 Particular focus on microbial surface components rec-
391 ognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMMs) genes
392 revealed that their number was higher in N305 than in
393 RF122. Although both strains carry the gene coding for
394 fibronectin-binding protein A (*fnbA*), we found that the
395 *fnbA* sequence in N305 had two additional fibronectin-
396 binding domains when compared to that of RF122
F2 397 (Figure 2).

398 The same biofilm formation but broader coagulase 399 activity spectrum and higher cytotoxic capacities for 400 N305 during in vitro assays

401 Based on the differences in gene content revealed by se-
402 quence analysis, phenotypic differences could be ex-
403 pected in terms of biofilm formation, coagulase activity,
404 cytotoxicity and invasive capacities. These four proper-
405 ties were tested in vitro at the phenotype level (see
406 Materials and methods for details). In line with the ab-
407 sence of differences in terms of the content of genes in-
408 volved in biofilm formation, the two strains did not
409 display any significant differences in phenotype. Indeed,
410 RF122 and N305 revealed the same ability to form a bio-
411 film on an abiotic surface, as determined by Crystal vio-
412 let staining on a plastic surface (data not shown). By
413 contrast, with respect to coagulase activity, the presence
414 of *vwb*^{Sbo5} (Newbould 305_0962) in the N305 genome
415 (Figure 1c), whose product was also found in the N305
416 surface exposed protein (Additional file 2), was clearly
417 associated with an increased range of coagulase activity.
418 N305 indeed clotted rabbit, goat and bovine plasma,
F3 419 whereas RF122 only clotted rabbit plasma (Figure 3a).
420 Furthermore, N305 displayed greater cytotoxicity on
421 MAC-T cells than RF122 after co-incubation with their
422 respective supernatants. The viability of cells incubated
423 with the N305 supernatant was 89% lower than under
424 control conditions, whereas the viability of cells incubated
425 with the RF122 supernatant was 36% lower (Figure 3b).

N305 supernatant also presented a higher ability to hydro- 426
lyse caseins as shown by the translucent halo around the 427
well of N305 deposit (Additional file 3). 428

429 Comprehensive analysis of the proteome of *S. aureus*

430 Newbould 305

431 A comprehensive analysis of the N305 proteome (total 431
cell, surface and secreted proteins) was carried out on 432
cultures grown under conditions mimicking the context 433
of mastitis, as described previously [32]. The N305 434
proteome was compared with that of RF122. A total of 435
215 proteins were categorized as being differentially pro- 436
duced in N305 or RF122, and were further identified. 437
Sixty-eight proteins (31.6%) were identified as being over- 438
expressed by RF122, and 147 (68.4%) by N305. In more 439
detail, a total of 33 proteins (15.4% of total proteins) were 440
identified in the culture supernatant (Additional file 4), 11 441
proteins being more abundant in RF122 and 22 in N305. 442
Supernatant gels (Figure 4a and b) displayed the most fla- 443 F4
grant proteomic differences between N305 and RF122. In 444
the total cell lysate, 36 proteins (16.7% of total proteins) 445
were identified (Additional file 5), ten proteins being more 446
abundant in RF122 and 26 in N305. Trypsin shaving en- 447
abled the identification of up to 409 proteins because of 448
the sensitivity of this method, and included 146 proteins 449
that were relatively more abundant in one strain (67.9% of 450
total proteins) (Additional file 2), with 47 proteins more 451
abundant in RF122 and 99 in N305. 452

453 The proteins were classified into COGs as a function of 453
their annotation. Most of the secreted and PSE pro- 454
teins identified here belonged to cellular processes and 455
signalling categories or were poorly-characterized pro- 456
teins. Among these, a number of exoproteases were 457
found to be common to both strains (Additional files 4 458
and 2), while some exoproteases such as Spl proteases 459
(SaPI-N305_1), were also specifically found in N305. 460
Virulence factors (classified in the category of poorly- 461
characterized proteins) were also found to be specific to 462
N305. These included haemolysins and leukotoxins (alpha- 463
and gamma-haemolysins, LukS/F) and proteins involved in 464

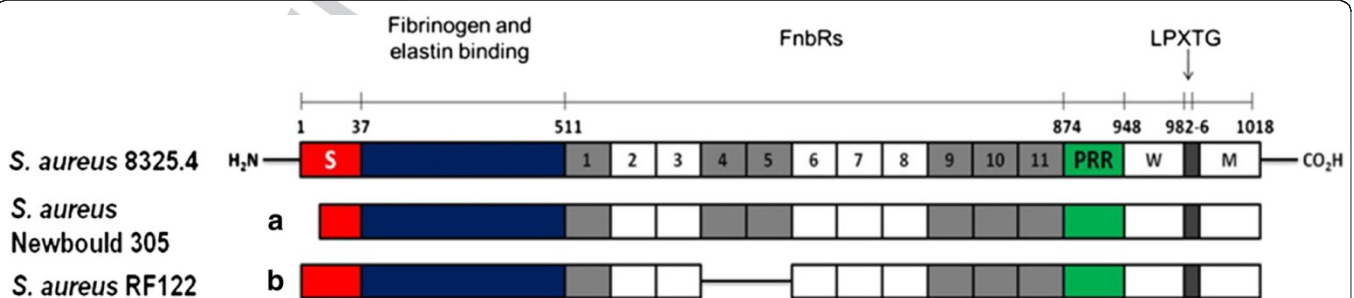


Figure 2 Comparison of the FnbA found in RF122 and N305 with that of *S. aureus* 8325.4. The FnbA in *S. aureus* 8325.4 (SWISS-Prot P14738) contains 11 Fn-binding sites. FnbA from *S. aureus* Newbould 305 (a) and RF122 (b) showing the approximate positions of the predicted fibronectin binding regions (FbnRs). High-affinity FbnRs are shaded. Signal peptide (S) in red, proline-rich repeats (PRR) in green; cell wall-spanning sequence (W) in white; membrane-spanning region (M) in white.

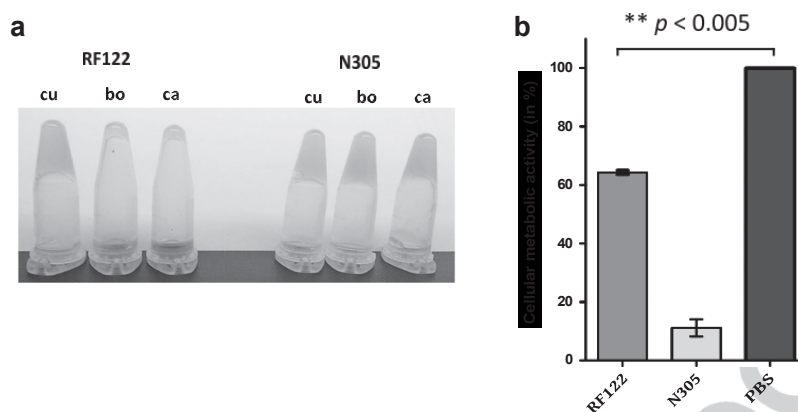


Figure 3 Phenotypic characterization of *S. aureus* N305 and comparison with RF122. a. Coagulase activity of RF122 and N305. A 10^8 CFU aliquot was prepared from an overnight culture of each strain, washed and re-suspended in rabbit (cu), bovine (bo) or goat (ca) plasma. After a 4-h incubation at 37 °C, the level of coagulation of observed by tilting the tubes. b. Cytotoxic effects of *S. aureus* RF122 and N305 supernatants on MAC-T cells. *S. aureus* strains were grown for 24 h in RPMI with 50 mM deferoxamine. Supernatants (or PBS for the control condition) were mixed in DMEM at a ratio of 1:1 and incubated with MAC-T cells. Cytotoxicity was assessed using the MTT test and relative viability was expressed with regard to PBS-treated cells. Each experiment was performed in triplicate, and differences between the groups were compared using Student's t test. ** $P < 0.005$.

465 adhesion to host tissues (e.g. Newbould305_1324, encoding
466 an extracellular matrix and plasma binding protein) and in
467 evasion of the host immune response (e.g. Spa, vWbp^{Sbo5}).
468 By contrast, RF122 was found to produce leukotoxins (e.g.
469 LukM/F' and LukE) and enterotoxins (e.g. bovine variant of
470 the staphylococcal enterotoxin C *sec-bov*) as well as iron
471 metabolism proteins (e.g. IsdB and D). As expected, total
472 proteins (as well as the surface exposed proteins identified
473 by trypsin shaving) comprised many more proteins than
474 those grouped in the Metabolism categories.

475 Discussion

476 The outcomes of *S. aureus* mastitis can vary markedly,
477 and are mostly linked to strain-dependent features [3].
478 By contrast with mastitis induced by other pathogens,
479 one of the most problematic traits of *S. aureus* mastitis
480 is its low cure rate and its propensity to chronicity. Here,
481 we have finely characterized N305 [15], an *S. aureus*
482 strain that reproducibly induces mild and chronic mas-
483 titis in an experimental cow model, and compared it to
484 RF122, a well-documented and highly virulent *S. aureus*
485 strain [25] (J. Ross Fitzgerald, personal communication)
486 which is representative of a common clone which fre-
487 quently causes bovine mastitis [9,15]. These two strains
488 belong to distinct clonal complexes (CC97/ST115 for
489 N305, and CC133/ST151 for RF122), with both strains
490 clustering in groups that include several other bovine
491 strains and strains of human or non-specified origin. Al-
492 though RF122 has been described as an archetypal bo-
493 vine strain, it is closely related to human strains. By
494 contrast, N305 is strongly associated with a bovine host
495 [42,43].

496 Despite their phylogenetic divergence, a comparison of
497 their genome sequences revealed some strong similarities,

with a core genome (set of genes common to N305 and
RF122) comprising more than 91% of their gene content
(Table 1). However, certain genomic differences were
found in their pseudogene contents. The RF122 genome
reportedly contains 70 pseudogenes [9], whereas only six
pseudogenes are predicted in the N305 genome. Signifi-
cant differences were also found regarding the genes en-
coding toxins and surface proteins involved in host
invasion. These latter genomic features were confirmed by
phenotypic and proteomic characterizations.

In terms of gene regulation, we found that N305 is
agrI, while RF122 is *agrII*. The *agr* system plays a central
role in *S. aureus* virulence expression. Interestingly, *agrI*
bovine strains were recently shown associated to persist-
ence, with high intracellular survival and probably a bet-
ter adaptation to an intracellular niche, whereas *agrII*
was associated with a low intracellular survival and a
probable extracellular niche [44].

An inventory of potential mastitis-associated functions in N305 reflects host adaptation and propensity to chronicity

A comparison between the N305 and RF122 genomes
revealed differences regarding the genes encoding PSE
and secreted proteins. The complete *spl* operon (*splA*, *B*,
C, *D*, *E*, *F*; although *splC* is pseudogenized) was found in
N305 whereas only *splB*, *splC*, *splE*, and *splF* were found
in the RF122 genome sequence. In addition, a series of four
serine proteases, including SplB (Newbould 305_0049),
SplE, D, and F, encoded by the *spl* operon, was found to be
relatively more abundant in the N305 supernatant (Table 3).
In agreement, we observed a higher ability of N305 to de-
grade caseins, which is associated to SplA, SplB and SplC
in *S. aureus* [45,46]. Other differences were found in toxin

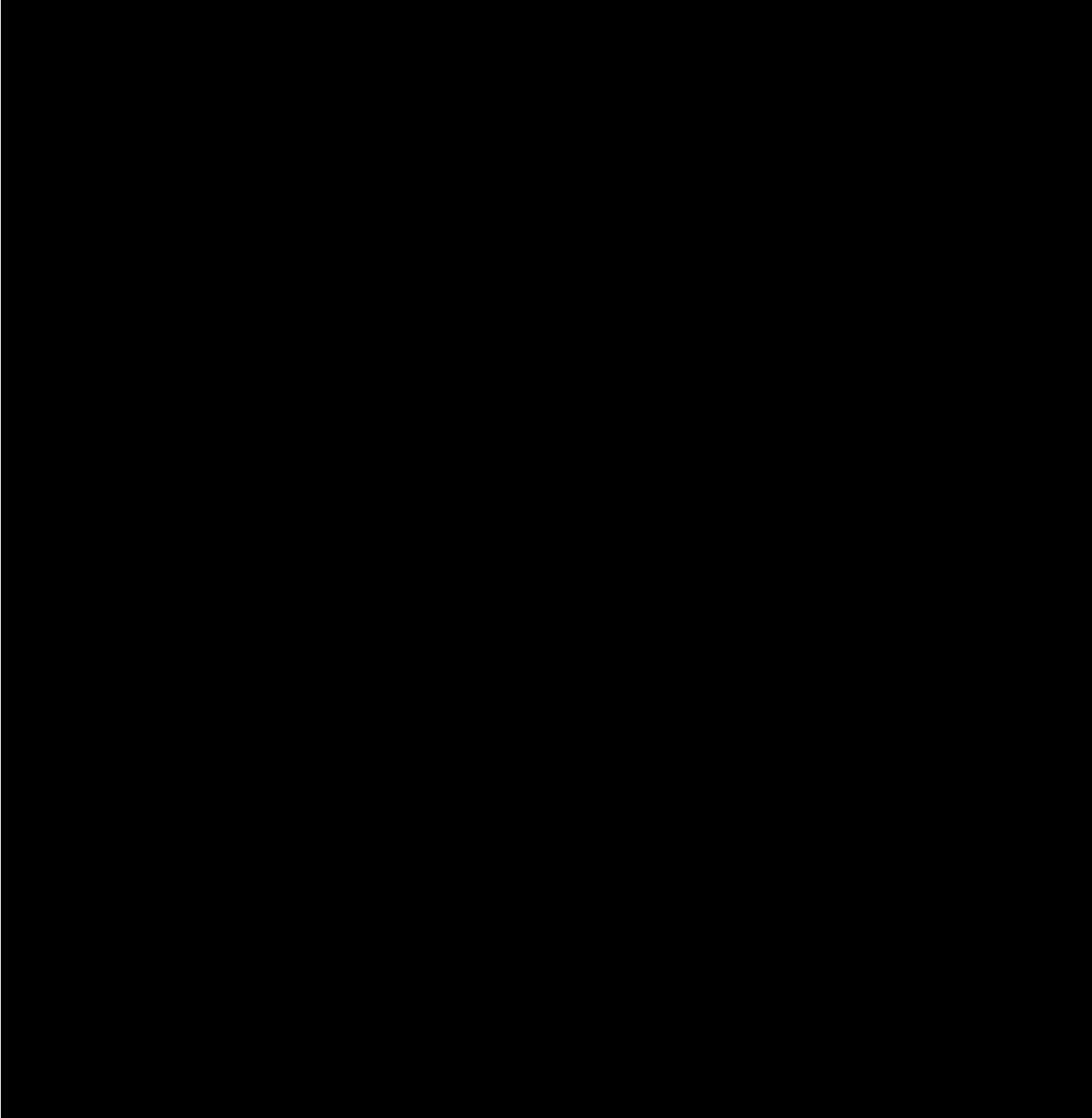


Figure 4 2D PAGE of *S. aureus* RF122 and N305 protein extracts. Supernatants (a and b) and total proteomes (c and d) were harvested during the stationary phase. Supernatant proteins were precipitated with 10% trichloroacetic acid and washed with high-grade ethanol. Samples were purified using the 2D Clean Up kit (GE Healthcare) then separated by isoelectrofocalization on pH4-7 strips (total proteome) or pH3-11NL strips (supernatant) for the first dimension, and by 12% polyacrylamide gels for the second dimension. The gels were stained with Biosafe (Biorad) Coomassie blue, according to the manufacturer's instructions. Arrows indicate spots that were over-expressed.

531 gene contents, which correlated with differences in the
 532 composition of MGEs. RF122, which is associated with se-
 533 vere mastitis, was found to be well-equipped with genes
 534 encoding enterotoxins, haemolysins, exfoliatin, toxic shock
 535 syndrome toxin, and leukocidin, whereas the N305 gen-
 536 ome carried fewer and different toxin genes. *S. aureus*
 537 RF122 carried numerous enterotoxin genes, including the

bovine-associated variant of staphylococcal enterotoxin C 538
 which is involved in disturbances affecting the immune re- 539
 sponse and is carried by SaPIbov1 [9]. Unlike N305, RF122 540
 was found to possess *lukM* and *lukF*²-PV (hereinafter re- 541
 ferred to as *lukF*²), a *lukF*-PV variant carried by the pro- 542
 phage ϕ PPV83-pro [47]. These genes form LukM/F² which 543
 is involved in cytotoxicity against polynuclear neutrophils, 544

t3:1 Table 3 Compilation of potentially virulence associated proteins identified in this work

t3:2	Name of the protein ^a	Locus name ^b	Access. ^c			Loc. ^e	Method ^f		
			RF122	N305	Mass ^d		Exo.	Tot.	Shav.
t3:4	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING								
t3:5	Cell cycle control, cell division,								
t3:6	chromosome partitioning								
t3:7	Probable transglycosylase IsaA	<i>isaA</i>	Q2YWD9	J0L078	28.2	S	RF122		RF122, N305
t3:8	Cell wall/membrane/envelope biogenesis								
t3:9	Iron-regulated surface determinant protein A	<i>isdA</i>	Q2YX95	J0KNZ4		W			RF122, N305
t3:10	Iron-regulated surface determinant protein B	<i>isdB</i>	Q2YX96	J1ET39	72.0	W	RF122		RF122, N305
t3:11	Iron-regulated surface determinant protein C	<i>isdC</i>	Q2YX94	J0KVY4					RF122, N305
t3:12	Iron-regulated protein	<i>isdD</i>	Q2YX93	J0UGM1	41.2	U			RF122
t3:13	Lipoteichoic acid synthase	<i>ltaS</i>	Q2YSL2	J1EW90	74.2	C/M	RF122		
t3:14	Penicillin-binding protein 2	<i>pbp2</i>	Q2YY56	J1EJU3	80.2	C/M			RF122
t3:15	Post-translational modification, protein								
t3:16	turnover, and chaperones								
t3:17	Serine protease SplE	<i>splE</i>	Q2YTM5	J1EZ78	25.6	C/M	N305		
t3:18	Serine protease SplF	<i>splF</i>	Q2YTM6	J0KV93	25.6	S	N305		
t3:19	Serine protease SplD	<i>splD</i>		J0L226	25.6	S	N305		
t3:20	Serine proteinase (SplB)	Newbould 305_0049	Q2YTM3	J0UNB6	27.8	S	N305		
t3:21	Chaperone protein DnaK	<i>dnaK</i>	Q2YT47	J1EZS6	66.2	C		RF122	RF122, N305
t3:22	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	<i>ahpF</i>	Q2YVH8	J0KUQ5	54.5	C/M		RF122	RF122, N305
t3:23	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	<i>ahpC</i>	Q2YVK2	J1EYK8	20.9	C		RF122	RF122, N305
t3:24	Trigger factor	<i>tig</i>	Q2YTB4	J0KVL9	48.4	C		N305	RF122, N305
t3:25	Defense mechanisms								
t3:26	Alkaline shock protein 23	<i>asp23</i>	Q2YYG3	J0KY19	18.6	U		N305	RF122, N305
t3:27	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING								
t3:28	Replication, recombination and repair								
t3:29	Thermonuclease	<i>nucl</i>	Q2YXU2	J0UHM2	21.8	S			RF122, N305
t3:30	Translation, ribosomal structure and biogenesis								
t3:31	Elongation factor Ts	<i>tsf</i>	Q2YXL1	J0KWZ6	32.3	C	N305	RF122	N305
t3:32	Elongation factor Tu	<i>tuf</i>	Q2YSB3	J1EVM7	43.0	C		N305	RF122, N305
t3:33	METABOLISM								
t3:34	Carbohydrate transport and metabolism								
t3:35	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>gap</i>	Q2YSF2	J0KSH5	36.2	C	N305		RF122, N305
t3:36	Glucose-6-phosphate isomerase	<i>pgi</i>	Q2YWS3	J0UKP5	49.7	C	N305		
t3:37	Enolase	<i>eno</i>	Q2YSE8	J1EWJ2	47.0	C	N305		RF122, N305
t3:38	Phosphoglycerate kinase	<i>pgk</i>	Q2YSF1	J1EWC9	42.5	C	N305	N305	RF122, N305
t3:39	Inorganic ion transport and metabolism								
t3:40	Superoxide dismutase M	<i>sodM</i>	Q2YUU9	J0UM22	22.9	S	N305		
t3:41	POORLY CHARACTERIZED								
t3:42	Gamma-hemolysin component A	<i>hlgA</i>	Q2YVZ2	J0KNX1	36.3	S			N305
t3:43	Gamma-hemolysin component B	<i>hlgB</i>	Q2YVZ0	J0KVV4	36.6	S			RF122, N305
t3:44	Gamma-hemolysin component C	<i>hlgC</i>	Q2YVZ1	J1ET20	35.5	S	N305		
t3:45	Staphylococcal enterotoxin C-bovine	<i>sec-bov</i>	Q2YVN9		31.2	S	RF122		
t3:46	Superantigen-like protein 7	<i>set5</i>	Q2YVR9	J1EYV6	26.0	S	N305		

Table 3 Compilation of potentially virulence associated proteins identified in this work (Continued)

t3.47	Superantigen-like protein	<i>set11</i>	Q2YVM7	J1EYV1	25.7	S	N305
t3.48	Superantigen-like protein	<i>set19</i>		J0UMW3	39.8	S	N305
t3.49	Superantigen-like protein	Newbould 305_1808	Q2YXF4	J0KPN6	27.7	S	N305
t3.50	Leukocidin F subunit	<i>lukA</i>	Q2YU84	J1ET76	38.6	S	RF122, N305
t3.51	Leukocidin S subunit	<i>lukB</i>	Q2YU83	J0KP92	40.2	S	N305
t3.52	Panton-Valentine leukocidin LukF'-PV chain	<i>lukF'-PV</i>	Q2YWM7		36.4	S	RF122
t3.53	Leukocidin chain lukM	<i>lukM</i>	Q2YWM8		35.0	S	RF122
t3.54	Leukotoxin E subunit	<i>lukE</i>	Q2YU83	J0L217	34.6	S	RF122, N305
t3.55	Extracellular matrix and plasma binding protein	Newbould 305_1324		J0UKH8	38.3	W	N305
t3.56	Uncharacterized protein (<i>vwb</i> ^{Sbo5} -like)	Newbould 305_0962		J0KUT2	57.4	S	N305
t3.57	Immunoglobulin G binding protein A (Protein A)	<i>spa</i>		J1EXZ6	56.8	W	N305
t3.58	Elastin-binding protein EbpS	<i>ebpS</i>	Q2YY76	J0KQY7	52.9	C/M	RF122, N305
t3.59	Molecular chaperone Hsp31 and glyoxalase 3	<i>hchA</i>		J1EVT7	32.0	C	N305

t3.60 ^aProteins are classified in COG. Names are given according to annotation of genome sequencest3.61 ^bCorrespond to the commonly found name of the gene.t3.62 ^cAccessions numbers are given according to references on UniProtKB [35].t3.63 ^dTheoretical mass (in kDa) as predicted from the protein sequence [36].t3.64 ^ePredicted localization based on PSORTb software. S = Extracellular C = Cytoplasmic C/M = Cytoplasmic/Membrane W = Cell wall U = Unknown.t3.65 ^fMethod that enabled the observation of the protein with the name of the strain in which the protein was identified: Exo. = Proteins identified in supernatant Tot.

t3.66 =Proteins identified in total lysate Shav. =Proteins present in trypsin shaving solution.

545 mainly described during a strong inflammatory reaction in
 546 the mammary gland. LukM/F' is more efficient against bo-
 547 vine leukocytes than any other staphylococcal toxin, in-
 548 cluding Panton-Valentine leukocidin [5,48,49]. As for other
 549 leukocidins, both strains contained the *lukD/E* genes and
 550 *lukF/S* genes, also described as *lukB/A* or *lukG/H*, respect-
 551 ively [50,51], and LukS and LukF subunits were only found
 552 in N305 protein samples (Table 3). However, the LukM/F'
 553 leukotoxin, found in RF122, has a higher affinity for bovine
 554 myeloid lineage cells [5,52] and has been shown to be asso-
 555 ciated with severe clinical mastitis and to be highly preva-
 556 lent in gangrenous mastitis isolates [7,53]. Other toxin
 557 genes are absent from the N305 genome when compared
 558 to that of RF122, which might explain its less virulent
 559 phenotype during mastitis. Genes encoding for toxic shock
 560 syndrome toxin, exfoliatin B and enterotoxins, such as *sec*
 561 which is carried by SaPIbov, and *seg*, *sei*, *sen*, *seo*, carried by
 562 an enterotoxin gene cluster (*egc*), were indeed present in
 563 RF122 and absent from the N305 genome. Enterotoxins
 564 play a major role during staphylococcal infections and can
 565 induce a strong immune response in the mammary gland
 566 [54]. Analysis of the secretomes of RF122 and N305 con-
 567 firmed some of the differences observed in the gene con-
 568 tent, but it also revealed differences in the production of
 569 virulence factors whose genes were present in both ge-
 570 nomes. Hence the production of haemolysins (α - and γ -
 571 haemolysin) was more pronounced in N305, despite the
 572 presence of haemolysin-encoding genes in both strains. In
 573 line with this, N305 displayed a stronger cytotoxic poten-
 574 tial than RF122, as shown by an in vitro MTT assay of
 575 MAC-T cells. However, RF122 has been described as a

strain that produces high levels of α -haemolysin [55]. This
 discrepancy between the genomic and proteomic profiles
 and the expected cytotoxicity phenotype underlines the
 importance of the in vivo validation of in silico and prote-
 omic analyses. The virulence of *S. aureus* is obviously asso-
 ciated with its gene content, but also with its capacity to
 express this genetic equipment in a specific context. The
 differences observed here therefore advocated for more se-
 vere mastitis with RF122.

Interestingly, SaPI-N305_3, one of the SaPIs predicted
 in silico by PIPS analysis, was absent from the RF122
 genome and shared homology with the previously de-
 scribed SaPIbov4 and SaPIbov5 [56]. This putative SaPI
 carries the Newbould 305_0962 gene whose product was
 found to be surface-exposed by trypsin shaving in N305.
 This gene shares homology with SaPIbov4_ORF15, a
 gene encoding a bovine and SaPI-associated variant of
 von Willebrand factor binding protein which has been
 described in the *Staphylococcus aureus* strain BA4
 pathogenicity island SaPIbov4 [57]. These bovine vari-
 ants of vWbp (identified in SaPIbov4 and SaPIbov5)
 have been shown to provide carrier *S. aureus* strains
 with an ability to specifically coagulate ruminant plasma,
 whereas strains that do not carry these SaPIs (such as
 RF122) coagulate rabbit but not ruminant plasma [56].
 We were able to show that N305 did indeed clot rumin-
 ant (bovine and caprine) plasma. This capacity to coagu-
 late plasma is correlated with an ability to induce
 abscesses during infections [58]. The formation of ab-
 scesses is a mechanism of bacterial resistance against host
 immune cells. N305 is therefore endowed with ruminant-

607 specific coagulation capacities which reflect its adaptation
608 to the bovine host and correlate with its propensity to in-
609 duce chronic mastitis.

610 *S. aureus* N305 is suitably armed to invade host cells

611 A genomic comparison of *S. aureus* N305 and RF122
612 also revealed differences in colonization and invasion
613 factors. Most of these factors belong to surface proteins
614 such as Secretable Expanded Repertoire Adhesive Mole-
615 cules (SERAMs) or MSCRAMMs, which participate in
616 both adhesion and the internalization of *S. aureus* in
617 host cells [59]. SERAMs or MSCRAMMs interact with
618 host proteins such as fibronectin, collagen and elastin,
619 and trigger invasion. Numerous studies have reported
620 the importance of these factors during an infection. In
621 particular, fibronectin-binding proteins are considered to
622 be the principal staphylococcal proteins involved in *S.*
623 *aureus* internalization in host cells [60]. The analysis of
624 the N305 genome using the SurfG+ package [27] en-
625 abled the identification of PSE proteins. When the gen-
626 ome comparison of RF122 and N305 was focused on
627 these PSE proteins, it revealed that N305 is better
628 equipped than RF122 to achieve host invasion. *S. aureus*
629 N305 indeed possesses two fibronectin-binding proteins
630 (*fnbA* and *fnbB*) rather than one for RF122 (*fnbA*). Fur-
631 thermore, a comparison of the predicted FnbA protein
632 sequence revealed that N305 FnbA presented two addi-
633 tional fibronectin-binding domains, and RF122 FnbA
634 only one. This suggests a greater affinity of N305 for fi-
635 bronectin. It should be noted that fibronectin-binding
636 proteins have been shown to be indispensable to the in-
637 ternalization of *S. aureus* into host cells [60,61]. Other
638 surface protein genes were found in N305 while they
639 were missing from the RF122 genome.

640 Biofilm formation was not significantly different in the
641 two strains, in the conditions used (on abiotic surface).
642 Although *bap* gene is reportedly associated with chronic
643 mastitis isolates [8], its absence does not hinder N305 to
644 induce chronic mastitis. Moreover, the *sasG* and *pls*
645 genes, known to participate in host colonization and
646 modulate pathogen internalization, were also found in
647 N305 only. These observations correlate well with previ-
648 ous studies by our laboratory which compared the adhe-
649 sion and internalization capacities of both strains,
650 in vitro, on bovine MEC cultures (MAC-T line). The ad-
651 hesion and internalization rates of N305 were indeed
652 significantly higher than those of RF122 [24]. These cap-
653 acities seem to favour host invasion by *S. aureus* N305,
654 and together with the smaller number of toxin genes

655 and host-adaptation features such as production of the
656 bovine variant of vWbp, may account for a milder but
657 chronic phenotype in N305 mastitis.

658 Some moonlighting proteins were also found in the
659 proteomic profiles. Proteins identified as being relatively


more abundant in the N305 secretome formed part of
the “Carbohydrate transport and metabolism” COG
category and were also involved in adhesion and
colonization of host tissue, as has been reported for eno-
lase [62,63], glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase
(GAPDH) [64] and phosphoglycerate kinase (*pgk*) [65].
Other cytoplasmic proteins reportedly involved in adhe-
sion, such as glucose-6-phosphate isomerase (*pgi*) [66],
fructose-biphosphate aldolase (*fda*) [67], superoxide dis-
mutase (*sod*) [68] and elongation factor Tu (*tuf*) [69],
were also found, but in the N305 supernatant only
(Figure 4). The fact that N305 expresses more of these pro-
teins than RF122 may also account for N305's better cap-
acities to adhere, internalize and cause chronic infections.

Conclusions

N305 harbours fewer toxin genes but more colonization
and invasion factors than RF122. In vitro, coagulation,
proteolysis and cytotoxicity were significantly higher in
N305 compared to RF122 as well as adhesion and in-
ternalisation, as previously demonstrated in Bouchard
et al. [24]. This correlated well with its gene content and
proteomic profile. The range of bovine-adaptive features
might account for the propensity of N305 to persistence
and mild and chronic mastitis, which is more difficult to
detect and cure. By contrast, RF122 appeared to be less
well equipped in terms of its genes related to host-
adaptation and tissue invasion, but better equipped in
toxin genes, and therefore more prone to inducing a se-
vere inflammatory response. Whether these two profiles
correspond to the evolutionary strategies of *S. aureus*
bovine strains towards a commensal or strictly patho-
genic lifestyle is not yet known, and this point deserves
further investigation, including epidemiological studies.
In line with this, based on MLST data, Smith et al. sug-
gested that N305 should be considered as a teat skin asso-
ciated strains [70]. *S. aureus* N305 nevertheless represents
a strain of choice for further study to improve our under-
standing of the pathogenesis of *S. aureus* in the context of
chronic mastitis. A complete demonstration of the in-
volvement of the determinants identified here would re-
quire further experiments such as gene disruption and
virulence determination in vivo. The genome sequence
and fine characterization of this strain is a first necessary
step towards developing strategies to understand, prevent
and combat this disease.

Additional files

Additional file 1 : CDS classifications of *S. aureus* Newbould 305 and RF122 in the biological process. The assignment of protein functions to the ORFs of the N305 (A) and RF122 (B) genomes was performed manually using the results from BLASTP and the COG (Clusters of Orthologous Groups).

- 712 The percentage of genes encoding transposases and their inactivated
713 derivatives (COG L) was 5.5% of the total genes with COGs classifications in
714 Newbould 305.
- 715 Additional file 2: Proteins identified with the trypsin shaving
716 method. This table presents the proteins identified by mass
717 spectrometry after a trypsin treatment of bacterial surface (see Materials
718 and methods for details) for RF122 and N305 strains.
- 719 Additional file 3: Proteolytic activity of Newbould 305 and RF122
720 supernatants assessed on PCA agar medium supplemented with 5%
721 skimmed milk. Proteolysis assays on PCA gelose added with 5% of
722 skimmed milk. Culture supernatants of *S. aureus* RF122 (A) and Newbould
723 305 (B) were concentrated 10x and filtered before depositing 50 µL in a
724 well. A halo of proteolysis can be observed with N305.
- 725 Additional file 4: Proteins identified as differentially abundant in
726 secretome of *S. aureus* RF122 and N305. This table presents the
727 proteins identified by mass spectrometry (see Materials and methods for
728 details) in the culture supernatants of RF122 and N305 strains.
- 729 Additional file 5: Proteins identified as differentially expressed in
730 the total lysate by *S. aureus* RF122 and N305. This table presents the
731 proteins identified by mass spectrometry (see Materials and methods for
732 details) in the whole cell lysates of RF122 and N305 strains.
- 733 Competing interests
734 The authors declare that they have no competing interests.
- 735 Authors' contributions
736 VP, DB, LR, AM, NB and SE participated in the phenotype characterizations,
737 VP, JJ and GJ carried out the 2-DE analyses, participated in the identification
738 of the proteins by mass spectrometry, SE, JS, PF and YLL participated in the
739 design of the study and in the results analyses, DH, PF and JS carried out the
740 genome sequencing and genome sequence analyses, SA, HF, VA and PF
741 carried out the bioinformatics analyses, SE and YLL conceived the study,
742 and participated in its design and coordination. All authors read and
743 approved the final manuscript.
- 744 Authors' information
745 Sergine Even and Yves Le Loir share credit in senior co-authorship.
- 746 Acknowledgements
747 VP was the recipient of a Région Bretagne-INRA PhD fellowship. DB was the
748 recipient of fellowship from the French Ministry of Research and Higher
749 Education. SA was the recipient of a CAPES-COFECUB fellowship (project
750 720/11). Yves Le Loir is the recipient of a PVE grant (71/2013) from Programa
751 Ciências sem Fronteiras. The authors would like to thank Dr Florence Gilbert
752 and Dr Pascal Rainard (INRA Tours, France) for providing the Newbould 305
753 strain, Philippe Lambertson and Jean-Marc Aubry (INRA Rennes, France) for
754 supplying cow and goat blood samples, respectively, and Dr Régine Talon
755 and Dr Sabine Leroy (INRA Clermont, France) for allowing us access to the
756 genome sequence of *Staphylococcus xylosus* C2a.
- 757 Author details
758 ¹INRA, UMR 1253 STLO, 65 rue de Saint Brieuc, 35042 Rennes Cedex, France.
759 ²Agrocampus Ouest, UMR1253 STLO, 85 rue de Saint Brieuc, 35042 Rennes
760 Cedex, France. ³Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
761 Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. ⁴Genomic Research Laboratory,
762 Service of Infectious Diseases, University of Geneva Hospitals (HUG), CH-1211
763 Geneva 14, Switzerland.
- 764 Received: 25 June 2014 Accepted: 1 October 2014
765 
- 766 References
- 767 1. Le Maréchal C, Seyffert N, Jardin J, Hernandez D, Jan G, Rault L, Azevedo V,
768 François P, Schrenzel J, van de Guchte M, Even S, Berkova N, Thiéry R,
769 Fitzgerald JR, Vautor E, Le Loir Y: Molecular basis of virulence in
770 *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS One* 2011, 6:e27354.
 - 771 2. Peton V, Le Loir Y: *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine.
772 *Infect Genet Evol* 2014, 21:602–615.
 - 773 3. Le Maréchal C, Jardin J, Jan G, Even S, Pulido C, Guibert J-M, Hernandez D,
774 François P, Schrenzel J, Demon D, Meyer E, Berkova N, Thiéry R, Vautor E,
775 Le Loir Y: *Staphylococcus aureus* seroproteomes discriminate ruminant
776 isolates causing mild or severe mastitis. *Vet Res* 2011, 42:35.
 - 777 4. Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L: Severity of *E.*
778 *coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 2003, 34:521–564.
 - 779 5. Barrio MB, Rainard P, Prévost G: LukM/LukF' -PV is the most active
780 *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. *Microbes Infect*
781 2006, 8:2068–2074.
 - 782 6. Liang X, Ji Y: Alpha-toxin interferes with integrin-mediated adhesion and
783 internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Cell Microbiol*
784 2006, 8:1656–1668.
 - 785 7. Rainard P: *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM/F' is secreted and
786 stimulates neutralising antibody response in the course of intramammary
787 infection. *Vet Res* 2007, 38:685–696.
 - 788 8. Cucarella C, Tomo MÁ, Úbeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, Amorena B,
789 Lasá I, Penadés JR: Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the pathogenesis
790 of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2004, 72:2177–2185.
 - 791 9. Herron-Olson L, Fitzgerald JR, Musser JM, Kapur V: Molecular correlates of
792 host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2007, 2:e1120.
 - 793 10. Guinane CM, Ben Zakour NL, Tomo-Mas MA, Weinert LA, Lowder BV,
794 Cartwright RA, Smyth DS, Smyth CJ, Lindsay JA, Gould KA, Witney A, Hinds
795 J, Bollback JP, Rambaut A, Penadés JR, Fitzgerald JR: Evolutionary genomics
796 of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular
797 basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol Evol* 2010, 2:454–466.
 - 798 11. Le Maréchal C, Hernandez D, Schrenzel J, Even S, Berkova N, Thiéry R,
799 Vautor E, Fitzgerald JR, François P, Le Loir Y: Genome sequences of two
800 *Staphylococcus aureus* ovine strains that induce severe (strain O11) and
801 mild (strain O46) mastitis. *J Bacteriol* 2011, 193:2353–2354.
 - 802 12. Hernandez D, van der Mee-Marquet N, Kluytmans J, Donnio P-Y, Quentier R,
803 Corvaglia A-R, Francois P: Whole-genome sequences of *Staphylococcus*
804 *aureus* ST398 strains of animal origin. *Genome Announc* 2013, 1:e00689-13.
 - 805 13. Resch G, François P, Morisset D, Stojanov M, Bonetti EJ, Schrenzel J, Sakwinska O,
806 Moreillon P: Human-to-bovine jump of *Staphylococcus aureus* CC8 is
807 associated with the loss of a β -hemolysin converting prophage and
808 the acquisition of a new staphylococcal cassette chromosome.
809 *PLoS One* 2013, 8:e58187.
 - 810 14. Bouchard D, Peton V, Almeida S, Le Maréchal C, Miyoshi A, Azevedo V,
811 Berkova N, Rault L, François P, Schrenzel J, Even S, Hernandez D, Le Loir Y:
812 Genome sequence of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain
813 associated with mild bovine mastitis. *J Bacteriol* 2012, 194:6292–6293.
 - 814 15. Prasad LB, Newbould FH: Inoculation of the bovine teat duct with
815 *Staphylococcus aureus*: the relationship of teat duct length, milk yield
816 and milking rate to development of intramammary infection. *Can Vet J*
817 1968, 9:107–115.
 - 818 16. Shkreta L, Talbot BG, Diarra MS, Lacasse P: Immune responses to a DNA/
819 protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced
820 mastitis in dairy cows. *Vaccine* 2004, 23:114–126.
 - 821 17. Watson D: Mastitis Vaccine. 1986. Patent, International Publication Number:
822 WO/1986/006634.
 - 823 18. Dahnke KR: Treatment of Mastitis. 1999. Patent, International Publication
824 Number: WO1999/055711.
 - 825 19. Gill JJ, Sabour PM, Leslie KE, Griffiths MW: Bovine whey proteins inhibit the
826 interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K. *J Appl Microbiol*
827 2006, 101:377–386.
 - 828 20. Kruze J, Ceballos A, Stryhn H, Mella A, Matamoros R, Contreras PA, Leyan V,
829 Wittwer F: Somatic cell count in milk of selenium-supplemented dairy
830 cows after an intramammary challenge with *Staphylococcus aureus*.
831 *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2007, 54:478–483.
 - 832 21. Schmelcher M, Powell AM, Becker SC, Camp MJ, Donovan DM: Chimeric
833 phage lysins act synergistically with lysostaphin to kill mastitis-causing
834 *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands. *Appl Environ Microbiol*
835 2012, 78:2297–2305.
 - 836 22. Bannerman DD, Paape MJ, Lee J-W, Zhao X, Hope JC, Rainard P:
837 *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate
838 immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab*
839 *Immunol* 2004, 11:463–472.
 - 840 23. Hensen SM, Pavičić MJ, Lohuis JA, de Hoog JA, Poutrel B: Location of
841 *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder
842 and the expression of capsular polysaccharide type 5 *in situ*. *J Dairy Sci*
843 2000, 83:1966–1975.

- 844 24. Bouchard DS, Rault L, Berkova N, Le Loir Y, Even S: Inhibition of
845 *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by
846 contact with live *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol* 2013, 79:877–885.
- 847 25. Wilson GJC: Genome scale analysis of the role of superantigens in
848 *Staphylococcus aureus* disease pathogenesis. PhD Thesis. Edinburgh:
849 The University of Edinburgh; 2011.
- 850 26. Baron F, Cochet MF, Ablain W, Grosset N, Madec MN, Gonnet F, Jan S, Gautier
851 M: Rapid and cost-effective method for microorganism enumeration based
852 on miniaturization of the conventional plate-counting technique. *Lait* 2006,
853 86:251–257.
- 854 27. Barinov A, Loux V, Hammani A, Nicolas P, Langella P, Ehrlich D, Maguin E,
855 van de Guchte M: Prediction of surface exposed proteins in *Streptococcus*
856 *pyogenes*, with a potential application to other Gram-positive bacteria.
857 *Proteomics* 2009, 9:61–73.
- 858 28. Soares SC, Abreu VAC, Ramos RTJ, Cerdeira L, Silva A, Baumbach J, Trost E,
859 Tauch A, Hirata R, Mattos-Guaraldi AL, Miyoshi A, Azevedo V: PIPS:
860 pathogenicity island prediction software. *PLoS One* 2012, 7:e30848.
- 861 29. Rosenstein R, Nerz C, Biswas L, Resch A, Raddatz G, Schuster SC, Götz F:
862 Genome analysis of the meat starter culture bacterium *Staphylococcus*
863 *carneus* TM300. *Appl Environ Microbiol* 2009, 75:811–822.
- 864 30. Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV: The COG database: a tool
865 for genome-scale analysis of protein functions and evolution.
866 *Nucleic Acids Res* 2000, 28:33–36.
- 867 31. Maudsdotter L, Jonsson H, Roos S, Jonsson A-B: Lactobacilli reduce cell
868 cytotoxicity caused by *Streptococcus pyogenes* by producing lactic acid
869 that degrades the toxic component lipoteichoic acid. *Antimicrob Agents*
870 *Chemother* 2011, 55:1622–1628.
- 871 32. Le Maréchal C, Jan G, Even S, McCulloch JA, Azevedo V, Thiéry R, Vautor E,
872 Le Loir Y: Development of serological proteome analysis of mastitis by
873 *Staphylococcus aureus* in ewes. *J Microbiol Methods* 2009, 79:131–136.
- 874 33. Dumas E, Meunier B, Berdagué J-L, Chambon C, Desvaux M, Hébraud M:
875 Comparative analysis of extracellular and intracellular proteomes of
876 *Listeria monocytogenes* strains reveals a correlation between protein
877 expression and serovar. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74:7399–7409.
- 878 34. Shevchenko A, Sunyaev S, Liska A, Bork P, Shevchenko A: Nano-electrospray
879 tandem mass spectrometry and sequence similarity searching for
880 identification of proteins from organisms with unknown genomes.
881 *Methods Mol Biol* 2003, 211:221–234.
- 882 35. UniProt [<http://www.uniprot.org/>]
- 883 36. X!Tandem pipeline [<http://pappso.inra.fr>]
- 884 37. Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, Dao P, Sahinalp SC, Ester M,
885 Foster LJ, Brinkman FSL: PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization
886 prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities
887 for all prokaryotes. *Bioinformatics* 2010, 26:1608–1615.
- 888 38. Powell S, Szklarczyk D, Trachana K, Roth A, Kuhn M, Muller J, Arnold R, Rattei
889 T, Letunic I, Doerks T, Jensen LJ, von Mering C, Bork P: eggNOG v3.0:
890 orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic
891 ranges. *Nucleic Acids Res* 2012, 40:D284–D289.
- 892 39. Sivaraman K, Venkataraman N, Tsai J, Dewell S, Cole AM:
893 Genome sequencing and analysis reveals possible determinants of
894 *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *BMC Genomics* 2008, 9:433.
- 895 40. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L,
896 Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H,
897 Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK,
898 Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S,
899 Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, et al: Whole genome
900 sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001,
901 357:1225–1240.
- 902 41. Subedi A, Ubeda C, Adhikari RP, Penadés JR, Novick RP: Sequence analysis
903 reveals genetic exchanges and intraspecific spread of SaPI2, a pathogenicity
904 island involved in menstrual toxic shock. *Microbiology* 2007, 153:3235–3245.
- 905 42. Ben Zakour NL, Sturdevant DE, Even S, Guinane CM, Barbey C, Alves PD,
906 Cochet M-F, Gautier M, Otto M, Fitzgerald JR, Le Loir Y: Genome-wide
907 analysis of ruminant *Staphylococcus aureus* reveals diversification of the
908 core genome. *J Bacteriol* 2008, 190:6302–6317.
- 909 43. Kozłowska S, Stauß D, Pawlik M-C, Hensen S, Eckart M, Ziebuhr W, Witte W,
910 Ohlsen K: Identification of specific genes in *Staphylococcus aureus* strains
911 associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol* 2010, 145:360–365.
- 912 44. Bardiau M, Detilleux J, Famir F, Mainil JG, Ote I: Associations between
913 properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus*
914 *aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol* 2014, 169:74–79.
45. Reed SB, Wesson CA, Liou LE, Trumble WR, Schlievert PM, Bohach GA, 915
Bayles KW: Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* 916
serine protease operon. *Infect Immun* 2001, 69:1521–1527. 917
46. Stec-Niemczyk J, Pustelny K, Kisielewska M, Bista M, Boulware KT, Stennicke 918
HR, Thogersen IB, Daugherty PS, Enghild JJ, Baczynski K, Popowicz GM, 919
Dubin A, Potempa J, Dubin G: Structural and functional characterization 920
of SplA, an exclusively specific protease of *Staphylococcus aureus*. 921
Biochem J 2009, 419:555–564. 922
47. Zou D, Kaneko J, Narita S, Kamio Y: Prophage, ϕ PV83-pro, carrying Panton- 923
Valentine leukocidin genes, on the *Staphylococcus aureus* P83 924
chromosome: comparative analysis of the genome structures of ϕ PV83-pro, 925
 ϕ PVL, ϕ P11, and other phages. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000, 64:2631–2643. 926
48. Rainard P, Corrales J-C, Barrio MB, Cochar T, Poutrel B: Leucotoxic activities 927
of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats 928
with mastitis: importance of LukM/LukF' -PV leukotoxin. *Clin Diagn Lab* 929
Immunol 2003, 10:272–277. 930
49. Yamada T, Tochimarun N, Nakasuji S, Hata E, Kobayashi H, Eguchi M, Kaneko 931
Y, Kamio Y, Kaidoh T, Takeuchi S: Leukotoxin family genes in 932
Staphylococcus aureus isolated from domestic animals and prevalence of 933
lukM–lukF-PV genes by bacteriophages in bovine isolates. *Vet Microbiol* 934
2005, 110:97–103. 935
50. Ventura CL, Malachowa N, Hammer CH, Nardone GA, Robinson MA, Kobayashi 936
SD, DeLeo FR: Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component 937
leukotoxin using cell surface proteomics. *PLoS One* 2010, 5:e11634. 938
51. Yanai M, Rocha MA, Matolek AZ, Chintalacharuvu A, Taira Y, Chintalacharuvu 939
K, Beenhouwer DO: Separately or combined, LukG/LukH is functionally 940
unique compared to other saphylococcal bicomponent leukotoxins. 941
PLoS One 2014, 9:e89308. 942
52. Fromageau A, Cunha P, Gilbert FB, Rainard P: Purified *Staphylococcus* 943
aureus leukotoxin LukM/F' does not trigger inflammation in the bovine 944
mammary gland. *Microb Pathog* 2011, 51:396–401. 945
53. Rainard P: The complement in milk and defense of the bovine mammary 946
gland against infections. *Vet Res* 2003, 34:647–670. 947
54. Haenni M, Galofaro L, Ponsin C, Bes M, Laurent F, Madec J-Y: Staphylococcal 948
bovine mastitis in France: enterotoxins, resistance and the human Geraldine 949
methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Antimicrob Chemother* 2011, 950
66:216–218. 951
55. Guinane CM, Sturdevant DE, Herron-Olson L, Otto M, Smyth DS, Villaruz AE, Kapur 952
V, Hartigan PJ, Smyth CJ, Fitzgerald JR: Pathogenomic analysis of the common 953
bovine *Staphylococcus aureus* clone (ET3): emergence of a virulent subtype 954
with potential risk to public health. *J Infect Dis* 2008, 197:205–213. 955
56. Viana D, Selva L, Callanan JJ, Guerrero I, Ferrián S, Corpa JM: Strains of 956
Staphylococcus aureus and pathology associated with chronic 957
suppurative mastitis in rabbits. *Vet J* 2011, 190:403–407. 958
57. Viana D, Blanco J, Tormo-Más MA, Selva L, Guinane CM, Baselga R, Corpa JM, 959
Lasa I, Novick RP, Fitzgerald JR, Penadés JR: Adaptation of *Staphylococcus* 960
aureus to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von 961
Willebrand factor-binding protein: molecular basis of *S. aureus* host 962
adaptation. *Mol Microbiol* 2010, 77:1583–1594. 963
58. Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, Schneewind O: 964
Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and 965
protective immunity. *PLoS Pathog* 2010, 6:e1001036. 966
59. Heilmann C: Adhesion mechanisms of Staphylococci. In *Bacterial Adhesion*. 967
Edited by Linke D, Goldman A. Netherlands: Springer; 2011:105–123 968
[*Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 715]. 969
60. Fraunholz M, Sinha B: Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let 970
die. *Front Cell Infect Microbiol* 2012, 2:43. 971
61. Edwards AM, Potter U, Meenan NAG, Potts JR, Massey RC: *Staphylococcus* 972
aureus keratinocyte invasion is dependent upon multiple high-affinity 973
fibronectin-binding repeats within FnBPA. *PLoS One* 2011, 6:e18899. 974
62. Antikainen J, Kuparinen V, Lähteenmäki K, Korhonen TK: Enolases from 975
Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share 976
functional similarity in virulence-associated traits. *FEMS Immunol Med* 977
Microbiol 2007, 51:526–534. 978
63. Carneiro CRW, Postol E, Nomizo R, Reis LFL, Brentani RR: Identification of 979
enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus* 980
aureus. *Microbes Infect Inst Pasteur* 2004, 6:604–608. 981
64. Madureira P, Baptista M, Vieira M, Magalhães V, Camelo A, Oliveira L, Ribeiro 982
A, Tavares D, Trieu-Cuot P, Vilanova M, Ferreira P: *Streptococcus agalactiae* 983
GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. *J Immunol* 984
2007, 178:1379–1387. 985

Q1
Q2

- 986 65. Burnham C-AD, Shokoples SE, Tyrrell GJ: Phosphoglycerate kinase inhibits
 987 epithelial cell invasion by group B streptococci. *Microb Pathog* 2005,
 988 38:189–200.
- 989 66. Kainulainen V, Loimaranta V, Pekkala A, Edelman S, Antikainen J, Kylväjä R,
 990 Laaksonen M, Laakkonen L, Finne J, Korhonen TK: Glutamine synthetase
 991 and glucose-6-phosphate isomerase Are adhesive moonlighting proteins
 992 of *Lactobacillus crispatus* released by epithelial cathelicidin LL-37.
 993 *J Bacteriol* 2012, 194:2509–2519.
- 994 67. Blau K, Portnoi M, Shagan M, Kaganovich A, Rom S, Kafka D, Caspi VC,
 995 Porgador A, Givon-Lavi N, Gershoni JM, Dagan R, Nebenzahl YM: Flamingo
 996 cadherin: a putative host receptor for *Streptococcus pneumoniae*.
 997 *J Infect Dis* 2007, 195:1828–1837.
- 998 68. Reddy VM, Suleman FG: *Mycobacterium avium*-superoxide dismutase binds
 999 to epithelial cell aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and
 1000 cyclophilin A. *Microb Pathog* 2004, 36:67–74.
- 1001 69. Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB: Elongation factor Tu and
 1002 E1 β subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin
 1003 binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* 2002,
 1004 46:1041–1051.
- 1005 70. Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Fox LK, Schukken YH, Krueze JV,
 1006 Bradley AJ, Zadoks RN, Dowson CG: Multilocus Sequence Typing of
 1007 intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*
 1008 2005, 43:4737–4743.

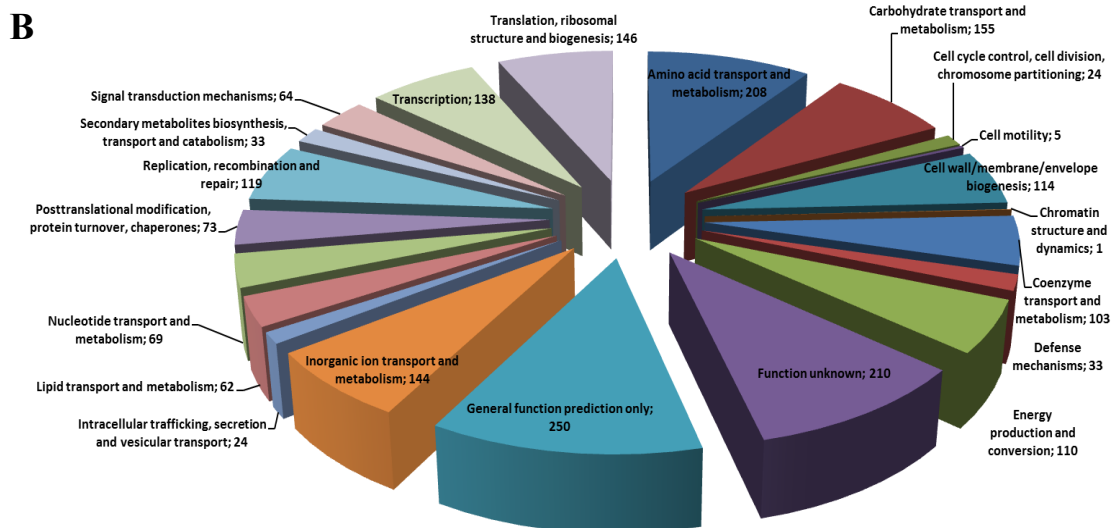
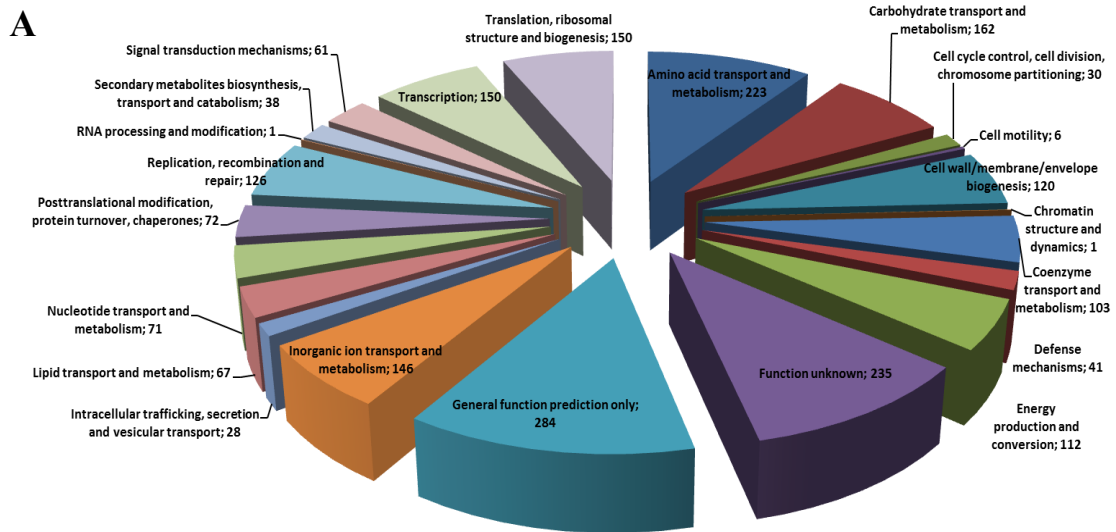
1009 [doi:10.1186/s13567-014-0106-7](https://doi.org/10.1186/s13567-014-0106-7)
 1010 Cite this article as: Peton et al. Fine-tuned characterization of
 1011 *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and
 1012 chronic mastitis in bovines. *Veterinary Research* 2014, 45:106.

UNCORRECTED PROOF

Submit your next manuscript to BioMed Central
 and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Additional file 1

Additional file 2: Proteins identified as differentially abundant in secretome of *S. aureus* RF122 and N305.

Name of proteins identified in RF122 ^a	Spot ^b	p-value ^c	Fold ^d	Locus ^e	Access. ^f	log(E value) ^g	Cover. ^h	Mass ⁱ	NP ^j	PAI ^k	Loc. ^l
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING											
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning											
Probable transglycosylase IsaA	22	4,99E-06	2,1	isaA	Q2YWD9	-19,11	26	28,2	4	0,83	S
Cell wall/membrane/envelope biogenesis											
Iron-regulated surface determinant protein B	1, 2, 3, 4, 5, 6	3,93E-05	2,4	isdB	Q2YX96	-110,18	39	72,0	25	1,22	W
Lipoteichoic acid synthase	7	4,53E-04	2,1	ltaS	Q2YSL2	-71,63	33	74,2	16	1,05	C/M
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	14, 16	7,29E-05	2,4	SAB2519	Q2YZ57	-45,94	21	69,2	11	0,62	S
METABOLISM											
Nucleotide transport and metabolism											
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	19	1,05E-05	2,2	guaB	Q2YVL6	-22,08	13	52,7	5	0,20	C
Inorganic ion transport and metabolism											
Probable zinc-binding lipoprotein	8	2,79E-04	2	SAB2286c	Q2YW05	-15,12	14	59,0	6	0,35	C/M
Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism											
D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	18	4,14E-04	2,6	dltA	Q2YWQ8	-14,13	10	54,5	3	0,18	C
POORLY CHARACTERIZED											
Glycerol ester hydrolase	1, 2 9, 10, 11, 12,	9,76E-05	2,4	geh	Q2YVD0	-42,68	22	72,2	9	0,42	S
Staphylococcal enterotoxin C-bovine	13	1,08E-06	3,8	sec-bov	Q2YVN9	-80,55	57	31,2	20	2,00	S
Probable exported protein	17, 18	4,14E-04	2,6	SAB0387	Q2YVR3	-15,00	8	56,3	4	0,19	U

Additional file 2 (continued)

Name of proteins identified in N305 ^a	Spot ^b	p-value ^c	Fold ^d	Locus ^e	Access. ^f	log(E value) ^g	Cover. ^h	Mass ⁱ	NP ^j	PAI ^k	Loc. ^l
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING											
Post-translational modification, protein turnover, and chaperones											
Foldase protein PrsA	40	4,21E-07	6,6	prsA	J0L203	-56,29	34	35,5	15	1,07	C/M
Coenzyme A disulfide reductase	29	2,21E-03	2	cdr	J1EWL3	-62,67	44	49,2	14	0,63	C
Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	32, 34, 35, 36, 51, 52	1,28E-04	2	ahpC	J1EYK8	-19,09	27	20,9	3	0,30	C
Serine protease SplE	47, 48, 49	2,57E-04	3,3	splE	J1EZ78	-10,09	10	25,6	2	0,25	C/M
Serine protease SplF	48, 49	2,57E-04	3,3	splF	J0KV93	-56,13	72	25,6	15	1,89	S
Serine protease SplD	48	2,57E-04	3,3	splD	J0L226	-46,44	59	25,6	12	1,78	S
Serine proteinase (SplB)	47	1,07E-04	3,2	Newbould305_0049	J0UNB6	-65,13	45	27,8	16	2,56	S
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING											
Translation, ribosomal structure and biogenesis											
Elongation factor Ts	36, 37, 42	1,51E-05	2	tsf	J0KWZ6	-91,77	68	32,4	21	1,56	C
METABOLISM											
Energy production and conversion											
Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	32	7,32E-04	2,4	pdhA	J0KP28	-8,58	7	41,3	2	0,15	C
L-lactate dehydrogenase	50, 51, 52	2,44E-04	2,4	ldh	J1EXA2	-31,90	22	34,3	6	0,54	C
Amino acid transport and metabolism											
Xaa-Pro dipeptidase-like protein	32	7,32E-04	2,4	Newbould305_0180	J0UNM4	-9,93	9	39,5	3	0,30	C
Thimet oligopeptidase	25	1,53E-03	2,4	pepB	J1EWN7	-46,18	23	69,7	12	0,60	C
Carbohydrate transport and metabolism											
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	32, 34, 35, 36	4,15E-06	4,1	gap	J0KSH5	-17,63	22	36,2	5	0,46	C
Glucose-6-phosphate isomerase	30	2,18E-05	2,7	pgi	J0UKP5	-101,03	55	49,7	22	2,06	C
2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	43, 44	6,54E-05	2,8	gpmA	J1ET24	-67,89	64	26,6	15	1,42	U
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	32	7,32E-04	2,4	Newbould305_1539	J1EUY4	-40,81	35	44,8	12	0,75	C
Phosphoglycerate kinase	32, 33	7,32E-04	2,4	pgk	J1EWC9	-86,90	55	42,5	19	1,11	C
Enolase	28, 31	3,75E-04	2,3	eno	J1EWJ2	-104,19	57	47,0	20	1,15	C
Fructose-bisphosphate aldolase class 1	43	6,54E-05	2,8	fda	J1EXA7	-83,88	65	32,9	18	1,80	U

Additional file 2 (continued)

Name of proteins identified in N305 ^a	Spot ^b	p-value ^c	Fold ^d	Locus ^e	Access. ^f	log(E value) ^g	Cover. ^h	Mass ⁱ	NP ^j	PAI ^k	Loc. ^l
Lipid transport and metabolism											
3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase	34	4,15E-06	4,1	mvaS	J1EX99	-26,02	30	40,9	9	0,60	C
Inorganic ion transport and metabolism											
Superoxide dismutase	51, 52	2,44E-04	2,4	sodM	J0UM22	-18,62	38	22,9	5	0,56	S
POORLY CHARACTERIZED											
Alpha-hemolysin	39, 40, 41, 47	4,21E-07	6,6	hla	J0KWK7	-81,73	70	36,2	19	1,29	S
Gamma-hemolysin component C	40	4,21E-07	6,6	hlgC	J1ET20	-61,41	46	35,5	17	1,44	S
Superantigen-like protein	48	1,07E-04	3,2	set11	J1EYV1	-20,88	28	25,7	5	0,50	S
Superantigen-like protein 7	46	1,32E-05	3,2	set5	J1EYV6	-58,90	59	26,0	14	1,46	S

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

^b : Spot numbers (cf Figure 4)

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

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

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

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

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

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

ⁱ : Theoretical mass as predicted from the protein sequence

^j : Number of identified peptides

^k : Protein abundance index ((Rappsilber *et al.*, 2002))

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

Additional file 3: Proteins identified as differentially expressed in the total lysate by *S. aureus* RF122 and N305.

Name of proteins identified in RF122 ^a	Spot ^b	p-value ^c	Fold ^d	Locus ^e	Access. ^f	log(E value) ^g	Cover. ^h	Mass ⁱ	NP ^j	PAI ^k	Loc. ^l
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING											
Post-translational modification, protein turnover, and chaperones											
Chaperone protein DnaK	57, 62, 63, 64, 65	6,30E-06	4,3	dnaK	Q2YT47	-56,49	33	66,2	15	1,00	C
Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	57, 58, 59	5,01E-05	4,6	ahpF	Q2YVH 8	-63,11	35	54,5	11	1,42	C/M
Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	56	7,40E-04	2,5	ahpC	Q2YVK 2	-43,00	65	20,9	9	1,80	C
Probable protease (Zinc) protein	53	3,76E-05	2	SAB1141	Q2YXN 7	-7,79	5	49,9	2	0,13	U
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING											
Translation, ribosomal structure and biogenesis											
Elongation factor Ts	55	8,29E-04	3,7	tsf							
METABOLISM											
Energy production and conversion											
Phosphotransacetylase	56	7,40E-04	2,5	pta	Q2YS76 Q2YUK	-43,29	42	34,9	9	0,83	U
ATP synthase subunit beta	53	3,76E-05	2	atpD	1	-115,92	56	51,3	21	1,33	C/M
Carbohydrate transport and metabolism											
Enolase	53	3,76E-05	2	eno	Q2YSE8 Q2YWF	-86,66	52	47,0	15	1,20	C
Fructose-disphosphate aldolase class 1	60, 61	4,33E-04	6,3	fda	3	-58,15	55	32,8	13	1,40	U
Coenzyme transport and metabolism											
Coenzyme A disulfide reductase	54	2,19E-09	16	cdr	Q2YW W1	-67,61	29	49,2	8	0,42	C
Name of proteins identified in N305 ^a	Spot ^b	p-value ^c	Fold ^d	Locus ^e	Access. ^f	log(E value) ^g	Cover. ^h	Mass ⁱ	NP ^j	PAI ^k	Loc. ^l
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING											
Post-translational modification, protein turnover, and chaperones											
Thioredoxin reductase	85	6,52E-07	2,4	trxB	J1EWC4	-45,94	42	33,5	11	1,10	C

Additional file 3 (continued)

Name of proteins identified in N305 ^a	Spot ^b	p-value ^c	Fold ^d	Locus ^e	Access. ^f	log(E value) ^g	Cover. ^h	Mass ⁱ	NP ^j	PAI ^k	Loc. ^l
Protein GrpE	88	9,35E-08	2,8	grpE	J0KVU6	-7,36	13	23,9	2	0,25	C
Trigger factor	86	6,05E-05	4,4	tig	J0KVL9	-32,61	16	48,4	5	0,46	C
Defense mechanisms											
Alkaline shock protein 23	98	3,80E-04	9,8	asp23	J0KY19	-7,51	15	18,6	2	0,40	U
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING											
Translation, ribosomal structure and biogenesis											
Translation initiation factor IF-2	66	9,03E-04	2	infB	J1ETX7	-18,74	6	77,7	3	0,10	C
Elongation factor Tu	87, 93	1,92E-05	3	tuf	J1EVM7	-21,55	12	43,0	3	0,35	C
Replication, recombination and repair											
DNA polymerase III subunit beta	81	5,46E-05	3,4	dnaN	J1EXP8	-10,55	8	41,8	2	0,10	C
METABOLISM											
Energy production and conversion											
L-lactate dehydrogenase	83	1,50E-04	4	ldh	J1EXA2	-68,53	49	34,3	11	1,38	C
Phosphotransacetylase	81	5,46E-05	3,4	eutD	J0UJS8	-49,54	45	34,8	10	0,92	C
L-lactate dehydrogenase	74, 84	8,36E-07	5,7	ldh	J0UMC4	-64,29	42	34,5	21	1,75	C
Amino acid transport and metabolism											
Ornithine cyclodeaminase protein	77	5,41E-04	4,1	Newbould305_0656	J0KU07	-5,02	8	37,7	2	0,17	C
Branched-chain-amino-acid aminotransferase	76	6,62E-04	3,4	Newbould305_1079	J0UJN7	-51,83	47	40,0	10	0,78	U
Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	67	1,99E-02	3,7	pdhC	J0KW19	-13,81	11	46,4	2	0,13	C
D-alanine aminotransferase	89, 91	3,62E-05	2,6	dat	J1EZD0	-40,52	41	31,7	8	0,59	C
Proline dipeptidase	78, 80	8,49E-07	8,2	Newbould305_2310	J0UJ09	-19,86	20	39,2	5	0,50	C
Oligoendopeptidase F	66	9,03E-04	2	Newbould305_2157	J1EUN3	-29,36	12	69,1	5	0,24	C
Ornithine carbamoyltransferase	78	8,49E-07	8,2	arcB	J0ULD6	-76,37	48	37,7	14	1,36	C
Carbohydrate transport and metabolism											
Triosephosphate isomerase	94	6,99E-04	2,9	tpiA	J0UKG7	-20,62	24	27,2	4	0,29	C
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	89	1,00E-03	4,7	gap	J0KSH5	-14,29	8	36,2	2	0,31	C

Additional file 3 (continued)

Name of proteins identified in N305 ^a	Spot ^b	p-value ^c	Fold ^d	Locus ^e	Access. ^f	log(E value) ^g	Cover. ^h	Mass ⁱ	NP ^j	PAI ^k	Loc. ^l
Phosphoglycerate kinase	79	4,35E-05	4,4	pgk	J1EWC9	-63,97	44	42,5	11	0,67	C
Transketolase	67, 89	1,00E-03	4,7	Newbould305_2114	J1EUC2	-84,78	35	72,1	16	0,69	U
Putative transaldolase	97	1,98E-04	2,5	Newbould305_0104	J1EZA8	-24,29	36	25,6	6	0,58	C
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	71	3,51E-05	3,1	gnd	J0UIZ1	-20,99	10	51,7	4	0,26	C
Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism											
Acetoin reductase	95	1,07E-04	4,1	Newbould305_0667	J1EXV9	-10,20	16	27,1	3	0,38	C
POORLY CHARACTERIZED											
UPF0447 protein Newbould305_1113	96	1,07E-04	2,2	Newbould305_1113	J1EVS0	-16,53	21	29,3	4	0,56	U
Molecular chaperone Hsp31 and glyoxalase 3	89, 90, 91	3,62E-05	2,6	hchA	J1EVT7	-32,69	38	32,0	8	1,36	C

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

^b : Spot numbers (Figure 4)

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

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

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

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

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

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

ⁱ : Theoretical mass as predicted from the protein sequence

^j : Number of identified peptides

^k : Protein abundance index ((Rappsilber *et al.*, 2002))

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

Additional file 4: Proteins identified with the trypsin shaving method.

Name of proteins identified in RF122 ^a	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING								
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning								
Probable transglycosylase IsaA	isaA	Q2YWD9	-64,45	47	24,2	10	4,25	S
Cell wall/membrane/envelope biogenesis								
Probable exported protein	SAB2519	Q2YZ57	-23,92	10	69,2	4	0,29	S
Penicillin-binding protein 2	pbp2	Q2YY56	-19,82	14	80,2	6	0,21	C/M
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase sle1	sle1	Q2YVT4	-14,69	16	35,8	4	0,38	W
Post-translational modification, protein turnover, and chaperones								
Probable thioredoxin	SAB0762c	Q2YWM3	-5,84	24	12,0	2	0,40	C
Probable serine protease	SAB1586	Q2YTG2	-14,24	16	45,6	4	0,24	C/M
Signal transduction mechanisms								
S-ribosylhomocysteine lyase	luxS	Q2YUL9	-5,47	17	17,5	2	0,60	C
Serine-protein kinase RsbW	rsbW	Q2YUI8	-5,87	13	17,8	2	0,20	C
Histidine protein kinase SaeS	saeS	Q2YSM6	-6,86	9	39,6	2	0,25	C/M
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport								
Type-I signal peptidase	spsB	Q2YWR9	-18,30	28	21,6	5	0,46	W
Defense mechanisms								
Lipid II:glycine glycytransferase	femX	Q2YYN5	-20,68	8	48,4	3	0,19	C
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING								
Translation, ribosomal structure and biogenesis								
30S ribosomal protein S6	rpsF	Q2YVJ2	-10,10	52	11,5	5	0,86	C
50S ribosomal protein L28	rpmB	Q2YXJ2	-4,47	23	6,9	2	1,00	C
50S ribosomal protein L18	rplR	Q2YYL3	-11,99	33	13,0	4	1,00	C
30S ribosomal protein S18	rpsR	Q2YVJ0	-15,52	32	9,2	4	2,00	C
50S ribosomal protein L17	rplQ	Q2YYM3	-15,45	22	13,7	2	0,75	C
50S ribosomal protein L30	rpmD	Q2YYL5	-11,70	36	6,5	2	0,50	C
Translation initiation factor IF-3	infC	Q2YTA9	-5,42	10	20,1	2	0,29	C
Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	pheS	Q2YX87	-11,97	8	40,0	2	0,17	C
Transcription								
Probable exported protein	SAB0922c	Q2YX19	-18,61	26	46,0	5	0,38	C/M
Putative uncharacterized protein	SAB0063	Q2YUV7	-30,92	29	29,5	6	0,41	C
Transcription termination/antitermination protein nusG	nusG	Q2YSC5	-6,97	13	20,6	2	0,18	C
Replication, recombination and repair								

Additional file 4 (continued)

Name of proteins identified in RF122 ^a	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ
DNA ligase	ligA	Q2YU70	-4,23	4	74,9	2	0,05	C
METABOLISM								
Energy production and conversion								
Probable quinol oxidase subunit 2	qoxA	Q2YX14	-20,62	20	41,7	6	0,58	C/M
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	gpsA	Q2YY82	-8,60	10	36,0	3	0,25	C
Probable alcohol dehydrogenase	SAB1296c	Q2YY27	-21,82	17	35,5	4	0,54	U
Isocitrate dehydrogenase [NADP]	citC	Q2YTE6	-7,09	6	46,3	2	0,13	C
Nucleotide transport and metabolism								
Deoxyribose-phosphate aldolase 1	deoC1	Q2YUU4	-9,97	12	23,4	2	0,18	C
Orotate phosphoribosyltransferase	pyrE	Q2YXG3	-8,59	21	22,0	2	0,25	C
Carbohydrate transport and metabolism								
Probable uridylyltransferase SAB2052c	SAB2052c	Q2YYH4	-8,90	7	44,8	2	0,10	C
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Pgm	Q2YSE9	-9,22	4	56,3	2	0,19	C
Probable exported protein	SAB1633c	Q2YTL2	-6,55	14	32,4	2	0,21	S
Coenzyme transport and metabolism								
Demethylmenaquinone methyltransferase	ubiE	Q2YY85	-10,47	10	27,2	2	0,17	U
Lipid transport and metabolism								
1-phosphatidylinositol phosphodiesterase	Plc	Q2YUT1	-27,62	24	36,9	6	0,89	S
Inorganic ion transport and metabolism								
Probable membrane protein	SAB1406	Q2YSZ5	-7,96	15	14,7	2	0,40	U
POORLY CHARACTERIZED								
Ser-Asp rich fibrinogen-binding/bone sialoprotein-binding protein	SAB0513	Q2YSA1	-232,64	45	120,7	33	1,06	W
Panton-Valentine leukocidin LukF-PV chain	SAB0783	Q2YWM7	-34,02	36	36,4	8	0,77	S
Leukocidin chain lukM	SAB0782	Q2YWM8	-35,33	29	35,0	7	0,59	S
Putative uncharacterized protein	SAB1759	Q2YTX0	-23,39	29	19,2	4	1,20	U
Probable lipoprotein	SAB0692	Q2YSI9	-12,07	14	34,3	4	0,25	U
Iron-regulated protein	isdD	Q2YX93	-8,81	10	41,2	3	0,20	U
Probable lipoprotein	SAB1403	Q2YSZ8	-6,23	15	21,3	2	0,25	S
Leukotoxin E subunit	lukE	Q2YTQ3	-20,97	20	34,6	5	0,33	S
Elastin-binding protein EbpS	ebpS	Q2YY76	-27,20	10	52,9	5	0,40	C/M
UPF0342 protein SAB1778c	SAB1778c	Q2YTZ2	-27,39	53	13,2	3	0,63	C
Putative uncharacterized protein	SAB0328c	Q2YVI0	-11,50	14	23,6	3	0,33	U
Putative uncharacterized protein	SAB1052	Q2YXD4	-14,83	20	25,5	3	0,44	C

Additional file 4 (continued)

Name of proteins identified in N305 ^a	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING								
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning								
Septation ring formation regulator EzrA	ezrA	J1EZG0	-50,38	18	66,1	6	0,24	C/W
Iron-sulfur cluster repair protein ScdA	scdA	J0UMD9	-8,72	17	25,4	3	0,25	C
Cell wall/membrane/envelope biogenesis								
Elongation factor 4	lepA	J1EVS2	-9,48	4	68,0	2	0,08	C/W
Undecaprenyl-PP-MurNAc-pentapeptide-UDPGlcNAc GlcNAc transferase	murG	J1EUR0	-11,35	8	39,6	2	0,13	C/W
UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	murB	J0KZ95	-6,26	8	33,7	2	0,15	C
UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	murD	J0KWM8	-8,80	8	49,7	2	0,18	C
Post-translational modification, protein turnover, and chaperones								
ATP-dependent protease subunit HslV	hslV	J0KWZ1	-20,34	19	19,5	3	0,63	C
Thioredoxin reductase	trxB	J1EWC4	-10,49	10	33,5	2	0,20	C
Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	msrA	J0KQP0	-19,91	24	20,5	3	0,50	U
Signal transduction mechanisms								
Universal stress protein family protein	Newbould305_0182	J1EZI3	-18,69	28	15,2	3	0,50	U
Two-component response regulator	yycF	J0L0Q9	-14,60	25	27,4	4	0,42	C
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport								
Signal recognition particle protein	Ffh	J0KPU1	-20,71	10	50,6	3	0,20	C/W
Defense mechanisms								
ABC transporter	Newbould305_0374	J1EWZ5	-5,71	9	25,7	2	0,17	C/W
ATP-binding ABC transporter protein	Newbould305_1348	J1EWF8	-9,26	8	38,1	2	0,15	C/W
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING								
Translation, ribosomal structure and biogenesis								
Pseudouridine synthase	rluB	J1EUZ6	-17,69	20	27,9	3	0,25	C
Tyrosine--tRNA ligase	tyrS	J1EZG1	-12,66	12	47,5	3	0,19	C
Isoleucine--tRNA ligase	ileS	J0KWN8	-103,54	27	104,7	18	0,59	C
Arginine--tRNA ligase	argS	J0KYW4	-20,43	8	62,2	3	0,10	C
Leucine--tRNA ligase	leuS	J0UNH6	-18,84	10	91,6	3	0,12	C
Peptide chain release factor 3	prfC	J0KSW0	-10,23	6	59,4	2	0,11	C
Peptide deformylase	Def	J0UGP6	-6,66	12	20,5	2	0,25	C
Uncharacterized protein	Newbould305_0284	J1EZR2	-45,86	72	11,0	6	2,25	C
UPF0477 protein Newbould305_1457	Newbould305_1457	J0KSV1	-22,60	27	19,2	3	0,63	C

Transcription
Additional file 4 (continued)

Name of proteins identified in N305 ^a	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ
Rrf2 family transcriptional regulator	Newbould305_0252	J1EZQ2	-34,18	44	15,5	4	1,00	C
Redox-sensing transcriptional repressor rex	Rex	J1ET27	-11,38	15	23,5	3	0,30	C
HTH-type transcriptional regulator rot	Rot	J0L278	-21,52	26	19,3	5	1,00	U
Uncharacterized protein	Newbould305_2350	J0KP60	-10,22	11	26,0	2	0,22	C
Replication, recombinaison and repair								
Transcription-repair coupling factor	Newbould305_2621	J0KVM9	-6,61	2	134,0	2	0,04	C
Thermonuclease	nucI	J0UHM2	-21,19	18	21,8	4	0,63	S
DNA gyrase subunit B	gyrB	J1EXV7	-12,87	9	72,4	4	0,14	C
Chromosomal replication initiator protein DnaA	dnaA	J0KTV1	-11,80	9	51,8	3	0,11	C
Primosomal protein DnaI	dnaI	J0UNP2	-11,74	10	35,5	2	0,13	C
DNA polymerase	polA	J1EZI5	-7,59	3	99,0	2	0,05	C
METABOLISM								
Energy production and conversion								
Glycerol kinase	glpK	J0KX39	-16,25	10	55,5	4	0,17	C
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Pgm	J0KZB7	-13,30	5	56,3	2	0,13	C
Phosphotransacetylase	eutD	J0UJS8	-6,41	13	34,8	2	0,17	C
Dihydrolipoyl dehydrogenase	pdhD	J0UGP2	-11,47	9	49,3	3	0,17	C
Zinc-containing alcohol dehydrogenase superfamily protein	Newbould305_1739	J0KRR1	-10,76	7	36,5	2	0,17	C
Amino acid transport and metabolism								
Probable glycine dehydrogenase [decarboxylating] subunit 2	gcvPB	J0UP14	-30,75	30	54,7	6	0,43	C
Arginine deiminase	arcA	J0L0F5	-10,33	11	46,8	4	0,16	C
Probable glycine dehydrogenase [decarboxylating] subunit 1	gcvPA	J1EZX4	-16,83	14	49,6	3	0,25	C
Proline dipeptidase	Newbould305_2310	J0UJ09	-22,99	14	39,2	4	0,44	C
Bifunctional 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase/chorismate mutase	aroA	J1EZF3	-18,68	23	40,5	4	0,45	C
Aminopeptidase	Newbould305_2446	J1ETE6	-8,35	8	46,8	3	0,14	C
Cytosol aminopeptidase	Newbould305_1382	J0KSP0	-10,49	9	54,0	3	0,15	C
Histidinol-phosphate aminotransferase	hisC	J1EW94	-9,73	7	39,7	2	0,14	U
Uncharacterized protein	Newbould305_0930	J0LIM4	-20,58	26	21,2	4	0,40	U
Nucleotide transport and metabolism								
Phosphoribosylamine--glycine ligase	purD	J1EX21	-59,75	30	45,7	9	0,56	C
Deoxyribose-phosphate aldolase	deoC1	J0UM27	-10,78	12	23,4	2	0,18	C
Bifunctional protein PyrR	pyrR	J1ETU6	-25,30	40	19,0	6	0,50	C

Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	purK	J0KSZ4	-11,19	10	42,3	3	0,19	C/W
Additional file 4 (continued)								
Name of proteins identified in N305 ^a	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ
Phosphoribosylformylglycinamide synthase, purS	Newbould305_1509	J0UKY0	-8,85	27	9,8	2	0,40	C
Carbohydrate transport and metabolism								
Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	glpD	J1EU92	-19,57	7	62,2	4	0,18	C
Phosphoglucomutase	Newbould305_2517	J1ESV1	-8,71	4	61,5	2	0,07	C
Lipid transport and metabolism								
Isoprenyl transferase	uppS	J1ETW9	-6,18	18	29,8	2	0,27	C
2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase	ispD	J0L191	-18,25	20	26,6	4	0,53	U
Cardiolipin synthase	ClS	J1EU91	-6,68	4	56,3	2	0,11	C/W
Carboxylesterase	Newbould305_2553	J0KNT7	-11,33	7	51,9	3	0,18	C
FMN-dependent NADH-azoreductase	azoR	J1EY78	-22,41	23	23,3	4	0,33	C
Coenzyme transport and metabolism								
Lipoate-protein ligase A	Newbould305_1469	J0UKU6	-25,40	38	37,8	5	0,75	C
Glutamine amidotransferase subunit PdxT	pdxT	J1EVJ4	-10,82	24	20,5	3	0,27	C
Phosphomethylpyrimidine kinase	Newbould305_1105	J0KYU1	-9,42	8	29,8	2	0,15	U
2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	Kbl	J0KYQ9	-5,93	6	42,8	2	0,10	C
3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	panB	J0L0A9	-5,58	9	28,1	2	0,18	U
Inorganic ion transport and metabolism								
Toxic ion resistance protein	Newbould305_2180	J0UHQ3	-17,75	8	43,3	2	0,08	U
Potassium uptake protein	Newbould305_1530	J0KZY5	-19,37	27	24,2	3	0,71	C
Sulfite reductase flavoprotein	cysJ	J0L0D8	-6,24	4	71,5	2	0,10	C/W
Uncharacterized protein	Newbould305_1190	J0KZ16	-17,16	13	23,6	2	0,25	C
Iron compound ABC transporter, iron compound-binding protein	Newbould305_2377	J0UGV2	-22,82	17	34,7	4	0,27	C/W
Aerobactin biosynthesis protein	Newbould305_1550	J0UJ25	-34,20	16	75,9	8	0,28	C
Cysteine synthase A protein	Newbould305_0655	J1EY01	-20,51	21	35,8	4	0,45	C
Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism								
Surfactin/siderophore synthetase	Newbould305_0718	J0UM69	-6,84	1	273,8	3	0,04	C
Surface protein	Newbould305_0674	J0L0X0	-61,75	52	26,4	9	2,43	W
POORLY CHARACTERIZED								
Uncharacterized protein	Newbould305_1141	J1EW07	-34,43	45	18,5	6	1,17	U
UPF0042 nucleotide-binding protein Newbould305_1300	Newbould305_1300	J0KZB2	-15,86	20	34,7	5	0,33	C
Putative ATP-dependent protease protein	clpB	J0KSR9	-26,17	10	98,2	4	0,13	C
Uncharacterized protein	Newbould305_1086	J1EVU8	-23,52	40	20,8	4	0,40	U

Name of proteins identified in N305 ^a	Locus name ^b	Access. ^c	log(E value) ^d	Cover. ^e	Mass ^f	NP ^g	PAI ^h	Loc. ⁱ
Uncharacterized protein	Newbould305_2029	J1EU25	-9,56	44	8,1	2	3,00	U
Additional file 4 (continued)								
Uncharacterized N-acetyltransferase	Newbould305_1819	J1ETJ0	-11,42	34	16,9	3	0,67	U
Uncharacterized protein	Newbould305_0962	J0KUT2	-4,97	3	57,4	2	0,09	S
Uncharacterized protein	Newbould305_1304	J0UKG2	-6,23	7	34,2	2	0,13	U
UPF0297 protein	Newbould305_0263	J0KVR6	-4,37	28	10,2	2	0,50	U
Probable transcriptional regulatory protein	Newbould305_1196	J1EW64	-18,29	23	26,2	3	0,83	C
Lipoprotein	Newbould305_2546	J0KVT0	-9,85	17	17,2	2	0,33	U
GTPase obg	obgE	J0UNR6	-7,85	6	47,1	2	0,08	C
Gamma-hemolysin component A	hlgA	J0KNX1	-9,58	17	36,3	3	0,23	S
Leukocidin S subunit	Newbould305_2380	J0KP92	-109,17	46	40,2	18	1,88	S
Leukocidin F subunit	Newbould305_2381	J1ET76	-84,54	38	38,6	11	1,27	S
Superantigen-like protein	set19	J0UMW3	-9,75	20	39,8	4	0,35	S
Extracellular matrix and plasma binding protein	Newbould305_1324	J0UKH8	-60,09	31	38,3	13	1,45	W
Superantigen-like protein	Newbould305_1808	J0KPN6	-21,78	18	27,7	3	0,44	S
Ribosome biogenesis GTPase A	rbgA	J0KQ05	-6,98	15	33,3	2	0,20	C
PilT domain-containing protein	Newbould305_1050	J0KYN4	-19,80	21	38,8	3	0,36	C/W
Immunoglobulin G binding protein A (Protein A)	Spa	J1EXZ6	-184,02	43	56,8	20	2,16	W
Alkaline shock protein 23	asp23	J0KY19	-8,16	18	19,1	2	0,29	U
tRNA modification GTPase MnmE	mnmE	J0ULU6	-9,88	5	51,2	2	0,14	C
7-cyano-7-deazaguanine synthase	queC	J0KSC2	-10,29	11	24,8	2	0,17	C
5'-nucleotidase, lipoprotein e(P4) family protein	Newbould305_0857	J1EYC5	-10,45	15	33,3	3	0,57	U
GTP cyclohydrolase FolE2	folE2	J0KRT2	-10,18	14	33,3	3	0,19	C

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

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

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

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

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

^f : Theoretical mass as predicted from the protein sequence

^g : Number of identified peptides

^h : Protein abundance index ((Rappsilber *et al.*, 2002))

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

Chapitre III

Caractérisation d'un gène régulateur :

Lien avec la sévérité des mammites

Comme mentionné précédemment, les souches de *S. aureus* isolées de mammites peuvent présenter des tableaux cliniques très différents, avec des degrés de sévérité pouvant varier considérablement. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à un gène de régulation susceptible d'intervenir dans ces différences de sévérité.

Au cours de travaux précédents au laboratoire (Thèse de Caroline Le Maréchal), les souches *S. aureus* O11 et O46 isolées de mammites ovines, respectivement clinique et subclinique, ont été caractérisées et comparées aux niveaux génomique, transcriptomique et séro-protéomique (Le Maréchal *et al.*, 2011c, d; Seyffert *et al.*, 2012). O11 induit de manière reproductible des mammites sévères alors que O46 induit des mammites modérées (Le Maréchal *et al.*, 2011b). Chez O46, une délétion de 4 paires de bases dans la région codante de *sigS* modifie le cadre de lecture, ce qui, en cas de synthèse protéique, aboutit à une protéine tronquée.

Nous avons séquencé le gène *sigS* chez 17 souches de *S. aureus* isolées de mammites cliniques (n=11) ou sub-cliniques (n=6) chez des petits ruminants (ovins et caprins). Les résultats de séquences sur 19 souches au total (O11, O46 et les souches additionnelles) montrent qu'aucune souche isolée de mammite clinique ne porte de copie altérée de *sigS* alors que 4 souches isolées de mammite subclinique (environ 1/3) portent la même altération de séquence que celle touchant O46. De plus, deux de ces souches ont une modification supplémentaire qui altère également le cadre de lecture, en amont (5') de la délétion initialement identifiée sur O46.

Nous avons cherché à mesurer l'implication de *sigS* dans la différence de virulence entre O11 et O46. Un mutant de *sigS*, appelé O11 Δ *sigS*, a été réalisé chez O11 de façon à obtenir une protéine tronquée au même niveau que celle prédite chez O46. Cette souche mutée a ensuite été complémentée avec le plasmide pMK4 portant le gène *sigS* de O11. Cette souche complémentée est appelée O11 Δ *sigS*-C.

L'expression de *sigS* a été testée lors de suivis de croissance en conditions de carence en fer, les milieux riches ne permettant pas l'expression de *sigS* (Miller *et al.*, 2012; Shaw *et al.*, 2008). A l'entrée en phase stationnaire de croissance, il y a un pic d'expression chez O11. La souche complémentée O11 Δ *sigS*-C a une expression de *sigS* qui se maintient durant la phase stationnaire, probablement à cause du nombre de copies plasmidiques élevé.

Les capacités de croissance dans différents milieux ont été testées. Toutes les souches présentent des vitesses de croissance similaires, avec toutefois la souche complémentée qui présente un retard dans l'entrée en phase exponentielle. Les trois souches (O11, O11 Δ *sigS* et O11 Δ *sigS*-C) ne présentent pas de différences quant à leur capacité à former des biofilms et n'ont pas de sensibilités différentes vis-à-vis d'agents stressants tels que la lysostaphine, l'H₂O₂, la plumbagine et le MMS.

Des tests *in vitro* sur cultures cellulaires ont également été réalisés. Les trois souches présentent les mêmes capacités d'adhésion, d'internalisation et de survie dans les cellules épithéliales mammaires bovines. De plus, l'incubation de ces cellules avec des surnageants de cultures bactériennes a montré des niveaux de lyse cellulaire similaires entre les souches.

Les souches O11 et O11 Δ *sigS* ont également été injectées à des souris, lors d'infections expérimentales sur modèle de mammites. Les animaux infectés ne présentaient pas de différences de signes cliniques et les charges bactériennes dans les tissus infectés étaient similaires. Toutefois, les dosages de cytokines montrent que les souris injectées avec la souche mutée produisent moins de TNF et d'IL-1 β que les souris injectées avec O11.

Il semblerait donc que le facteur σ^S n'ait que peu d'impact sur la virulence de *S. aureus* en contexte mammite, la sévérité des infections n'étant pas modifiée. Il est probable que *S. aureus* utilise des systèmes de régulation partiellement redondants qui lui permettent de s'adapter aux conditions stressantes durant l'infection et pallient l'absence de *sigS* fonctionnel.

Disruption of *sigS* gene hardly affects *Staphylococcus aureus* virulence in a mastitis context.

Vincent Peton^{1,2}, Koen Breyne³, Lucie Rault^{1,2}, Evelyne Meyer³, Kristel Demeyere³, Nadia Berkova^{1,2}, Sergine Even^{1,2}, and Yves Le Loir^{1,2}

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

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

3, Department of Pharmacology, Toxicology and Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium.

Key words: *Staphylococcus aureus*, mastitis, sigma factor, transcriptional regulator, virulence, mouse model.

Abstract

Staphylococcus aureus is a major pathogen involved in ruminant mastitis worldwide. Clinical signs of *S. aureus* mastitis are highly variable and largely depend on strain-specific features. In a previous work, the comparison of two *S. aureus* strains that reproducibly induce severe (strain O11) or mild (O46) mastitis in ewes revealed that the transcriptional regulator *sigS* was mutated in O46 (Le Maréchal et al., 2011. PLoS ONE 6(11): e27354. doi:10.1371/journal.pone.0027354). In this work, we analyzed *sigS* sequence in 17 other *S. aureus* strains isolated from goat or ewe mastitis and found a 4-bp deletion similar to that of O46 *sigS* gene in 3 strains associated to subclinical ewe mastitis. The *sigS* gene was disrupted in O11 (O11 Δ *sigS*) to investigate its involvement in the severity of infections in a mastitis context. The wild type and mutant strains were then characterized *in vitro* to evaluate *sigS* involvement in *S. aureus* response to various stresses and to assay its incidence on the cytotoxicity, invasion capacity, and biofilm formation. Wild type and mutant strains were also compared *in vivo* in experimental mastitis in a mouse model, where clinical signs and cytokines production were evaluated 24 hours post-infection. None of the *in vitro* assays revealed significant differences between O11, and O11 Δ *sigS*. *In vivo*, clinical signs were similar in the mice infected with the 2 strains. Only a lower IL-1 β and TNF- α production was measured in mice infected with the mutant strain, suggesting that infection with O11 Δ *sigS* induces a lower inflammatory response. These results show a low impact of *sigS* disruption on *S. aureus* physiology and virulence in a mastitis context. Whereas *sigS* gene is actually weakly involved in *S. aureus* pathogenesis or *sigS* disruption is compensated by other element(s) of the *S. aureus* regulatory network remains to be clarified.

Introduction

Mastitis is an inflammation of the mammary gland, which is frequently caused by bacterial infections. It has a huge impact on animal welfare and leads to major economic losses in dairy industry (Le Maréchal et al., 2011d). *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is one of the main etiological agents of ruminant mastitis and is reportedly difficult to eradicate, prone to recurrence and often evolves in chronic infections (Peton and Le Loir, 2013). Severity of *S. aureus* mastitis ranges from subclinical to severe and mostly relies on inter-strain variations in terms of virulence potential (Le Maréchal et al., 2011c; Zbinden et al., 2014). Indeed some strains are able to reproducibly induce chronic and mild mastitis whereas others lead to gangrenous mastitis (Le Maréchal et al., 2011b), unlike in *Escherichia coli* mastitis, where severity is mainly determined by host factors and not by strain features (Burvenich et al., 2003).

In a previous study, we deeply characterized two closely related *S. aureus* ovine strains, namely *S. aureus* O11 and O46, which reproducibly induce severe and mild mastitis, respectively, in experimental ewe mastitis (Le Maréchal et al., 2011b) (Le Maréchal et al., 2011a, 2011c). Among the differences identified between these two strains, the *sigS* gene in O46 has a 4-bp deletion in its nucleotide sequence, which modifies the open reading frame and induces a premature stop-codon, leading to a truncated protein. SigS is the most recently discovered of the four sigma factors described in *S. aureus* to date. It is an Extra-Cytoplasmic Function (ECF) σ factor, expressed in growth conditions that damage the envelope or DNA. Its disruption impairs the fitness of *S. aureus* in infectious conditions and decreases the severity of infections in a murine model of septic arthritis (Miller et al., 2012; Shaw et al., 2008). We thus hypothesized that an intact *sigS* (in O11) is necessary to observe severe mastitis symptoms while a mutated *sigS* (in O46) leads to the milder symptoms observed in O46-induced mastitis.

In this study, the *sigS* gene was sequenced in 17 strains isolated from clinical or subclinical mastitis. To investigate the role of SigS in mastitis severity, we mutated *sigS* in O11 such that the predicted *sigS* product was similar to that of O46. The mutant strain was characterized *in vitro* by measuring its fitness and several phenotypic parameters, which can affect virulence. Finally, the effect of *sigS* deletion on mastitis was assessed *in vivo* in a mouse model.

Material and method

Bacterial strains and growth conditions. The *S. aureus* strains (Table 1) were grown in brain heart infusion broth (BHI; pH 7.4; Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). The CFU/mL was determined after 24 h of incubation at 37°C on BHI agar. The *E. coli* strains were grown in Luria Bertani broth (LB, 10 g/L of trypton; 5 g/L of yeast extract; 5 g/L of NaCl) and selected on LB agar (10 g/L) with 100 µg/mL ampicillin. Bacterial concentrations in subcultures were estimated extemporaneously by spectrophotometric measurements at 600 nm (OD₆₀₀) using a VWR V-1200 spectrophotometer (VWR, Strasbourg, France) and were confirmed a posteriori by determination of the bacterial population using a micromethod as previously described (Baron et al., 2006).

CMI determination. Minimum inhibitory concentration (MIC) for lysostaphin (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), methyl methanesulfonate (MMS; Sigma), plumbagin (Sigma), streptonigrin (Sigma) and H₂O₂ (Sigma) were determined as follows. Overnight cultures of *S. aureus* strains in RPMI with 200 µM of 2,2'-dipyridyl were diluted 1/100 and used to inoculate fresh deferoxamine-RPMI (2.5 mL, in 15-mL tubes) containing increasing concentrations of the reactive. The concentrations tested here were 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 µg/mL for lysostaphin; 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 µM for plumbagin; 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 mM for MMS; 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 ng/mL for streptonigrin; 0, 10, 20, 40 and 80 mM for H₂O₂. Tubes were incubated 24h at 37°C with agitation at 180 rpm for all compounds except H₂O₂. The MIC was determined by the highest concentration without growth. To observe the effect of oxygen peroxide, cultures in exponential growth phase were submitted to H₂O₂ stress for 30 min at 37°C with agitation at 180 rpm. Percent survival was determined as described previously (Miller et al., 2012).

Sigma S sequence analysis. Genomic DNA was extracted from 3 mL *S. aureus* cultures in BHI broth using Blood and Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Amplification of the *sigS* gene was performed by PCR using sigSintF and sigSintR primers (Table 1). The PCR product was then purified on column using PCR purification kit (QiaGEN). Purified PCR fragments were sequenced by LGC Genomics (Berlin, Germany). Sequences were aligned using AlignX extension of VectorNTI software (Life Technologies, Saint Aubin, France).

Construction of $\Delta sigS$ mutant in *S. aureus* O11. *S. aureus* O11 mutated for the *sigS* gene was obtained essentially as described previously (Hiron et al., 2007), with the following

modifications. Briefly, a recombination cassette was cloned in *E. coli* NEB10-beta using an overlap PCR technique. This recombination cassette contains a Box A ranging from nucleotide +1 to +162 of the *sigS* coding sequence and a Box B ranging from nucleotide +441 until the end of *sigS*. The resulting BoxAB lacks a 279 bp internal fragment compared to the wt *sigS* gene and contains a stop codon inserted immediately after Box A, at position +162. To construct the recombination cassette, boxes A and B were PCR-amplified from O11 genomic DNA using the primers listed in table 1. Boxes A and B were mixed in equal concentrations, and used as a template for a second PCR using only the two external primers. Internal primers, BoxAB-*sigS*-R-*Bgl*II and BoxAB-*sigS*-F-*Bam*HI, contain 23 and 22 nucleotides complementary to BoxB and A respectively, thus allowing the overlap PCR to occur. The hybrid PCR product, BoxAB, was cloned into the pGEMT vector (Promega, Lyon France), resulting in plasmid pGEM-T::BoxAB. The plasmid was digested by *Bam*HI and *Bgl*II and the *Bam*HI-BoxAB-*Bgl*II fragment was then purified and cloned into pMAD, a temperature-sensitive shuttle vector (Arnaud et al., 2004). The resulting plasmid pMAD::BoxAB was introduced into *S. aureus* O11 and the mutant strain (called O11 Δ *sigS*) was obtained by double-crossover exactly as described previously (Arnaud et al., 2004). The *sigS* disruption was checked by PCR using primers ins-*sigS*-F and ins-*sigS*-R, followed by sequencing of the PCR product.

Complementation of this strain was done by amplifying the O11 *sigS* coding sequence using primers sigScompF and sigScompR. The obtained fragment was then cloned into the pMK4 expression vector, under control of the P_{prot} promoter (Archambaud et al., 2005). The resulting pMK4::*sigS* was then transferred into O11 Δ *sigS* and the resulting strain was named O11 Δ *sigS*-C. Strains, plasmids and primers used for this construction are presented in Table 1.

Assessment of *sigS* expression in *S. aureus* O11

S. aureus O11 was pre-cultured in RPMI 1640 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) supplemented with 2,2'-dipyridyl (200mM, Sigma) and diluted 1000-fold in fresh RPMI + deferoxamine mesylate (152 mM, Sigma). These iron-depleted conditions were previously shown to mimic the mastitis context and to increase the expression of virulence factors (Le Maréchal et al., 2009). Moreover, it was shown that *sigS* gene is not expressed in rich media (Shaw et al., 2008). The iron deprivation is thus meant to increase *sigS* expression. *S. aureus* strains were grown without agitation at 37°C under microaerophilic conditions, in 15 or 50 mL tubes. After incubation, the cultures were centrifuged (10 min, 5000 g, 4°C) and culture

supernatants were discarded. Pellets were washed in ice-cold Tris-EDTA buffer (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH8), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Bacterial cells were disrupted and RNA was extracted essentially as previously described (Cretenet et al., 2011a). Retrotranscription reaction was conducted on 0.2 µg of RNAs using a qScript™ cDNA synthesis kit (Quanta BioSciences™, VWR). Quantitative PCR was carried out using qPCR-sigS or qPCR-gyrB primers (Table 1). The qPCR-sigS primer anneals in the BoxA region of sigS gene (see description above). PCR experiment were carried out using the SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) in a Bio-Rad® CFX96™ thermocycler. Raw data were normalized based on *gyrB* expression as previously described (Cretenet et al., 2011b).

Crystal violet biofilm assays. Experiments were performed as described previously (Le Maréchal et al., 2011c) and raw measurements were normalized with *S. aureus* MW2 strain as an internal standard.

Adhesion, internalization and intracellular survival assays. Adhesion, internalization and intracellular survival assays were conducted as described by Bouchard *et al.* (Bouchard et al., 2013). Multiplicity of infection of *S. aureus* on epithelial cells was 100:1. Intracellular survival assays were conducted on up to 6 days post-infection.

Cytotoxicity assays. Cell viability was measured after a 24-hour incubation with *S. aureus* supernatants. Bacteria were pre-cultured in RPMI containing 200 µM 2,2'-dipyridyl, then grown in RPMI containing 152 µM of deferoxamine for 24h. Cultures were centrifuged and supernatants were filtered on 0.22 µm units and neutralized. Cells were incubated for 24h in a mix of supernatant and DMEM in a ratio of 1:1 (V/V). Control condition was PBS and DMEM in a ratio of 1:1. Viability methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was performed as described previously (Maudsdotter et al., 2011). Relative viability was expressed with regard to control conditions (100% viability).

Mouse mastitis model and local cytokines levels. The animal study was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University (Belgium) and conducted in accordance to the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. Experimental mastitis were carried out as described in Le Maréchal *et al.* (Le Maréchal et al., 2011b) with minor modifications. Eight-week-old female Hsd:ICR (CD1)

mice (n= 14) were mated with ten-week-old male Hsd:ICR (CD1) mice (n = 14; Harlan laboratories, Horst, The Netherlands). The 12-14 days-old litter was weaned 1 to 2 h before intraductal injection in the 4th gland pair (L4 on the left and R4 on the right) of each of the dams. All inoculations were performed under isoflurane gas anesthesia combined with a long acting analgesic buprenorphine (10 µg/kg Vetergesic, Patheon UK Ltd, Swindon, UK). At first, the orifice of both abdominal mammary glands was exposed by a small cut at the near end of the teat. Secondly, a volume of 100 µL PBS without (n = 4) or with 150 CFU of *S. aureus* strain O11 (n = 5) or O11Δ*sigS* (n = 5) was injected slowly with a 32-gauge blunt needle into the main teat duct. After recovery from the anesthesia, core body temperature of the mice was measured at 0 h, 18 h and 24 h post infection (pi) with a rectal thermistor. At 24 h pi mice were sedated by administering a mixture of ketamine (100 mg/kg Anesketin, Eurovet Animal Health BV, Bladel, The Netherlands) combined with xylazine (10 mg/kg; Xylazini Hydrochloridum, Val d'Hony-Verdifarm, Beringen, Belgium) intraperitoneally to collect blood by cardiac puncture and subsequently euthanized by cervical dislocation. Serum was obtained after clotting at 37 °C for one hour and cold centrifugation (12,250 g) of the blood. Following CFU numerations in tissues and IL-1β, TNF-α, MCP-1, IL-6 and IL-12 dosages were exactly as described in Le Maréchal *et al.* (Le Maréchal *et al.*, 2011b).

Statistical analysis. Each experiment was done in triplicate and differences between strains were assessed using a one-way analysis of variance, followed by a Tukey's range test. The statistical program Prism 5 (GraphPad) was used considering a *P*-value lower than 0.05. Values are expressed in mean concentration±standard error.

Results

Several *S. aureus* strains isolated from subclinical mastitis display a mutated *sigS*.

The *sigS* gene of 17 *S. aureus* strains isolated from ewe (n=14) and goat (n=3) mastitis cases were sequenced and compared to O11 and O46 *sigS* sequences. Three strains, O82, O112 and O116, isolated from ovine subclinical mastitis, displayed a deletion of 4pb identical to that of O46. This mutation results in a truncated SigS lacking the DNA-binding domain. Moreover, O112 and O116 displayed an additional deletion of 1pb upstream the 4bp deletion. The resulting frame shift induces an even shorter predicted product. The O117 strain, isolated from a clinical mastitis, has an altered sequence compared to the other strains that leads to a complete but altered predicted protein sharing 90% of identity with O11 SigS. Altogether, these results showed that the *sigS* mutations was found in *S. aureus* strains isolates from subclinical mastitis (4 out of 12 strains tested), whereas none of the strains isolated from clinical or gangrenous mastitis carried such a deletion resulting in a truncated predicted protein.

Disruption of *sigS* has no effect on fitness of *S. aureus* O11 in culture conditions mimicking the mastitis context. The *sigS* gene was disrupted in O11 (see Materials and Methods for details) such that the predicted product is truncated exactly at the same level as in O46. O11 Δ *sigS* was complemented with pMK4::*sigS*, an expression vector containing the intact O11 *sigS* coding sequence. The *sigS* expression was assessed in *S. aureus* O11 and O11 Δ *sigS*-C, to check *sigS* transcription and to identify the growth phase with the highest *sigS* expression. The kinetics of *sigS* expression was assessed by RT-qPCR using qPCR-*sigS* primer, which anneals with the 5' end of *sigS* coding sequence, in BoxA (see Materials and Methods). In O11, the overall *sigS* expression level was low, with a peak of expression at the 14 h point, which corresponds to the entry in stationary phase. In O11 Δ *sigS*-C, the expression went on increasing along the growth, which correlates with the constitutive expression of *sigS* under the control of P_{prot} in pMK4 vector. (Figure 1).

Growth in a rich (BHI) or iron depleted medium (RPMI + deferoxamine) did not allow the observation of any significant differences in the growth of these strains (same growth rate, and final biomass) (Data not shown). The ability to form biofilms was also investigated and no differences were observed between O11 and O11 Δ *sigS*, both of which produced a biofilm significantly thicker than that of O46 (Figure 2A).

Various stresses were applied to O11 and O11 Δ *sigS*, and O46 cultures. Stresses with lysostaphin, H₂O₂, MMS, streptonigrin or plumbagin resulted in no differences except for O46, which showed a higher susceptibility to H₂O₂.

Adhesion and internalization were also assayed and showed that O11, O11 Δ *sigS* and O46 had the same adhesion- (5.67E+06, 7.07E+06 and 3.50E+06 CFU/mL respectively) and internalization- (3.62E+06, 3.25E+06 and 2.73E+06 CFU/mL respectively) rates (Figure 2B). Similarly, there were no statistical differences in long term intracellular survival (6 days post-infection) of these strains (data not shown).

Culture supernatants of O11, O11 Δ *sigS*, and O11 Δ *sigS*-C were assayed for their cytotoxicity on bMEC (Figure 2C). After treatment, the cells displayed viability rates of 27%, 36% and 43% for O11 Δ *sigS*, O11 Δ *sigS*-C, and O11 supernatants, respectively, when compared to reference condition, but without any statistical significance.

The *sigS* disruption does not reduce virulence of *S. aureus* but alters the local immune response in a mastitis mouse model. The mice were injected with *S. aureus* O11 (n=5), O11 Δ *sigS* (n=5) or sham (n=4) in the 4th gland pair. Twenty-four h pi, the bacterial-infected mice showed signs of prostration that were absent in the sham-inoculated mice. The *S. aureus* O11-inoculated mice had a mean concentration of 5.81E+09 CFU/g mammary gland whereas O11 Δ *sigS* mice had a mean concentration of 6.85E+09 CFU/g mammary gland. These concentrations are not significantly different. No bacterial growth was detected in the serum of the mice.

IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1 and IL-12 levels were evaluated in the mammary gland and serum of mice. Serum concentrations did not differ significantly between treatments (data not shown). The mean concentration of IL-1 β in the mammary tissue was 712.2 \pm 89.4 pg/mL in O11-infected mice, 426.5 \pm 46.8 pg/mL in O11 Δ *sigS*-infected mice and 6.8 \pm 0.2 pg/mL in sham-infected mice. The mean concentration of TNF- α in the mammary tissue was 66.6 \pm 13.2 pg/mL in mice infected with O11, 19.8 \pm 2.9 pg/mL in mice infected with O11 Δ *sigS* and 42.0 \pm 7.6 pg/mL with sham (Figure 3). Both IL-1 β and TNF- α had significantly different levels of expression between O11- and O11 Δ *sigS*-infected mice. Levels of MCP-1 (O11: 961.7 \pm 59.7 pg/mL; O11 Δ *sigS*: 884.4 \pm 75.5 pg/mL; sham: 55.3 \pm 7.1 pg/mL) and IL-6 (O11: 1958 \pm 237.0 pg/mL; O11 Δ *sigS*: 1452 \pm 82.0 pg/mL; sham: 7.9 \pm 3.8 pg/mL) were higher in mammary tissue of mice injected with either *S. aureus* strain compared to mice injected with sham. Levels of IL-12 (O11: 11.0 \pm 0.6 pg/mL; O11 Δ *sigS*: 11.2 \pm 0.6 pg/mL; sham: 11.2 \pm 0.5 pg/mL) did not show any significant differences between both infected and control groups.

Discussion

S. aureus sigS was recently described and, as of yet, this is the only ECF σ factor identified in *S. aureus*. Although its regulon is still unknown, *sigS* was shown to be involved in resistance and adaptation to various stresses and in *S. aureus* virulence in a septic arthritis murine model (Miller et al., 2012; Shaw et al., 2008). In this study, we investigated the contribution of *sigS* gene to the virulence/fitness of *S. aureus in vitro* and *in vivo* in a mastitis context. We initially found a 4-bp deletion in *sigS* in several *S. aureus* isolated from subclinical mastitis only, which suggested a possible role in *S. aureus* virulence in the mastitis context. Complementary approaches were used to determine its real implication in the severity of mastitis induced by the well-characterized ovine strain O11. Contrarily to what was shown in the septic arthritis murine model (Miller et al., 2012), our results showed that *sigS* disruption did not alter *S. aureus* O11 virulence potential in a murine mastitis model.

A *sigS* deletion in *S. aureus* O11 does not affect *S. aureus* survival under mastitis related stresses *in vitro* but modifies the immune response in a mouse mastitis model.

Wild type O11 and O11 Δ *sigS* were compared in culture conditions representative of the stresses encountered in a mastitis context (e.g. iron restriction, oxidative stress, envelop damage). Contrarily to what was described by Miller *et al.* (Miller et al., 2012) in *sigS S. aureus* mutant strains, we did not observe any growth defect in O11 Δ *sigS* when compared to O11, and none of the stresses applied (lysostaphin, H₂O₂, MMS, plumbagin or streptonigrin) had significant effect on O11 Δ *sigS* growth and survival. Only O11 Δ *sigS*-C had a prolonged lag phase that may result from energy requirements induced by the high copy number plasmid used to clone wt *sigS* coding sequence. Similarly, none of the phenotypes tested on bovine mammary epithelial cells (cytotoxicity, adhesion, internalization, intracellular survival) nor biofilm assays revealed any significant differences between O11 and O11 Δ *sigS*. Of note, no significant differences were observed between O11 and O46, except for biofilm formation and resistance to H₂O₂. This higher ability of O11 to form biofilm and its higher resistance to oxidative stress may contribute to the higher virulence of strain O11. However, these differences were not related to the *sigS* mutation.

The expression profile of *sigS* in O11 reached a peak at the entry in stationary phase in O11, which is consistent with the *sigS* induction previously observed at the end of exponential growth phase in *S. aureus* RN4220 (Miller et al., 2012). The continuous expression observed

in O11 Δ *sigS*-C likely results from the strong constitutive promoter controlling *sigS* CDS expression on pMK4 expression vector.

In vivo, mice were intramammarily infected with O11 or O11 Δ *sigS* and developed similar clinical signs concomitant with minor differences in quantitative cytokines profiles. The O11 Δ *sigS* strain elicited a lower production of TNF- α and IL-1 β than O11, suggesting that the infection with O11 Δ *sigS* induces a lower local inflammation, which is in accordance with Shaw *et al.* results that showed a decreased inflammatory potential in their *sigS* mutated strain (Shaw *et al.*, 2008).

TNF- α and IL-1 β production can be initiated by epithelial cells, leading to the recruitment of neutrophils and the enhancement of their phagocytosis and bactericidal activity (Rainard and Riollot, 2006). TNF- α elevation in bovine mammary gland often correlates with IL-12 elevation in cows (Trinchieri, 2003), which was not observed here in a murine model with a very transient production of TNF- α during the mammary gland infection (Wellnitz and Bruckmaier, 2012). This discrepancy may be due to our murine model, as IL-12 is an interleukin involved in adaptive immunity (Trinchieri, 2003) and the CD1 mice have mainly innate immunity. O11 Δ *sigS* also showed a tendency to induce less IL-1 β than O11. *S. aureus* induces IL-1 β during intramammary challenges (Rainard and Riollot, 2006; Wellnitz and Bruckmaier, 2012). Notably, Pantone-Valentine leucocidin and gamma hemolysin induce production of IL-1 β by immune (Perret *et al.*, 2012) and epithelial cells and thus induce the recruitment of neutrophils by activating the expression of ICAM-1 (Rainard and Riollot, 2006).

Of note, in a previous work, O11 and O46 strains were inoculated in the same conditions in CD1 mice and O46 induced higher levels of IL-1 β and TNF α in mammary gland (Le Maréchal *et al.*, 2011b). Here, no differences in clinical signs were observed in the infected mice. These results suggest an intact *sigS* gene accounts for the full inflammatory response elicited by wt O11 but that *sigS* is not involved (or only partially) in the differences of virulence observed in O11 and O46.

Is *sigS* mutation a marker of subclinical mastitis isolates? Sequencing of *sigS* genes revealed the presence of deletions modifying the coding sequence in 4 strains isolated from subclinical mastitis (30% of subclinical isolates). This 4-base deletion does not abolish *sigS* expression in O46, as shown by RT-qPCR (data not shown). It more likely results in a shorter and dysfunctional predicted protein, which contains the RNA polymerase binding domain but lacks the alternative promoter recognizing domain.

The absence of such mutation in clinical mastitis isolates and the fact that it is present only in subclinical strains suggest *sigS* is involved in the severity of mastitis symptoms. Alternatively, one can hypothesize that *sigS* is an accessory gene in *S. aureus* pathogenesis in a mastitis context and therefore might not undergo a selective pressure. Of note, the 4 strains carrying a *sigS* mutation had distinct PFGE profiles but clustered in the same pulsotype as determined in a previous study (Alves et al., 2009). The *sigS* mutation might have appeared in an *S. aureus* lineage, which is associated to subclinical mastitis for reasons independent of *sigS* integrity, and might be maintained in the clonal population because it barely alters *S. aureus* physiology in a mastitis context.

In line with this hypothesis, three CA-MRSA strains belonging to a single sequence type (ST59), and carrying this same mutation have been isolated from severe human infections in China (Chen et al., 2013; Huang et al., 2012; Qu et al., 2014), suggesting that *sigS* disruption does not alleviate the severity of *S. aureus* infections in humans.

Conclusion.

Altogether, our results demonstrated that *sigS* gene is not likely to account for the differences of severity observed in O11 and 46 induced mastitis in ewes. It probably plays a minor role in *S. aureus* virulence in mastitis context. This might result in the absence (or faint) counter selective pressure on *sigS* disruption, which persists in some clonal lineages. The *sigS* gene is one among many other elements of the intricate network involved in *S. aureus* gene regulation. Whether its regulatory function is taken over by other elements of the network remains to be clarified.

Acknowledgments

Vincent Peton was the recipient of a Région Bretagne-INRA PhD fellowship.

References

- Alves, P.D.D., McCulloch, J.A., Even, S., Le Maréchal, C., Thierry, A., Grosset, N., Azevedo, V., Rosa, C.A., Vautor, E., Le Loir, Y., 2009. Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from small and large ruminants reveals a host rather than tissue specificity. *Vet. Microbiol.* 137, 190–195.
doi:10.1016/j.vetmic.2008.12.014
- Archambaud, C., Gouin, E., Pizarro-Cerda, J., Cossart, P., Dussurget, O., 2005. Translation elongation factor EF-Tu is a target for Stp, a serine-threonine phosphatase involved in

- virulence of *Listeria monocytogenes*: EF-Tu, a target for the Listeria phosphatase Stp. *Mol. Microbiol.* 56, 383–396. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04551.x
- Arnaud, M., Chastanet, A., Debarbouille, M., 2004. New Vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6887–6891. doi:10.1128/AEM.70.11.6887-6891.2004
- Baron, F., Cochet, M.F., Ablain, W., Grosset, N., Madec, M.N., Gonnet, F., Jan, S., Gautier, M., 2006. Rapid and cost-effective method for microorganism enumeration based on miniaturization of the conventional plate-counting technique. *Lait* 86, 251–257. doi:10.1051/lait:2006005
- Bouchard, D.S., Rault, L., Berkova, N., Le Loir, Y., Even, S., 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 877–885. doi:10.1128/AEM.03323-12
- Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., Duchateau, L., 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34, 521–564. doi:10.1051/vetres:2003023
- Chen, C.-J., Unger, C., Hoffmann, W., Lindsay, J.A., Huang, Y.-C., Gotz, F., 2013. Characterization and comparison of 2 distinct epidemic Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clones of ST59 lineage. *PLoS ONE* 8. doi:10.1371/journal.pone.0063210
- Cretenet, M., Laroute, V., Ulve, V., Jeanson, S., Nouaille, S., Even, S., Piot, M., Girbal, L., Le Loir, Y., Loubiere, P., Lortal, S., Coccagn-Bousquet, M., 2011a. Dynamic analysis of the *Lactococcus lactis* transcriptome in cheeses made from milk concentrated by ultrafiltration reveals multiple strategies of adaptation to stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 247–257. doi:10.1128/AEM.01174-10
- Cretenet, M., Nouaille, S., Thouin, J., Rault, L., Stenz, L., François, P., Hennekinne, J.-A., Piot, M., Maillard, M.B., Fauquant, J., Loubière, P., Loir, Y.L., Even, S., 2011b. *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 340–351. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00230.x
- Giai, C., Gonzalez, C., Ledo, C., Garofalo, A., Genaro, M.S.D., Sordelli, D.O., Gomez, M.I., 2013. Shedding of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 induced by Protein A decreases Tumor Necrosis Factor Alpha availability and inflammation during systemic *Staphylococcus aureus* infection. *Infect. Immun.* 81, 4200–4207. doi:10.1128/IAI.00593-13
- Hiron, A., Borezée-Durant, E., Piard, J.-C., Juillard, V., 2007. Only one of four oligopeptide transport systems mediates nitrogen nutrition in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 5119–5129. doi:10.1128/JB.00274-07
- Huang, T.-W., Chen, F.-J., Miu, W.-C., Liao, T.-L., Lin, A.-C., Huang, I.-W., Wu, K.-M., Tsai, S.-F., Chen, Y.-T., Lauderdale, T.-L.Y., 2012. Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* M013, a pvl-Positive, ST59-SCCmec Type V Strain Isolated in Taiwan. *J. Bacteriol.* 194, 1256–1257. doi:10.1128/JB.06666-11
- Le Maréchal, C., Hernandez, D., Schrenzel, J., Even, S., Berkova, N., Thiéry, R., Vautor, E., Fitzgerald, J.R., François, P., Le Loir, Y., 2011a. Genome sequences of two

- Staphylococcus aureus* ovine strains that induce severe (strain O11) and mild (strain O46) mastitis. *J. Bacteriol.* 193, 2353–2354. doi:10.1128/JB.00045-11
- Le Maréchal, C., Jan, G., Even, S., McCulloch, J.A., Azevedo, V., Thiéry, R., Vautor, E., Le Loir, Y., 2009. Development of serological proteome analysis of mastitis by *Staphylococcus aureus* in ewes. *J. Microbiol. Methods* 79, 131–136. doi:10.1016/j.mimet.2009.08.017
- Le Maréchal, C., Jardin, J., Jan, G., Even, S., Pulido, C., Guibert, J.-M., Hernandez, D., François, P., Schrenzel, J., Demon, D., Meyer, E., Berkova, N., Thiéry, R., Vautor, E., Le Loir, Y., 2011b. *Staphylococcus aureus* seroproteomes discriminate ruminant isolates causing mild or severe mastitis. *Vet. Res.* 42, 35. doi:10.1186/1297-9716-42-35
- Le Maréchal, C., Seyffert, N., Jardin, J., Hernandez, D., Jan, G., Rault, L., Azevedo, V., François, P., Schrenzel, J., van de Guchte, M., Even, S., Berkova, N., Thiéry, R., Fitzgerald, J.R., Vautor, E., Le Loir, Y., 2011c. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PloS One* 6, e27354. doi:10.1371/journal.pone.0027354
- Le Maréchal, C., Thiéry, R., Vautor, E., Le Loir, Y., 2011d. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. *Dairy Sci. Technol.* 91, 247–282. doi:10.1007/s13594-011-0009-6
- Maudsdotter, L., Jonsson, H., Roos, S., Jonsson, A.-B., 2011. Lactobacilli reduce cell cytotoxicity caused by *Streptococcus pyogenes* by producing lactic acid that degrades the toxic component lipoteichoic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1622–1628. doi:10.1128/AAC.00770-10
- Miller, H.K., Carroll, R.K., Burda, W.N., Krute, C.N., Davenport, J.E., Shaw, L.N., 2012. The extracytoplasmic function sigma factor σS protects against both intracellular and extracytoplasmic stresses in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 194, 4342–4354. doi:10.1128/JB.00484-12
- Perret, M., Badiou, C., Lina, G., Burbaud, S., Benito, Y., Bes, M., Cottin, V., Couzon, F., Juruj, C., Dauwalder, O., Goutagny, N., Diep, B.A., Vandenesch, F., Henry, T., 2012. Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell. Microbiol.* 14, 1019–1036. doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01772.x
- Peton, V., Le Loir, Y., 2013. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect. Genet. Evol.* doi:10.1016/j.meegid.2013.08.011
- Qu, T., Feng, Y., Jiang, Y., Zhu, P., Wei, Z., Chen, Y., Otto, M., Yu, Y., 2014. Whole genome analysis of a community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST59 isolate from a case of human sepsis and severe pneumonia in China. *PloS One* 9, e89235. doi:10.1371/journal.pone.0089235
- Rainard, P., Riollet, C., 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37, 369–400. doi:10.1051/vetres:2006007
- Shaw, L.N., Lindholm, C., Prajsnar, T.K., Miller, H.K., Brown, M.C., Golonka, E., Stewart, G.C., Tarkowski, A., Potempa, J., 2008. Identification and characterization of sigma, a novel component of the *Staphylococcus aureus* stress and virulence responses. *PloS One* 3, e3844. doi:10.1371/journal.pone.0003844

- Trinchieri, G., 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 133–146. doi:10.1038/nri1001
- Wellnitz, O., Bruckmaier, R.M., 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet. J.* 192, 148–152. doi:10.1016/j.tvjl.2011.09.013
- Zbinden, C., Stephan, R., Johler, S., Borel, N., Bünter, J., Bruckmaier, R.M., Wellnitz, O., 2014. The inflammatory response of primary bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* strains is linked to the bacterial phenotype. *PloS One* 9, e87374. doi:10.1371/journal.pone.0087374

TABLE 1 Strains, plasmids, and primers used in this study

Strain, plasmid or primer	Genotype or description	Reference
<i>S. aureus</i>		
O11	Ovine strain, isolated from a gangrenous mastitis	(Le Maréchal et al., 2011a)
O46	Ovine strain, isolated from a subclinical mastitis	(Le Maréchal et al., 2011a)
C78	Caprine strain, isolated from a subclinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
C81	Caprine strain, isolated from a subclinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
C85	Caprine strain, isolated from a subclinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O55	Ovine strain, isolated from a subclinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O82	Ovine strain, isolated from a subclinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O112	Ovine strain, isolated from a subclinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O113	Ovine strain, isolated from a subclinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O116	Ovine strain, isolated from a subclinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O117	Ovine strain, isolated from a subclinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O217	Ovine strain, isolated from a clinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O267	Ovine strain, isolated from a clinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O268	Ovine strain, isolated from a subclinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O17	Ovine strain, isolated from a clinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O322	Ovine strain, isolated from a clinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O326	Ovine strain, isolated from a clinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O331	Ovine strain, isolated from a subclinical mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O408	Ovine strain, isolated from a gangrenous mastitis	Eric Vautor, AFSSA Sofia Antipolis
O11Δ <i>sigS</i>	O11Δ <i>sigS</i> (<i>sigS</i>)	This study
O11Δ <i>sigS</i> -C	O11Δ <i>sigS</i> pMK4:: <i>sigS</i> ^r	This study
<i>E. coli</i>		
NEB10β	Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>araD</i> 139 <i>fhuA</i> Δ <i>lacX</i> 74 <i>galK</i> 16 <i>galE</i> 15 <i>e14</i> - φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> <i>recA</i> 1 <i>relA</i> 1 <i>endA</i> 1 <i>nupG</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>rph</i> <i>spoT</i> 1 Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>)	New England Biolabs ®
GMS0030	NEB10β pMAD:: <i>sigS</i> - (inactivated <i>sigS</i>)	This study
GMS0033	NEB10β pMK4:: <i>sigS</i> ⁺	This study
Plasmids		
pGEMT		
pMK4	Expression vector, replicative in <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i>	(Archambaud et al., 2005)
pMAD	Thermosensitive shuttle vector, replicative in <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i>	(Arnaud et al., 2004)
Primers		
boxA- <i>sigS</i> -F	CCACACCTCTTAGGTCATTGTTG	This study
boxA- <i>sigS</i> -R	GCATTTACGCTTAACGGATGTC <u>GAGCTCCTA</u> GCTTGAGGGTTTATATATCTGACTC	This study
	*	
boxB- <i>sigS</i> -F	GAGTCAGATATATAAACCCCTCAAGCTAG <u>GAGCTCGACATCCGTTAAGCGTAAATGC</u>	This study
	*	
boxB- <i>sigS</i> -R	ATCTGGCGTACAATTTTTCGTT	This study
boxAB- <i>sigS</i> -F-BamHI	GGAGGATCCACGTTGATCCACGAATCATAAA	This study
boxAB- <i>sigS</i> -R-BglII	AGA <u>AGATCTT</u> CAATGAAGTGCTTCAAAGCTAA	This study
comp- <i>sigS</i> -F-EcoRI	GAAGAATTCTAAATCGTCGTTTCGTGCAA	This study
comp- <i>sigS</i> -F-BamHI	GGAGGATCCTAAATCGTCGTTTCGTGCAA	This study
comp- <i>sigS</i> -R-PstI	CTGCTGCAGTGTCTTGCAAATATATTACTCCTCGT	This study
ins- <i>sigS</i> -F	ATGAGACAACAGCAAATATG	This study
ins- <i>sigS</i> -R	CGACCGAAATTTACAATAAAC	This study
qPCR- <i>sigS</i> -F	CACCACAAAATCATACACCATC	This study
qPCR- <i>sigS</i> -R	TCTGACTCAATTGCCACATTTT	This study
qPCR- <i>gyrB</i> -F	AATCAGCGTTAGATGTAGCAAGC	(Cretenet et al., 2011b)
qPCR- <i>gyrB</i> -R	GTCACGACCAGATTTTGTAGACC	(Cretenet et al., 2011b)

Primers restriction sites are underlined. * designates the stop codon inserted in O11 *sigS* in order to mimic the mutation in O46.

Figure captions.

Figure 1: Expression of the *sigS* gene in *S. aureus* O11, O11 Δ *sigS*, O11 Δ *sigS*-C and O46 during growth. Cultures were performed in RPMI + deferoxamine, after iron deprivation, under microaerobic conditions at 37°C. The expression of *sigS* was determined by qRT-PCR and expressed relative to the one of *gyrB*.

Figure 2: Phenotypic tests. **A:** Biofilm production of *S. aureus* strains MW2, O11, O11 Δ *sigS* and O46 determined by Crystal violet staining assay. *S. aureus* strains were grown in iron-depleted RPMI in microtiter plates. OD600 nm measurements were normalized with MW2 strain as an internal standard, with an arbitrary value of 1. **B:** Adhesion and internalization into MAC-T cells of *S. aureus* strains O11, O11 Δ *sigS* and O46 during growth. *S. aureus* (MOI of 100:1) populations adhered to and internalized into bMEC were determined after 1 and 2 h of interaction, respectively. Data are presented as mean populations per well (i.e., corresponding to $2.5 \cdot 10^5$ bMEC) standard deviations. **C:** Cytotoxic effects of *S. aureus* strains O11, O11 Δ *sigS* and O11 Δ *sigS*-C supernatants on MAC-T cells. *S. aureus* strains were grown for 24 h in RPMI with 50 mM deferoxamine. Supernatants (or PBS for the control condition) were mixed in DMEM at a ratio of 1:1 and incubated with MAC-T cells. Cytotoxicity was assessed using the MTT test and relative viability was expressed with regard to PBS-treated cells. Each experiment was done in triplicate and differences between strains were assessed using a one-way analysis of variance, followed by a Tukey's range test. Letters a and b indicate homogeneous statistical processing groups that were significantly different according to the Tukey's range test. ns means no significant difference between groups.

Figure 3: Quantification of IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1 and IL-12 in mammary gland lysates with BD™ Cytometric Bead Array. Cytokines were quantified on homogenates of mammary glands injected with sham, *S. aureus* O11 or O11 Δ *sigS*. Quantities are the mean values of 7 to 10 homogenates for each group. Each experiment was done in triplicate and differences between strains were assessed using a one-way analysis of variance, followed by a Tukey's range test. Letters A, B and C indicate homogeneous statistical processing groups that were significantly different according to the Tukey's range test. For IL-12, ns means no significant difference between groups.

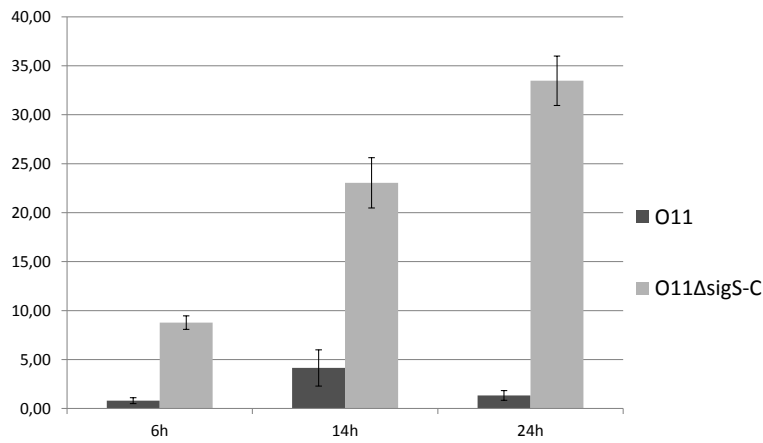


Figure 1

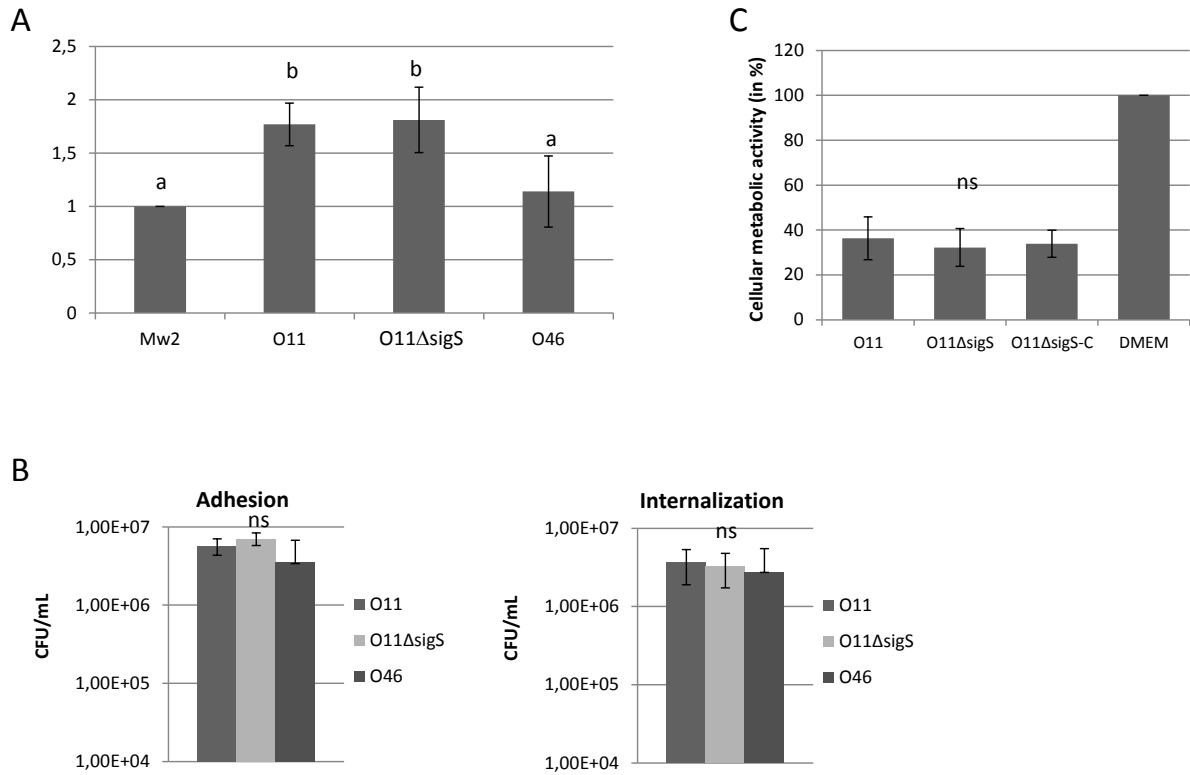


Figure 2

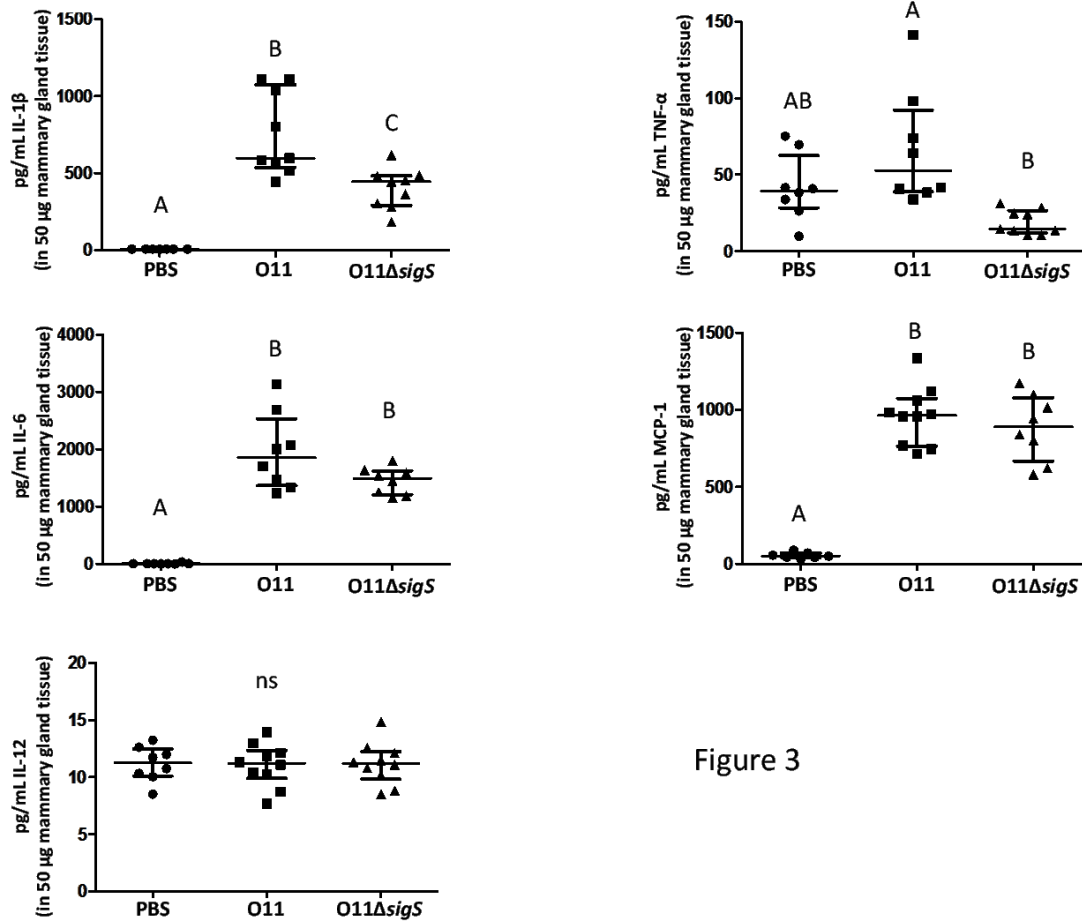


Figure 3

Chapitre IV

Conclusions et perspectives

Dans les élevages laitiers, les mammites représentent un problème sanitaire majeur et constituent une des principales causes de pertes économiques et (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). *Staphylococcus aureus* est l'un des principaux pathogènes associés aux mammites chez les ruminants. Cependant, malgré les efforts consacrés à la recherche sur les mammites, pour l'heure, aucune solution efficace ne permet de lutter efficacement contre les mammites à *S. aureus* tant en préventif qu'en curatif. L'une des raisons de ce faible succès est peut-être le peu de données disponibles concernant le cycle infectieux et les mécanismes mis en jeu dans les interactions de *S. aureus* avec son hôte (tissus épithéliaux et microbiote), en contexte mammitaire. Depuis quelques années, le développement des outils de génomique et la disponibilité des séquences génomiques de souches isolées de mammites ont permis de mieux appréhender leurs spécificités. En parallèle, les modèles cellulaires bovins (*in vitro*) ont permis une analyse fine de l'ensemble des mécanismes impliqués dans le processus infectieux de *S. aureus* dans la glande mammaire. Toutefois, faute de validation sur modèle bovin, les résultats sont difficilement extrapolables au contexte *in vivo*, car l'environnement conditionne inévitablement le devenir de ces interactions.

La diversité des tableaux cliniques engendrés par *S. aureus* lors de mammites est un élément clé lié à ce pathogène et qui peut en partie expliquer l'échec des nombreuses approches testées. Ce pathogène peut induire des infections intramammaires allant de la mammitaire subclinique à la mammitaire gangréneuse (Rainard & Gilbert, 2009). Bien que des facteurs de l'hôte interviennent (fond génétique, état de santé général, âge de l'animal, nombre de lactations...) (Rupp & Boichard, 1999, 2003), ces issues sont pour beaucoup liées aux caractéristiques des souches. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux facteurs de *S. aureus* impliqués dans les différences de tableaux cliniques. En effet, les facteurs staphylococciques sont encore méconnus pour le moment et une meilleure connaissance permettrait de mieux appréhender le cycle infectieux de *S. aureus* et donnerait des pistes pour développer de nouvelles stratégies préventives et/ou curatives mieux ciblées (vaccins, approches probiotiques, traitements ciblant des voies métaboliques de *S. aureus*).

Une des particularités des mammites causées par *S. aureus* est la chronicité, qui peut être mise en regard des échecs des approches thérapeutiques testées y compris les antibiotiques. Même si elles peuvent parfois présenter des symptômes sévères, les mammites à *S. aureus* sont plus généralement modérées et plus souvent chroniques que les mammites à *Escherichia coli*. Une hypothèse serait que *S. aureus* déclenche une réponse immunitaire moins intense chez son hôte et est donc moins bien éliminée par le système immunitaire, ce qui lui permet de persister et de déclencher à nouveau une mammitaire, en absence de traitement approprié. L'utilisation d'antibiotiques est réglementée et limitée dans les élevages en raison des risques d'émergence et de propagation de souches résistantes. Il y a donc un réel besoin de développer de nouvelles stratégies de lutte contre ces infections afin de proposer des améliorations voire des alternatives aux traitements antibiotiques (plan d'action Ecoantibio 2012-2017 visant à réduire de 25% la consommation d'antibiotique en médecine

vétérinaire). La mise au point de ces nouvelles stratégies ne se fera qu'à travers une meilleure compréhension des mécanismes de pathogénèse de *S. aureus*.

L'objectif de cette thèse était donc de mieux appréhender l'interaction entre *S. aureus* et son hôte en recherchant les déterminants bactériens impliqués dans le degré de sévérité et la chronicité des mammites. Nous nous sommes, pour cela, appuyé sur 2 modèles. D'un côté, nous avons identifié les facteurs staphylococciques potentiellement impliqués dans la chronicité des mammites chez N305, une souche modèle de mammitte chronique bovine. D'un autre côté, nous avons vérifié l'implication de *sigS*, un gène régulateur, identifié lors d'un précédent projet de thèse dans le laboratoire, dans la sévérité des mammites causées par *S. aureus* chez les ovins.

Cette dernière partie du mémoire permettra de discuter des résultats obtenus au cours de ces travaux et de présenter des perspectives.

Différences de chronicité et/ou sévérité dans les mammites induites par *S. aureus*

Afin d'identifier les facteurs staphylococciques impliqués dans la chronicité, *S. aureus* Newbould 305 (N305), une souche isolée d'une mammitte bovine et induisant de façon reproductible des mammites modérées et chroniques en modèle bovin (Prasad & Newbould, 1968), a été caractérisée. Des approches génomique et protéomique, associées à une caractérisation phénotypique ont été employées et les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour RF122, une souche isolée de mammitte sévère et représentative de la lignée clonale majoritaire associée aux mammites bovines (Herron-Olson *et al.*, 2007).

Selon la littérature scientifique, trois aspects dominants semblent être impliqués dans le caractère chronique de certaines souches telles que N305. Ainsi, la production de molécules cytotoxiques, la formation de biofilms et l'invasion cellulaire peuvent varier en fonction des souches et conduire ainsi à des mammites plus ou moins persistantes.

Au niveau génomique, nous avons réalisé une comparaison du génome de RF122 avec celui récemment obtenu de N305 en ciblant particulièrement les gènes de virulence (*sea*, *hla*, *hlg*, *luk...*), les gènes de formation de biofilm (*ica* et *bap*) ainsi que les gènes impliqués dans l'invasion cellulaire (*fnb*, *clf*, *eap...*). Des différences de nature des gènes de virulence, notamment les toxines staphylococciques, ont été identifiées. Ces différences de composition génique sont à mettre en corrélation avec la différence de contenu en éléments génétiques mobiles entre les deux souches.

Concernant l'équipement génétique, la souche RF122 possède beaucoup de gènes codant des entérotoxines. Ces entérotoxines possèdent une activité super-antigénique impliquée dans la perturbation de la réponse immunitaire (cf Introduction bibliographique)(Ebling *et al.*, 2001; Haenni *et al.*, 2011; Mullarky *et al.*, 2001). De plus, seule RF122 possède les gènes codant la leucotoxine

lukM/F'. Cette leucotoxine est cytotoxique pour les polynucléaires et les monocytes et souvent décrite comme entraînant une forte réaction inflammatoire dans la glande mammaire pouvant aller jusqu'à la mammite gangréneuse (cf Introduction bibliographique)(Fromageau *et al.*, 2010, 2011; Rainard, 2007). A l'inverse, *S. aureus* N305 ne possède que peu de gènes d'entérotoxines. De plus, N305 ne possède pas le gène *lukM*, nécessaire à la formation de la toxine active LukM/F'. Tout comme la souche RF122, la souche N305 possède de nombreux gènes d'hémolysines (*hla*, *hly*, *hlg* avec un effet cytotoxique pour les cellules épithéliales mammaires et les polynucléaires). Toutefois l'analyse du sécrétome révèle une plus grande sécrétion de ces hémolysines par la souche N305, associée à une plus forte cytotoxicité sur CEMb. Ces différences de profil en termes de toxines sont cohérentes avec les différences de tableaux cliniques.

Concernant la capacité à former des biofilms, l'analyse génomique a révélé peu de différences entre RF122 et N305. RF122 possède le gène *aap* qui est absent chez la souche chronique N305. Cependant l'analyse de la capacité des deux souches à former des biofilms, sur des surfaces abiotiques, n'a révélé aucune différence significative dans les conditions testées.

Outre ces différences liées à la cytotoxicité et la formation de biofilms, de nombreuses différences ont été notées sur leur contenu en gènes codant pour des MSCRAMMs. De nombreuses études ont montré l'importance de ces protéines dans la colonisation, l'invasion et la persistance de *S. aureus* dans les tissus de l'hôte (Heilmann, 2011). Notre étude révèle que la souche N305 présente un équipement génétique en MSCRAMMs plus important que la souche RF122. N305 produit notamment les protéines FnbA, FnbB, SasG, et Pls qui participent grandement à l'adhésion et l'internalisation aux cellules épithéliales (Fraunholz & Sinha, 2012; Geoghegan *et al.*, 2010; Sinha & Fraunholz, 2010). De plus, l'analyse de la séquence de *fnbA* a montré que la copie de N305 comporte deux domaines de liaison à la fibronectine de plus que celle de RF122, pouvant lui conférer une affinité supérieure pour la fibronectine. Ce potentiel d'invasion supérieur de la souche chronique N305 a été confirmé sur modèle cellulaire : ses taux d'adhésion et d'internalisation sont significativement supérieurs à ceux de la souche RF122.

Des tests phénotypiques ont également montré une meilleure adaptation de N305 à son hôte bovin. Le gène *vWbp*-bov, une version surnuméraire du gène *vWbp*, a été identifié chez N305, lui permettant de coaguler spécifiquement le plasma de ruminants. Cette capacité peut être impliquée dans la formation d'abcès (Cheng *et al.*, 2010) ce qui offrirait à N305 un avantage supplémentaire pour persister dans le tissu mammaire. Un autre indice de l'adaptation de N305 est sa meilleure capacité à hydrolyser les caséines, probablement due à une sécrétion accrue de protéases à sérine dont certaines (comme SplB) ont une capacité avérée (Reed *et al.*, 2001) à hydrolyser la caséine β , ce qui pourrait constituer un avantage sélectif dans le contexte mammite.

L'ensemble de ces résultats, basés sur des comparaisons *in silico* et *in vitro*, permettent de souligner l'importance de certains facteurs staphylococciques dans la chronicité des mammites. Le modèle cellulaire MAC-T a permis d'identifier qu'une des différences phénotypiques entre ces souches est leur capacité respective à envahir les cellules. Ces résultats montrent que la souche ayant le plus fort potentiel d'adhésion et d'internalisation au tissu (et possédant les gènes associés) est aussi la plus apte à induire des mammites chroniques. Cependant, ces conclusions tirées uniquement d'expériences *in vitro* confortées par des données bibliographiques ne peuvent être directement extrapolées aux phénomènes *in vivo*. De plus, ces observations se basent sur la comparaison de seulement deux souches. Il faudrait pouvoir mener une étude similaire sur plusieurs souches causant des mammites chroniques et plusieurs souches causant des mammites aiguës. Mais les collections de souches de *S. aureus* ne sont pas toujours suffisamment renseignées et, pour le moment, N305 et RF122 sont les seules souches clairement associées à un type ou un autre de mammites (expérimentations animales à l'appui). Malgré tout, ces observations nous permettent d'identifier des étapes du cycle infectieux à cibler pour le développement d'une approche alternative. Les étapes d'adhésion et d'internalisation de *S. aureus* semblent majeures dans le processus infectieux et caractérisent la souche chronique N305.

Un autre mécanisme de persistance de *S. aureus* dans les tissus de l'hôte est la formation de « Small Colony Variants » (SCV). Ainsi les souches isolées d'infections chroniques humaines, telles que les infections ostéo-articulaires (Kalinka *et al.*, 2014), présentent généralement des SCV fortement associés à l'internalisation dans les cellules osseuses (Trouillet *et al.*, 2011). Nous n'avons pas constaté d'apparition de phénotype SCV chez N305, même à l'issue des tests de survie à long terme (6 jours d'internalisation). D'autres conditions expérimentales auraient peut-être permis d'estimer le niveau d'occurrence de ce phénotype chez N305 (vs RF122). Il a en effet été montré que des souches isolées de mammites sont également capables de former des SCV lors d'un passage intracellulaire dans les CEMb (Atalla *et al.*, 2010).

Caractérisation de l'implication du gène *sigS* dans la sévérité des mammites

Afin d'identifier les facteurs staphylococciques impliqués dans la sévérité des mammites ovines, les souches *S. aureus* O11 et O46 ont été décrites et comparées exhaustivement. Ces travaux ont été menés au cours d'une thèse précédente au sein de l'équipe qui a conduit à l'identification de gènes potentiellement impliqués dans la sévérité des mammites. Parmi ceux-ci, nous avons décidé de nous intéresser à *sigS*, un facteur de régulation transcriptionnelle, récemment décrit dans la littérature comme étant impliqué dans la résistance de *S. aureus* aux conditions infectieuses et dans la virulence.

Chez O46, le gène *sigS* est altéré par une délétion de 4 paires de bases qui conduit à une protéine tronquée. Les analyses de séquences de la protéine prédite résultante nous indiquent que le domaine d'interaction du facteur sigma avec l'ARN polymérase n'est pas affecté par cette mutation,

mais que le domaine d'interaction avec l'ADN est absent. Cette même mutation est retrouvée chez 3 autres souches isolées de mammites subcliniques chez des brebis (parmi 12 souches). Cette première observation pourrait laisser penser que l'absence de ce gène ne permet pas à *S. aureus* d'exprimer toute sa virulence. Cependant, il est également juste de penser que si cette mutation, sensée impacter la virulence, a pu subsister et se retrouver dans différents élevages, c'est qu'elle ne représente pas un handicap insurmontable pour la bactérie.

Afin de valider l'une ou l'autre de ces hypothèses, un mutant de *sigS* a été réalisé chez O11 pour recréer la protéine tronquée de O46. Cette mutation « propre » a été obtenue par double recombinaison de façon à reproduire à l'identique la protéine SigS tronquée de O46 et ne laisser aucun gène de résistance à des antibiotiques dans le génome.

Les approches de caractérisation phénotypique de ce mutant n'ont pas permis de mettre en évidence l'implication de ce gène dans la production de toxines, dans la formation de biofilms ou dans une modification des taux d'adhésion et d'internalisation dans les CEMb. Contrairement à ce qui avait été décrit précédemment (Miller *et al.*, 2012; Shaw *et al.*, 2008), aucun impact dans la survie de *S. aureus* n'a été noté lors de stress oxydatifs (H₂O₂, plumbagine), au niveau de la paroi (lysostaphine), au niveau de l'ADN (MMS), en carence de fer ou lors de la survie intracellulaire dans les CEMb.

Lors d'infections expérimentales sur un modèle murin de mammite, l'absence de *sigS* n'empêche pas *S. aureus* O11 de se multiplier et d'envahir le tissu mammaire. Une légère modification dans la réponse inflammatoire a été notée. L'IL-1 β et le TNF α , des marqueurs de l'inflammation, sont moins induits lors d'injections intra-mammaires avec la souche mutée, ce qui est cohérent avec ce qui a déjà été décrit sur *sigS* et le phénotype de mammite modérée associé à la souche O46. Toutefois, il faut rappeler que ces résultats ont été obtenus sur un modèle murin, modèle controversé en raison de la forte différence de réponse immune entre les rongeurs et les ruminants. Il est difficile de généraliser aux ruminants les résultats obtenus sur souris. Par ailleurs, la réponse immunitaire lors d'infections à *S. aureus* peut varier selon le modèle de souris utilisé. Il semble cependant pertinent d'utiliser ce modèle pour des approches préliminaires, pour chercher des différences entre deux souches, en raison du coût d'expérimentation bien inférieur à celui de ruminants pour des infections expérimentales.

En réalisant cette mutation du gène *sigS* dans O11, nous espérons nous rapprocher du phénotype de O46 et ainsi, expliquer une partie des différences de virulence observées. La mutation de *sigS* ne modifie pas la cytotoxicité, ni la capacité à former les biofilms ou envahir les CEM, ni la réponse aux stress que peut rencontrer la bactérie lors de l'infection. Nos différents tests phénotypiques nous ont par contre montré que la souche O46 était plus sensible au stress oxydatif, et qu'elle formait moins efficacement des biofilms que la souche O11. Ces deux caractéristiques sont susceptibles de contribuer à la plus grande virulence de O11 *in vivo* en favorisant sa résistance à la

réponse immunitaire. Mais elles ne sont en aucun cas liées à la présence d'un facteur SigS fonctionnel. Par ailleurs, le mutant $\Delta sigS$ induit moins d'IL-1 β et de TNF α que O11. SigS pourrait donc avoir un rôle dans la réponse inflammatoire de l'hôte. Toutefois ces résultats vont à l'encontre de ce qui avait été décrit précédemment entre O11 et O46 sur le même modèle de mammites où c'est O46 qui induisait la plus forte production de cytokines inflammatoires (Le Maréchal *et al.*, 2011b). Le gène *sigS* ne semble donc pas avoir d'importance majeure dans la sévérité des mammites induites par O11.

Par ailleurs, la même mutation a été retrouvée chez des souches isolées à Taiwan dans des infections systémiques chez l'homme (Chen *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2014). Des souches de *S. aureus* présentant une délétion *sigS* sont donc capables d'induire des infections sévères chez l'homme. Ces souches appartiennent au ST59, le type de CA-MRSA majeur en Asie du Sud-Est, et diffèrent donc radicalement des souches O11 et O46. Il est à noter que les 4 souches ovines présentant la mutation présentent des pulsotypes très proches (Alves *et al.*, 2009). La mutation dans *sigS*, gène qui ne semble pas indispensable à la virulence de *S. aureus*, pourrait ne subir aucune contre-sélection et ainsi se transmettre au sein d'une lignée clonale.

La densité du réseau de régulation génique de *S. aureus* peut constituer une explication à la faible incidence de cette mutation. *S. aureus* possède en effet de nombreux facteurs de régulation, qui forment des réseaux complexes et parfois redondants (Ibarra *et al.*, 2013). Il est possible qu'un autre système de régulation de la virulence prenne le relai lorsque *sigS* est altéré et inversement. En effet, Miller *et al.* ont constaté que la souche RN4220, qui a les systèmes *agr* et *sigB* non fonctionnels, avait un niveau d'expression de *sigS* particulièrement élevé par rapport à d'autres souches modèles (Miller *et al.*, 2012). Il serait donc intéressant de regarder chez les souches mutées au niveau de ce gène (ovines et humaines) si d'autres gènes de régulation, tels que le système *agr*, sont altérés. De plus, la connaissance du régulon de ce gène par des approches microarray ou RNA seq améliorerait grandement la compréhension des mécanismes mis en jeu lors de l'activation de *sigS*.

On peut également se demander si *sigS* est bien un facteur σ dans la mesure où aucun anti- σ n'a été identifié avec ce gène, ce qui est pourtant la norme concernant les facteurs σ ECF. Ce gène pourrait-il être en cours de pseudogénéisation ? La difficulté à trouver des conditions où il est exprimé nous pousse également à nous demander s'il est vraiment fonctionnel dans les souches sauvages.

D'autres facteurs restent à vérifier pour expliquer les différences de virulence entre O11 et O46, notamment les gènes impliqués dans le métabolisme du fer (*isdH*, *feoA*, *hrtB*) qui peuvent être importants pour le développement de *S. aureus* en conditions infectieuses. IsdH tout comme d'autres protéines du système *isd* a été proposé comme candidat pour des solutions vaccinales (Clarke *et al.*, 2006; Ster *et al.*, 2010; Verkaik *et al.*, 2010). Par ailleurs, un prophage, intégré dans le génome de O46, pourrait également perturber l'expression de certains gènes de virulence. Indirectement, il

pourrait également réduire la virulence en perturbant des voies métaboliques, ce qui réduirait le fitness de la bactérie en conditions infectieuses.

Des stratégies thérapeutiques ?

De manière générale, ces travaux nous indiquent que la sévérité et la chronicité des mammites ne reposent pas sur la présence d'un gène particulier mais plutôt sur la capacité des souches de *S. aureus* à exprimer différents facteurs, chacun permettant une meilleure adaptation aux conditions infectieuses. Pour le moment, la lutte contre *S. aureus*, que ce soit lors de mammites ou lors d'infections chez l'homme, repose essentiellement sur l'antibiothérapie. D'autres stratégies préventives sont actuellement étudiées mais nécessitent de plus amples connaissances pour être pleinement efficaces.

L'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* dans les CEMb sont importantes pour la chronicité des infections. Les stratégies pour bloquer ces étapes semblent pertinentes à explorer. En ce sens, la lutte biologique est une piste intéressante car elle vise à utiliser des flores positives, qui sont naturellement présentes dans l'environnement du trayon, pour empêcher l'installation de *S. aureus* dans la glande mammaire. Cela nécessite une connaissance approfondie du microbiote de la mamelle et des mécanismes de colonisation de *S. aureus*. Cette méthode pourrait également être utilisée dans un cadre curatif. En effet, une étude visant à comparer une injection intra-mammaire de bactéries lactiques à une antibiothérapie classique lors de mammites subcliniques a montré que ces deux approches avaient la même efficacité en ce qui concerne l'élimination du pathogène responsable de la mammite (Klostermann *et al.*, 2008).

Les stratégies vaccinales ont eu des succès mitigés du fait de la diversité des souches de *S. aureus*. En effet, l'immunisation contre une souche particulière de mammite ne permet d'avoir une protection efficace que contre des souches proches génétiquement. De même l'utilisation d'une protéine purifiée ne protège que contre les souches possédant la même protéine. Jusqu'à présent, les vaccins développés ont plutôt montré une efficacité dans l'atténuation des symptômes que dans la fréquence de survenue des mammites.

Une stratégie proche de la vaccination viserait à développer des sérums anti-toxines, à injecter dans la mamelle lors d'une mammite. Ces approches ont montré des résultats encourageants avec l'hémolysine alpha dans différentes pathologies chez l'homme (Hua *et al.*, 2014; Tkaczyk *et al.*, 2012, Rasigade, communication personnelle, SympoStaph2014). Une stratégie similaire pourrait être développée contre la mammite, en ciblant des toxines importantes chez les souches bovines telles que les leucotoxines.

ANNEXE 1

Valorisation des travaux de thèse

Valorisation des travaux de Thèse : Publications et Communications

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

V. Peton*, DS. Bouchard*, S. Almeida, L. Rault, H. Falentin, J. Jardin, V. Azevedo, A. Miyoshi, N. Berkova, S. Even and Y. Le Loir. Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. 2014. *Vet Res.* 14;45(1):106.

V. Peton and Y. Le Loir. 2014. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect Genet Evol.* 21:602-15.

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

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

V. Peton, K. Breyne, L. Rault, E. Meyer, K. Demeyere, N. Berkova, S. Even and Y. Le Loir. Disruption of *sigS* gene hardly affects *Staphylococcus aureus* virulence in a mastitis context. **In prep.**

- **Conférence**

V. Peton, DS. Bouchard, S. Almeida, L. Rault, V. Briard-Bion, J. Jardin, H. Falentin, N. Berkova, V. Azevedo, A. Miyoshi, S. Even and Y. Le Loir. Caractérisation moléculaire et phénotypique de *Staphylococcus aureus* Newbould 305, une souche provoquant des mammites chroniques. Colloque International Francophone de Microbiologie Animale, 16-15 mai 2014, Toulouse, France

- **Posters**

- Présentés lors de congrès internationaux

V. Peton*, DS. Bouchard*, S. Almeida, J. Jardin, C. Le Maréchal, A. Miyoshi, V. Azevedo, N. Berkova, L. Rault, P. François, J. Schrenzel, D. Hernandez, S. Even and Y. Le Loir. Molecular and phenotypic comparison of two *Staphylococcus aureus* strains associated to severe or mild mastitis in cows. International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, 26-30 août 2012, Lyon, France

V. Peton, K. Breyne, L. Rault, E. Meyer, K. Demeyere, N. Berkova, S. Even and Y. Le Loir. Rôle du gène sigma S de *Staphylococcus aureus* dans la sévérité des mammites ovines. Colloque International Francophone de Microbiologie Animale, 16-15 mai 2014, Toulouse, France

- Présentés lors de congrès nationaux

V. Peton*, DS. Bouchard*, S. Almeida, J. Jardin, C. Le Maréchal, A. Miyoshi, V. Azevedo, N. Berkova, L. Rault, P. François, J. Schrenzel, D. Hernandez, S. Even and Y. Le Loir. Molecular and phenotypic comparison of two *Staphylococcus aureus* strains associated to severe or mild mastitis in cows. Journées de Microbiologistes de l'INRA, 13-15 novembre 2012, L'Isle-sur-la-Sorgue, France

V. Peton, K. Breyne, L. Rault, E. Meyer, K. Demeyere, N. Berkova, S. Even and Y. Le Loir. Rôle du gène sigma S de *Staphylococcus aureus* dans la sévérité des mammites ovines. SympoStaph, 20-21 octobre 2014, Lyon, France

V. Peton, DS. Bouchard, S. Almeida, L. Rault, V. Briard-Bion, J. Jardin, H. Falentin, N. Berkova, V. Azevedo, A. Miyoshi, S. Even and Y. Le Loir. *Staphylococcus aureus* Newbould 305, une souche associée aux mammites modérées et chroniques, est adaptée pour envahir le tissu mammaire bovin. SympoStaph, 20-21 octobre 2014, Lyon, France

- **Formations annexes**

Séjour d'un mois au laboratoire CERELA (San Miguel de Tucuman, Argentine) pour apprendre les techniques d'inoculations intramammaires de bactéries lactiques sur des vaches lactantes. Formation réalisée dans le cadre d'un projet de partenariat ECOS SUD.

ANNEXE 2

Article de Revue

Staphylococcus aureus in veterinary medicine

Vincent Peton and Yves Le Loir

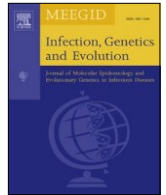
In : Infection, Genetics and Evolution (Volume 21, January 2014, Pages 602–615)

DOI: 10.1016/j.meegid.2013.08.011



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Staphylococcus aureus in veterinary medicine

Vincent Peton, Yves Le Loir [†]

INRA, UMR1253 STLO, F-35042 Rennes, France
 Agrocampus Ouest, UMR1253 STLO, F-35042 Rennes, France



article info

Article history:

Available online 23 August 2013

Keywords:

Staphylococcus aureus
 Host adaptation
 Animal health
 Livestock
 Ruminant
 Poultry

abstract

Staphylococcus aureus is a major opportunistic pathogen in humans and one of the most important pathogenic *Staphylococcus* species in veterinary medicine. *S. aureus* is dangerous because of its deleterious effects on animal health and its potential for transmission from animals to humans and vice-versa. It thus has a huge impact on animal health and welfare and causes major economic losses in livestock production. Increasing attention is therefore being paid to both livestock and companion animals in terms of this pathogen. In this review, we summarise the current knowledge on the animal host adaptation of *S. aureus*. Different types of *S. aureus* infections in animals are also presented, with particular emphasis on mastitis in dairy herds, which is probably the costliest and therefore the best documented *S. aureus* infection seen in animals.

2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. The adaptation of *Staphylococcus aureus* to animal hosts

1.1. Biotypes and host-specific genotypes

S. aureus strains isolated from animal hosts were shown at an early stage to present phenotypic characteristics, which vary depending on the host of origin. Six biotypes were defined and categorised according to their reaction to six simple assays (Table 1): human, **b**-haemolytic human, bovine, ovine-caprine, avian-abattoir and non-host-specific. Since then, this concept of biotypes has not been questioned by other characterisation methods (Devriese, 1984; Isigidi et al., 1990; Shimizu et al., 1991). Indeed, using multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), natural populations of *S. aureus* from humans, cows and sheep have been shown to be indexed according to electrophoretic types that are rarely shared between human and animal strains, suggesting host specificity and a limited transmission of *S. aureus* between the three host species tested (Musser and Selander, 1990). Genotyping methods based on the polymorphism of DNA macrorestriction profiles, such as pulse field gel electrophoresis (PFGE), have confirmed that strains belonging to a given biotype are grouped in the same (or a closely related) pulsotype (Hennekinne et al., 2003). Other DNA-based typing methods such as amplified fragment length polymorphism (AFLP), applied to isolates from farmers, non-farmers and cow mastitis also showed that human isolates were very similar and quite distinct from the cow isolates (Sakwinska et al., 2011).

DNA sequence-based techniques enable determination of a precise and refined population structure. Multi Locus Sequence Typing (MLST) is a powerful typing method, which is widely used for epidemiological studies. The *S. aureus* mlst database (<http://saureus.mlst.net>) now contains more than 2200 different sequence types (ST) determined on strains isolated from a variety of hosts (although human isolates markedly predominate) (McCarthy et al., 2012). MLST data clearly show that some clonal complexes (CC; consisting of closely related ST) are predominant in, and clearly associated with, a given host. Livestock-associated *S. aureus* isolates belong to a small number of clones found in animal hosts (Fitzgerald et al., 1997; McCarthy et al., 2012; Sakwinska et al., 2011). For example, ruminant mastitis isolates are mostly associated with clonal complexes CC97, CC133, CC130, CC126 and CC705. The latter CC705 includes ST151, which comprises isolates that are restricted to cows. Furthermore, isolates belonging to CC133 are found in cows, sheep or goats and are more widely disseminated among ruminant species (Ben Zakour et al., 2008; Guinane et al., 2010).

In addition, *S. aureus* strains isolated from poultry or rabbit infections mostly belong to ST5 and ST121, respectively. Both STs include strains of human origin, suggesting that they share a recent common ancestor (Smyth et al., 2009; Vancraeynest et al., 2006). Recently, strains belonging to CC8 were frequently found in bovine mastitis isolates. CC8 is well documented in human carriage and infections, but despite a close relationship with human CC8, this new bovine CC8 genotype was only found in one of the farmers and non-farmers sampled for the study, suggesting that this new bovine-adapted clone was due to a recent human-to-cow host jump with a loss of the ability to colonise humans (Sakwinska et al., 2011).

[†] Corresponding author at: INRA, UMR1253 STLO, F-35042 Rennes, France. Tel.: +33 2 23 48 59 04; fax: +33 2 23 48 53 50.

E-mail address: yves.leloir@rennes.inra.fr (Y. Le Loir).

Table 1
Phenotypic tests enabling the discrimination of different *S. aureus* biotypes, after Devriese (1984), modified from Devriese et al., Shimizu et al. (1991) and Isigidi et al. (1990).

Biotypes	Phenotypic characteristics			
	Staphylokinase	b-Haemolysin	Coagulation of bovine plasma within 6 h	Type of growth on crystal violet
<i>Host specific</i>				
Human	+			C/A
Human b-haemolytic	+	+		C/A
'True' avian (protein A)/Abattoir (protein A+)				A
Bovine		+	+	A
Ovine		+	+	C
<i>Non host specific</i>				
K ⁻ b ⁺ Bov ⁻ CVType : C		+		C
K ⁻ b ⁺ Bov ⁻ CVType : A		+		A
K ⁺ b ⁻ Bov ⁺ CVType : A	+		+	A
K ⁺ b ⁺ Bov ⁺ CVType : A	+	+	+	A
K ⁻ b ⁻ Bov ⁻ CVType : C				C

Abbreviations: K = staphylokinase; b = b-haemolysin; Bov = coagulation of bovine plasma within 6 h; CV Type = type of growth on nutrient agar with crystal violet.

The construction of phylogenetic trees based on MLST data has shown that most *S. aureus* strains possess a human host association, and that animal-associated strains share lineages that appear to be basically human-specific (Fig. 1) (Shepherd et al., 2013; Smyth et al., 2009). Recent phylogenetic analysis has revealed probable host switching events, including a majority of anthropozoonoses (human-to-animal host jump) and zoonoses (Shepherd et al., 2013).

However, it should be noted that this current image of the population structure must take account of a possible bias induced by the imbalance between the large numbers of human strains present in the mlst database and the still small numbers of animal strains. It appears that animal strains (or at least livestock-associated clones) emerged from human strains following a human-to-animal host jump, with a subsequent specialisation that somehow limited any further reverse transmission from animal-to-human,

as shown for cow-to-human transmission (Sakwinska et al., 2011). Limited transmission has also been shown between other animal hosts, e.g. cat-to-dog transmission (Sasaki et al., 2012). Similarly, studies based on biotype and pulsotype determinations revealed limited poultry-to-human transmission (Rodgers et al., 1999). Nevertheless, *S. aureus* appears to be capable of host jump and adaptation to novel hosts, even after long periods of isolation in a given host species (Shepherd et al., 2013).

Specificity regarding host colonisation was investigated experimentally *in vitro* by assaying the adherence of six *S. aureus* strains belonging to human-associated or pig-associated clonal lineages to human and pig corneocytes, and *in vivo* by determining their vertical transmission in a newborn piglet colonisation model. These combined experiments demonstrated that some lineages have clear host preferences for human (ST22, ST36) or pig (ST433) hosts, whereas others seem to have a broader host range (ST398 and ST8)

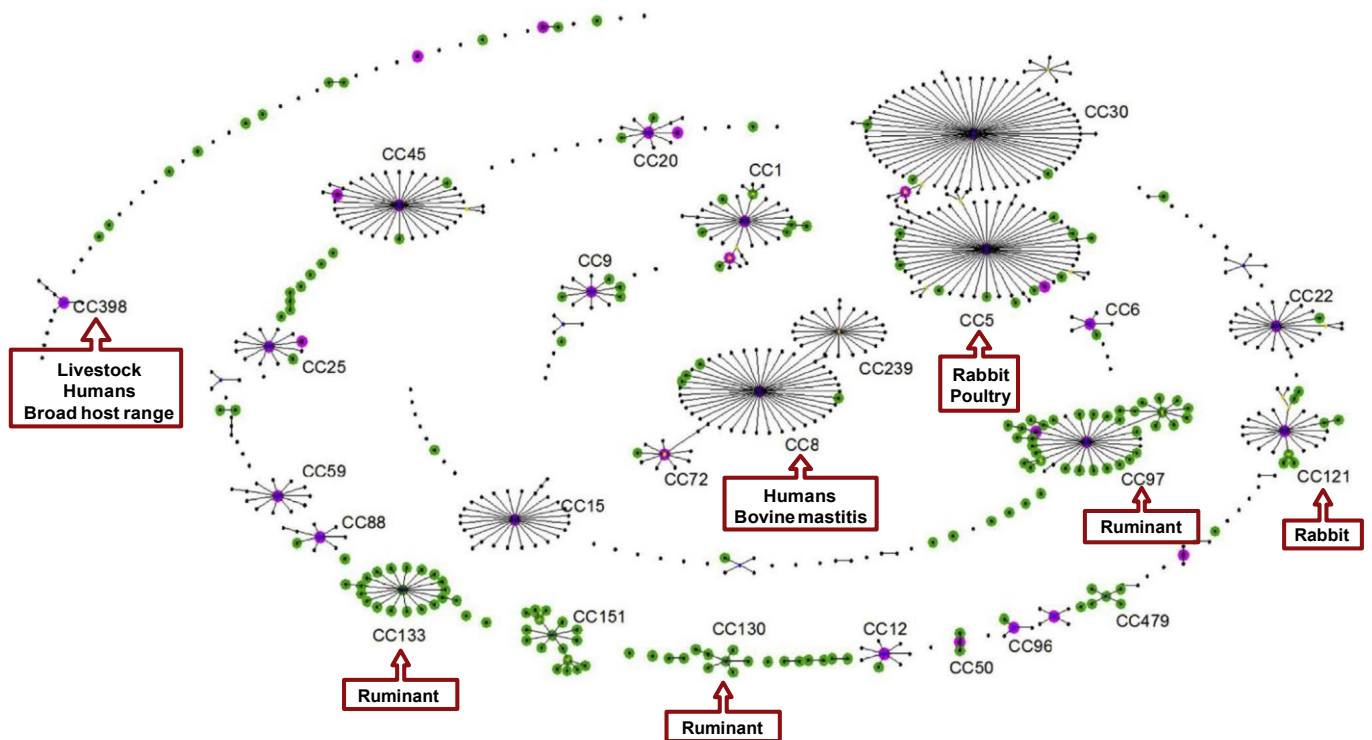


Fig. 1. eBURST plot of 696 STs from human and animal hosts, from Shepherd et al., 2013 (doi: 10.1371/journal.pone.0062369.g002). Comparative eBURST of 696 STs. Genotypes from the human host are shown in black, genotypes from animal hosts are shown in green. Genotypes found in both human and animal hosts are highlighted in pink. The authors have tagged the Clonal Complexes (CC) that predominate in a given animal host (see text for details).

(Moodley et al., 2012). Although host-specific lineages have been described, some therefore appear to lack host tropism. Some CCs are indeed shared between humans and several animal hosts, as has been shown for the ST398 MRSA clone; this lineage emerged in a pig reservoir in the Netherlands in 2004 and rapidly spread worldwide. Its transmission to humans resulted in both healthy carriage and severe infections (Schijffelen et al., 2010). It has since been described in ruminants, poultry, horses and pets (McCarthy et al., 2012).

Similarly, Extended-Host-Spectrum Genotypes (EHSGs) were recently described in *S. aureus* clones involved in canine infections. These dog strains share a high degree of similarity with human strains, regardless of whether they are resistant or susceptible to methicillin (Vincze et al., 2013). It therefore seems that some staphylococcal lineages are host-specific, while others have a broader host range.

1.2 Molecular bases for host specificity

Genome-wide analysis based on comparative genomic hybridization (DNA-DNA hybridisation on microarrays) and/or whole genome PCR scanning have shown that host specificity is reflected at the genome level in terms of genome structure, gene content and allele variations. Taking human isolates as a reference, these studies showed that several genes are conserved in human isolates but have been found to be variable or missing in some animal lineages. There are marked variations in Mobile Genetic Elements (MGEs) between animal and human isolates. Data have also suggested that the exchange of MGEs such as bacteriophage and pathogenicity islands can occur between animal and human lineages. Consistent with MLST data, some animal lineages are closely related to human ones (e.g. bovine strains) whereas others seem to be more host-specific (e.g. small ruminant strains). Furthermore, only a few genes or gene combinations appear to be involved in host adaptation and specificity (Ben Zakour et al., 2008; Sung et al., 2008). These studies showed that the core genome of *S. aureus* is highly conserved and that MGEs are likely to play a central role in host-specific adaptation. The acquisition (or loss) of such element(s) may contribute to the ability of *S. aureus* organisms to colonise particular animal hosts and/or to their ability to cause disease.

Comparative genomic hybridization is limited by the pool of genetic information spotted on the array. Because of the lack of genomic information on animal strains, some host-specific genes may be missing and may not therefore have been identified using this technique.

Recent release of the genome sequences of animal strains has enabled refinements to comparative genomics and functional genomics approaches, which have demonstrated that some *S. aureus* genes indeed evolved according to host-specific diversification, leading to host-specific phenotypes.

1.3 Adaptation to ruminants

In ruminants, *S. aureus* is a major causal agent of mastitis, a well-documented bacterial infection (see paragraph 3 hereafter). Relatively few clonal lineages have been found to be involved in ruminant mastitis, the predominant ones being CC97, ST151, CC130 and CC126 in bovine infections and CC133 in small ruminants.

Genetic analyses have shown that ruminant-associated strains emerged after a human-to-animal host jump, and subsequent adaptive evolution, which gave rise to ruminant-specific clones (Guinane et al., 2010). Weinert et al. combined an estimate of the substitution rates from whole-genome sequences of *S. aureus* with the known dates of isolation, and using a panel of strains

representative of the diversity of *S. aureus* and a method adapted from Bayesian phylogeography showed that transmission from human to bovine hosts occurred 5500 years ago, during the Neolithic revolution and the spread of agriculture throughout the Old World (Weinert et al., 2012).

Genome sequences of ruminant isolates are now available and have helped considerably to clarify the molecular basis of *S. aureus* adaptation to ruminant hosts (Bouchard et al., 2012; Herron-Olson et al., 2007; Le Marechal et al., 2011a,c). In particular, the sequence of ET-3 bovine strain, first sequence of an animal strain to be released, revealed the presence of several MGEs that had not previously been identified in human strains. These included a temperate bacteriophage of bovine origin encoding the LukM and LukF bi-component leukocidin, which displays ruminant-specific features. Indeed, strains isolated from ruminant mastitis frequently produce Leukotoxin LukM/LukF⁰-PV, C-haemolysin and LukE/D. LukM/F⁰-PV is highly active on ruminant neutrophils (Rainard et al., 2003) and is the most cytotoxic leukotoxin on bovine neutrophils (Barrio et al., 2006). The LukM gene is present in almost all strains isolated from sheep mastitis, in 2/3 of the strains isolated from goat mastitis and 10% of strains from bovine mastitis (Rainard et al., 2003). In the context of experimental infections in goats, it was noted that a high production LukM/LukF⁰-PV was associated with the development of gangrenous mastitis (Rainard, 2007). Strains isolated from gangrenous mastitis are usually able to produce high levels of α -haemolysin and LukM/LukF⁰-PV (Le Marechal et al., 2011a,b,c,d; Rainard et al., 2003). However, when injected alone, purified leukotoxin LukM/F⁰ does not trigger inflammation in the bovine mammary gland (Fromageau et al., 2011), suggesting that a combination with other virulence factor(s) is necessary to trigger severe symptoms.

Panton and Valentine Leukotoxin (PVL) is another example of a phage-borne virulence factor. PVL is weakly active on bovine neutrophils, while LukM/F⁰ is weakly active on human polymorphonuclear cells (Prevost et al., 1998). It is therefore not surprising to find the *pvl* gene in the genome of human strains but absent from ruminant strains, while the opposite applies for the *lukM* gene (Bouchard et al., 2012; Fueyo et al., 2005; Guinane et al., 2010; Herron-Olson et al., 2007; Le Marechal et al., 2011b,c).

The distribution of other genes or alleles also varies according to the host, reflecting the implementation of a different infection strategy or resulting from host-pathogen co-evolution (Table 2). One example of divergent adaptation is the bacteriophage-borne immune evasion cluster (IEC), which includes the *scn*, *chp*, *sak* and *sea* genes (van Wamel et al., 2006). Staphylococcal complement inhibitor (SCIN; *scn* product) and the chemotaxis inhibitory protein of *S. aureus* (CHIPS; *chp* product) are highly specific to their human target molecules and do not react with bovine targets (Rooijackers et al., 2005). The peptide sequence of the C5aR receptor, which interacts with CHIPS in humans, differs from that of bovine C5aR. Likewise, the staphylokinase (*sak* gene product) of human strains is not active on ruminant plasminogen (Collen et al., 1993).

S. aureus Pathogenicity Islands (SaPIs) are well-documented MGEs which carry a number of virulence factors, including a handful of host-specific variants of known virulence genes. Viana et al. recently demonstrated that some ruminant and horse strains contained a paralogous von Willebrand factor-binding protein (*vWbp*) gene, *vwb*. These *vwb* alleles are carried by highly mobile SaPIs and their expression is regulated differently from that of the chromosomal copy of *vwb*. These alleles activate ruminant prothrombin and confer ruminant-specific clotting activity on the carrier strains. Interestingly, another *vwb* variant was found to be carried by a horse-specific SaPI (designated SaPIeq1) and was shown to clot both ruminant and equine plasma, while the ruminant allele only coagulated ruminant plasma (Viana et al., 2010).

Table 2
Examples of host-specific traits and their genetic determinants in *S. aureus*

Gene	Function	Host-specificity	Genetic support	Reference
<i>vwb</i>	Plasma clotting	Equine <i>vwb</i> product clots ruminant and equine plasma	SaPleq1	Viana et al. (2010)
<i>selx</i>	Superantigen	Distinct Vb activation profiles for human and bovine lymphocytes	Core genome	Wilson et al. (2011)
Lack of IEC	Immune evasion cluster	Human niche-specific activity	UAvb	Lowder et al. (2009)
Loss of <i>sspA</i> function	Maturation of SspB that contributes to blood clot formation	Absent in poultry strain		Lowder et al. (2009)
Interrupted <i>spA</i>	Adherence to lung epithelium, binding to human platelets, inhibition of opsonophagocytosis resulting from non-specific binding of the Fc region of IgG	Absent in poultry strain	Core genome	Lowder et al. (2009)
<i>lukM-lukF⁰-PV</i>	Cytotoxicity on neutrophils	Most active leukotoxin on ruminant neutrophils	prophage	Barrio et al. (2006) and Rainard et al. (2003)
<i>lukM-lukF⁰</i>	Cytotoxicity on neutrophils	Weakly active on human polymorphonuclear cells	prophage	Prevost et al. (1998)
<i>scn</i>	Staphylococcal complement inhibitor (SCIN)	high specificity for their human target molecules/do not react with bovine targets	prophage	Rooijackers et al. (2005)
<i>chp</i>	chemotaxis inhibitory protein of <i>S. aureus</i> (CHIPS)	high specificity for their human target molecules/do not react with bovine targets	prophage	Rooijackers et al. (2005)
<i>sak</i>	staphylokinase	human strains not active on ruminant plasminogen	prophage	Collen et al. (1993)
<i>pvl</i>	Panton and Valentine Leukotoxin	weakly active on bovine neutrophils	prophage	Prevost et al. (1998)

There are very few genes which encode exoproteins and which can alone distinguish ruminant and human strains: *lukM/F⁰* is not found in strains of human origin, whereas *pvl* is associated with some severe pathological states in humans, but is rarely found in ruminant strains. The *sak* gene is also rare in ruminant strains (Monecke et al., 2007). It should be noted that some strains isolated from mastitis milk carry the *sak* gene: they are probably human strains that contaminated a dairy cow, ruminant strains that have exchanged genetic material with human ones, or strains with a NHS (non-host-specific) biotype. Differences in prevalence also exist for other genes. For example, *tst*, which encodes the superantigen TSST-1, is common among mastitis isolates. It is often associated with superantigen staphylococcal enterotoxin C and L (*sec* and *sel*) in SaPIbov (Fitzgerald et al., 2001). Allelic variants also need to be considered in a more detailed analysis. A bovine variant of *sec* is associated with SaPIbov, and SEC variants induce various responses in terms of the proliferation of human and bovine lymphocytes. SECbov (the SEC bovine variant) requires between 10- and 1000-fold more toxin than SEC1 and the SECovine variant (SECov) to induce the proliferation of human or bovine PBMCs (Deringer et al., 1997). Similarly, *lukD* (Herron et al., 2002) and *hlg* (Fueyo et al., 2005) variants may also be specific to cattle.

Approximately half of mastitis strains carry at least one staphylococcal enterotoxin (SE) gene, with significant variations depending on the region or country (Le Loir et al., 2003). Combinations of SE genes characteristic of SaPIbov, or of the enterotoxin gene clusters (*egc*), are quite frequent in bovine strains (Ote et al., 2011; Smyth et al., 2005) and have also been reported in small ruminant strains (Gharsa et al., 2012; Le Marechal et al., 2011a,c). SEs may play a role in the pathogenesis of mastitis, but the mode of action still needs to be clarified. One hypothesis is that the immunomodulating effect of their superantigenic activity favours a cattle immune response of the Th2 type, which is ineffective in eliminating infection (Park et al., 2006).

Interestingly, staphylococcal enterotoxin-like X, another superantigenic toxin, was recently found outside MGEs, in the *S. aureus* core genome. The *selX* gene is found in 95% of phylogenetically diverse *S. aureus* strains isolated from human and animal infections. It exhibits the characteristic biological activities of a superantigen

(Vb-specific T-cell mitogenicity, pyrogenicity and endotoxin enhancement). However, it has been shown that human- and ruminant-specific clones produce SEIX variants with overlapping but distinct Vb activation profiles for human and bovine lymphocytes. Therefore, the *selx* gene has likely undergone a functional diversification of SEIX in different host species (Wilson et al., 2011).

Virtually all mastitis strains produce toxins that are active on neutrophils. All contain at least one leukotoxin gene: a *hlg* variant is present in all strains, LukED is present in most strains and *lukMF⁰* in 15 – 86% of strains (Monecke et al., 2007; Yamada et al., 2005). The *hla* gene is present in most strains, and *hnb* is more common in strains of bovine origin than those of human origin, and both toxins may play a role in the pathogenesis of mastitis (Bramley et al., 1989).

A significant proportion of mastitis strains (40 – 60%, depending on the reports) are able to form biofilms *in vitro* (Fox et al., 2005; Szwedra et al., 2012). *In vivo* biofilm formation by *S. aureus* may be associated with reduced antimicrobial susceptibility, resulting in disappointing cure rates, especially for infections of long duration (Melchior et al., 2011). Cucarella, et coll. showed that out of a total of 195 mastitis strains, a large proportion (95%) carried the *ica* operon (intercellular adhesin) and some of these strains (25%) also contained the *bap* gene encoding the biofilm-associated protein (Bap), initially identified in a bovine strain (Cucarella et al., 2004). The *bap* gene is associated with a pathogenicity island found in ruminant strains (SaPIbov2), and to date no human strains tested have been found to carry this gene (Latasa et al., 2006; Vauter et al., 2008). Strains carrying *ica* and *bap* seem to induce less severe (moderate inflammation) but persistent mastitis (Cucarella et al., 2004).

This poses the question of whether these characteristics reflect host-specificity or rather a tissue-specificity of these strains in the mammary gland (van Leeuwen et al., 2005). A pulsotype analysis of *S. aureus* strains isolated from nasal discharge and milk samples in various ruminant species has suggested host rather than tissue specificity of the *S. aureus* isolates colonizing ruminant species. It also suggests a limited transmission of these isolates between large (bovine) and small (ovine – caprine) ruminants (Alves et al., 2009).

1.4 Adaptation to poultry

Literature on avian specificity in *S. aureus* is still scarce compared to that regarding ruminant-specific traits. However, recent release of the genome sequence of ED98, a poultry-associated strain (Lowder et al., 2009), has enabled investigation of the evolutionary origin of poultry strains, the identification of host-specific traits, and study of the potential for cross-species transmission.

Genetic analyses showed that the poultry-associated strains (CC5) that predominate today emerged after a human-to-poultry host jump, and subsequent adaptive evolution, leading to poultry-specific clones that are closely related and mainly grouped in CC5, a clonal complex that also comprises human-associated lineages (Lowder et al., 2009). Considering this particular lineage, human to avian host transmission is estimated to have been much more recent than the human-to-ruminant host jump, and occurred

50 years ago (Weinert et al., 2012). This poultry-specific clade most probably resulted from a single human-to-poultry host jump in Eastern Europe, in or near Poland (Fitzgerald, 2012; Lowder et al., 2009). This clade was then rapidly disseminated worldwide thanks to globalisation of the poultry industry. CC5 avian strains have acquired MGEs that are found in neither human nor ruminant strains; they probably originate from resident staphylococcal strains. The genes that are borne by these MGEs may somehow confer selective advantage in the poultry ecological niche. For example, the *scpA* gene encoding a cysteine (thiol) protease initially identified in *S. aureus* CH-91, a strain isolated from a chicken with dermatitis, was specifically found in poultry isolates. It was absent from the now-available whole genome sequences of *S. aureus* and was also shown experimentally to be absent from bovine and porcine strains (Takeuchi et al., 2002). This gene was found to be plasmid-borne (pAVX) in the ED98 genome sequence alongside a putative lipophospholipase gene, widely distributed among CC5 strains. Several other avian-specific genes of unknown function have been found to be borne by other MGEs, such as a novel SaPI (SaPIAv) or prophages, one of which carries a variant of the *ear* gene, encoding a putative β -lactamase, which is found in some ST5 avian strains only, but not in other avian, ruminant or human strains.

As well as gene acquisition, loss of function may also indicate an evolution toward host-adaptation. The production of Staphylococcal protein A, an important virulence factor in human *S. aureus* infections, was shown at an early stage to be absent from poultry isolates and was proposed as an avian-specific trait in the context of biotype definition (Devriese, 1984). SpA binds the Fc region of immunoglobulin G, and plays a role in opsonophagocytosis during *S. aureus* infection in mammalian hosts. Immunoglobulin Y, the avian equivalent of IgG, does not bind SpA, which renders this trait useless in avian hosts (Lowder and Fitzgerald, 2010).

2 *S. aureus* infections in animals

In animals, as in humans, *S. aureus* is found in healthy carriers and can induce a broad panel of infections ranging from superficial skin diseases to deep infections and septicaemia. Virtually any species of warm-blooded animals can be healthy carriers or be infected in the same way by *S. aureus*. The frequency of carriage varies depending on the study, with an average of 20% in humans (Acton et al., 2009). It is estimated at up to 90% in chickens (Nagase et al., 2002), 42% in pigs (Nagase et al., 2002), 29% in sheep (Vautor et al., 2005), between 14% and 23% in cows (Nagase et al., 2002; Roberson et al., 1994) and up to 35% in heifers (the muzzle and the teat being the principal sites) (Roberson et al., 1994). Although rare, cases of *S. aureus* carriage and infections have also been reported in reptiles (Adkesson et al., 2007). In humans, the principal

locations are the nasal cavity, scalp and hands. Increasing numbers of studies are now also focusing on intestinal carriage (Acton et al., 2009). In humans, *S. aureus* carriage may be permanent or intermittent (Creech et al., 2009). A fraction of the human population is never colonised, which suggests that the genetic background of the host interferes with colonisation (van Belkum et al., 2007). As yet, nothing is known regarding these aspects in animals.

The literature on different staphylococcal infections is more or less abundant, depending on the animal species considered. Such disparities may merely reflect the frequency of these infections but can also be correlated to their economic impact on the production chain of a given product (e.g. eggs, meat, milk) and on life expectancy (in farm animals). Indeed, cases of endocarditis or osteomyelitis are rarely reported in farm animals, which most often do not have time to develop such pathologies. Instead, dermatitis is more frequently reported, its visible nature warning the animal owners and breeders who then seek veterinary care.

Some animal species (such as dogs) are more susceptible to coagulase-positive staphylococci other than *S. aureus* (e.g. *S. pseudintermedius* infections) (See Table 3). Since the emergence and spread of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in animals, pets are most often regarded as MRSA carriers in the current literature. They are thus investigated as reservoirs of MRSA and in terms of the risk of transmission from man to animals (Morris et al., 2012) and vice-versa (Bramble et al., 2011). See also Verkade (this issue).

The literature on *S. aureus* in wildlife is scarce, although healthy carriage or infections have been reported in red squirrels (exudative dermatitis; Simpson et al., 2013), black bear (endocarditis; McBurney et al., 2000), zebra (cutaneous granuloma; Pandey et al., 1998), raccoon (Botriomyosis; Hamir, 2010), dolphin (pyogenic meningoencephalitis; Colgrove and Migaki, 1976), harbour seal (systemic infections; Van Pelt and Dietrich, 1973), black rhinoceros (skin lesion, sepsis; Clausen and Ashford, 1980), boars (nasal carriage; Meemken et al., 2013), Rhesus macaques (Nasal carriage; van den Berg et al., 2011), great apes (nasal carriage and sepsis; Nagel et al., 2012), chaffinch (healthy carriage; Paterson et al., 2012), or mallard (sepsis; Wobeser and Kost, 1992).

In the next section, we shall be focusing on the best-documented *S. aureus* infections in important livestock species (including horses and pets to some extent). Because of its huge economic impact, ruminant mastitis has been extensively studied and will be discussed in the third section of this chapter.

Table 3
Most common infections caused by coagulase-positive staphylococci in animals. From Pellerin (2010).

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

2.1 Staphylococcal infections in animals

Skin diseases constitute the bulk of staphylococcal infections reported in animals (Table 3). Suppurative dermatitis (pyoderma), superficial or deep, is reported in livestock (Foster, 2012) and in many other animal species. In dogs, *S. intermedius* and *S. pseudintermedius* are the most frequently encountered and *S. aureus* is more rarely involved. Canine otitis externa is one of the most common disorders encountered in veterinary practice. Infectious otitis externa is usually a secondary complication of primary factors that have triggered inflammation in the ears. *S. pseudintermedius* is often present in healthy ears and is the most common aetiological agent. *S. aureus* is more rarely isolated (Penna et al., 2010).

In horses, *S. aureus* infections such as skin abscess and cellulitis are commonly reported (Devriese et al., 1985). In pigs, exudative epidermitis is a serious infection caused by *Staphylococcus hyicus* strains that produce exfoliative toxins (similar to *S. aureus* exfoliative toxins), which selectively degrade porcine desmoglein 1. Symptoms of this so-called ‘greasy pig disease’ are exfoliation of the skin, erythema and serious exudation. The disease occurs primarily in piglets and may lead to dehydration and death (Fudaba et al., 2005).

S. aureus may also be associated with otorhinolaryngological infections (otitis, upper respiratory tract super-infections in the dog and cat), urinary tract infections in many species, metritis (cow, dog), cystitis (all species), abscesses (perirenal, lung), osteomyelitis or endocarditis, pleurisy, peritonitis, or arthritis, especially in poultry (see below).

S. aureus is also a causal agent of botryomycosis, a pyogranulomatous inflammation of the udder of mares, cows and sows (mastitis) and of the spermatic cord in horses following castration. It has also been reported in wild animals (e.g. raccoon) (Hamir, 2010). It is an unusual response to infection by *S. aureus* (and other bacteria). The eosinophilic granules that form during botryomycosis resemble those of infection by Actinomycetes species. Pulmonary botryomycosis is rare in horses and humans (Bersoff-Matcha et al., 1998), and has rarely been reported in cattle (Miller et al., 2001). Botryomycosis has also been reported in pigs in Denmark, as a commonly observed auricular elephantiasis (lymphoedema caused by an *S. aureus* infection) (Kvist et al., 2002).

In several livestock species, *S. aureus* is a major causal agent of mastitis, a disease that has a huge impact on the economics of milk production. Mastitis is therefore probably one of most documented *S. aureus* diseases in animals (see part 3).

2.2 *S. aureus* infections in rabbits

S. aureus mainly causes skin diseases, abscesses, pododermatitis and mastitis in rabbits (Viana et al., 2007). These infections cause huge economic losses in industrial rabbit flocks. In particular, staphylococcal mastitis is a frequent infectious disease and most often results in the culling of adult does (Rosell and de la Fuente, 2009). To date, antibiotic treatments, disinfection of the cages and environment and vaccination have been ineffective in solving the problems caused by *S. aureus* infection in rabbit flocks (Hermans et al., 2003). Culling the entire flock and restarting with a new population after thorough disinfection remains the only efficient strategy to eliminate *S. aureus* epidemics. Prevention is based on limiting the introduction of new animals and reducing contacts between rabbit flocks.

Several early typing studies revealed the existence of two types of *S. aureus* strains in rabbit flocks. Low virulence strains induce infections affecting a small number of animals whereas high virulence strains cause infection with an epizootic spread throughout a flock (Hermans et al., 2003). In addition to their differences in terms of dissemination, these high and low virulence strains can

reproducibly induce severe or mild symptoms in a rabbit skin infection model, suggesting that they possess distinct virulence properties (yet to be identified) (Meulemans et al., 2007). Both types of strain can be transmitted between rabbits through cages, litter, stable, hairs or food. Direct transmission can also occur between does and suckling young (Hermans et al., 2003).

S. aureus strains isolated from rabbits (faeces, caecum, meat) have been characterised in terms of their antibiotic resistance and susceptibility to bacteriocins (Simonova et al., 2007). Their biotype, genotype and genetic features have also been investigated in order to adapt preventive strategies and to better understand the rapid spread and severity of the infections observed with high virulence strains. Most low virulence strains belong to poultry or human biotypes, whereas high virulence strains belong to a mixed CV-C biotype characterized by **b**-haemolysin production and an absence of staphylokinase activity. Biotyping is however insufficient to fully characterise rabbit strains because the mixed CV-C biotype can be found in both low and high virulence strains (Devriese et al., 1996).

The prevalence of high virulence strains in rabbit flocks with chronic staphylococcosis, and their presence at various body sites (the ear and perineum being the most intensely colonised) suggest that these high virulence strains are better able to colonise rabbit epithelia (Hermans et al., 1999). This ability may explain the successful spread of particular clones (e.g. ST121, the most common) in Europe (Vancraeynest et al., 2006).

As in ruminant, *S. aureus* mastitis in rabbits presents various clinical manifestations. In a recent study, *S. aureus* strains isolated from 178 chronic mastitis cases were genotyped and sequence typed. The most frequent isolates were ST121. The clinical signs differed significantly and enabled the classification of mastitis cases into abscesses, suppurative mastitis with a lobular pattern, cellulitis and mixed lesions. However, none of these lesion types could be related to any of the genotypic differences observed between strains (Viana et al., 2011). Apart from genotype features, genetic determinants underlying the severity of mastitis are still unknown in rabbit *S. aureus* strains.

The principal genotypes found in rabbits differ from those commonly found in humans or ruminants, suggesting the existence of specific host-dependent pathogenic factors (Viana et al., 2007). Identifying such determinants would be of great interest to better understanding the epidemiology of *S. aureus* in rabbit flocks and developing improved preventive strategies. However, this field has so far suffered from a lack of molecular characterisation and genomic data regarding rabbit *S. aureus* strains (to our knowledge, no genome sequences of rabbit isolates are available).

2.3 *S. aureus* infections in small ruminants

In small ruminants, *S. aureus* is a major cause of mastitis (see below). It also causes septicaemia, which may be of thromboembolic origin and derive from primary suppuration or a contamination of medical origin (e.g. contaminated catheter) (Pyrah et al., 1994). *S. aureus* infection may also be secondary to infestation with various parasites (e.g. *Psoroptes ovis*) (Bates, 2003). In lambs, tick pyaemia can be caused by *S. aureus* strains belonging to the normal resident skin flora inoculated by tick bites. Such infections evolve either to fatal toxemia, or to a chronic disease with the formation of disseminated abscesses. In goats too, staphylococcal infection may be secondary to parapox virus infection, leading to chorioptic mange or contagious pustular dermatitis (Foster, 2012).

Staphylococcus aureus subsp. *anaerobius* is the aetiological agent of abscess disease (also called Morel’s disease), a lymphadenitis specific to sheep and goats that mainly affects young animals. *S. aureus* subsp. *anaerobius* is closely related to *S. aureus* and produces extracellular virulence factors that are related to staphylococcal

pathogenicity. Recent results have supported the idea that abscess disease is caused by a single bacterial clone worldwide (ST1464), which has undergone long term adaptation and restriction to small ruminant hosts (de la Fuente et al., 2011).

Abscess disease induces characteristic abscesses in superficial lymph nodes. These abscesses are the only obvious manifestation and are generally located in the lymph nodes of the mandibular region, although they may also be observed in cervical, sub-iliac and popliteal nodes. Abscess disease causes serious economic losses because infected animals have a reduced growth rate and their carcasses are condemned in abattoirs (de la Fuente et al., 2011).

2.4 *S. aureus* infections in poultry

All avian species appear to be susceptible to staphylococcal infections, which are common wherever poultry are raised. *S. aureus* is usually the causal agent of staphylococcal infections in poultry, but other species (*S. hyicus* and *S. cohnii*) may also be found. *S. aureus* is a normal inhabitant of the skin and upper respiratory tract in both diseased and healthy chickens and is present at high levels in poultry house dust and animal feed. Most infections originate from accidental or intentional wounds (debeaking or nail clipping), but can also occur at hatching, following contamination of an open umbilicus. Trauma or stress can compromise the mucosal or skin barriers, thus allowing *S. aureus* to invade the mesoderm, proliferate and trigger inflammation.

The diseases vary depending on where and how the bacteria have entered the host. Infections have been reported in the bones, joints, tendon sheaths, skin, breast, yolk sac, liver, lungs and eyes. Sepsis can occur secondary to skin or mucous membrane infections (Zhu et al., 2001). Predisposing factors (viral infections, stress, immunosuppression or starvation) may contribute to facilitating *S. aureus* infections (Wobeser and Kost, 1992).

Once in the host, *S. aureus* usually moves to the metaphyseal area near a joint, causing osteomyelitis with subsequent spread to the joint. *S. aureus* can cause a local reaction at the point of entry, but its tendency to migrate to the bones and joints is probably the most important sign of this disease. The most common clinical signs of the infection are synovitis with lameness, but can also include infections of the yolk sac and umbilicus. In turkeys, a green coloration of the liver, associated with osteomyelitis and synovitis, is a problem revealed in processing plants and leads to rejection of the product.

Bumblefoot (pododermatitis or foot pad dermatitis, also called claw disease) is probably the most common staphylococcal infection found in poultry (McNamee and Smyth, 2000; Wobeser and Kost, 1992). It has also been reported in various other captive avian species such as raptors or penguins (Erlacher-Reid et al., 2012; Tarullo, 2002). It is characterised by chronic inflammation following an abrasion, with ulceration and swelling of the plantar pads. It causes pain, impedes walking, and subsequently limits access to water and food. Spread of the infection to the internal tissues (mesoderm, tendons and bones) causes osteomyelitis, synovitis, and may be fatal (McNamee and Smyth, 2000).

Wet litter (in floor-housed chickens) or nutrient deficiency (in laying hens) can increase the incidence of bumblefoot (Burger et al., 1984; Martrenchar et al., 2002). In the poultry production chain, bumblefoot causes huge economic losses due to poor growth, field rejection and carcass rejection (Wobeser and Kost, 1992), and many efforts have been made to ensure the early detection and diagnosis of the disease (Wilcox et al., 2009).

3 *S. aureus* and mastitis

Mastitis is the leading cause of economic losses in dairy cattle herds, because of poor yields in the infected udder, veterinary

treatments, milk that must be discarded (contaminated with pathogens and/or with antibiotic residues), and anticipated culling. If the cell concentration (leukocytes) in bulk milk is higher than 400,000/mL, it is considered unfit for human consumption (EEC directive 94/71). As for prevalence, *S. aureus* is one of the three most important mastitis pathogens, alongside *Escherichia coli* and *Streptococcus uberis*. This is true in all the milk producing countries, and even in those which have implemented strict mastitis control programmes. The average annual cost of mastitis in a herd of 100 dairy cows is estimated to be €4896 (Halasa et al., 2009). High prevalence in a dairy herd can be a threat to the sustainability of the livestock.

S. aureus mastitis is also a potential public health problem, since more than half of the strains isolated in milk from infected glands possess enterotoxin genes. Shedding from infected glands into milk is generally moderate (less than 10,000 CFU/mL), but the contamination of bulk milk can lead to staphylococcal food poisoning in fermented raw milk products (Le Loir et al., 2003; Le Marechal et al., 2011d).

Regarding mastitis in dairy ruminants, the epidemiological unit is the herd: infected animals or an infected herd environment cause most outbreaks. Cows may be healthy carriers of *S. aureus* on the teat skin, in the rectum or nasal cavity (Roberson et al., 1994). However, the principal reservoir of *S. aureus* in dairy herds is infected udders and teat skin. Infected animals shed staphylococci in milk, permanently or intermittently, at concentrations that vary considerably from less than 100 CFU to more than 100,000 CFU/mL. Studies have shown that the most contaminated sites in the udder environment are the teat skin and the teat cups of the milking machine. Staphylococci are primarily transmitted udder to udder during milking, via the milking machine or the farmer's hands. Transmission is also possible between herd animals and farmers (Sakwinska et al., 2011). Although *S. aureus* can survive for some time in the environment, this pathogen needs to colonise animals to ensure its survival and multiplication, which is probably why some herds are free of *S. aureus* mastitis.

3.1 Source of contamination

S. aureus is a commensal bacterium of the skin and mucosa in warm-blooded animals. It is able to survive in the environment and be transmitted via the air, contacts between individuals, secretions, etc., but, in both humans and ruminants, the skin and mucous membranes are the principal reservoir of *S. aureus*. Various studies have shown that nasal carriage is an important reservoir in ruminants (Alves et al., 2009; Vautor et al., 2005). For example, a strain isolated from a ewe with gangrenous mastitis was also found in the nostrils of other animals on the same farm (Vautor et al., 2009). An infected mammary gland is of course another important reservoir (Roberson et al., 1994; Vautor et al., 2003). Various staphylococcal species may be identified in the teat before and after milking (Gougoulis et al., 2008; Haveri et al., 2008; Skoufos et al., 2006). Ambient air (Roberson et al., 1994; Vautor et al., 2003), the milking parlour (Vautor et al., 2003), sleeping areas, the presence of abscesses (Vautor et al., 2003) or lesions (Haveri et al., 2008), skin on the hocks or teats skin, the vagina (Capurro et al., 2010), contact between animals or flies (Roberson et al., 1994) can also be sources of contamination by *S. aureus*.

S. aureus remains an important mastitis pathogen in ruminants, although the incidence of staphylococcal mastitis differs markedly between countries and regions, and in different hosts. In dairy cows, *S. aureus* is responsible for between 5% and 30% of cases of clinical mastitis and 5–10% of subclinical mastitis. In small ruminants, the incidence of subclinical mastitis due to *S. aureus* is lower than in bovines, but that of clinical mastitis is higher (Bergonier et al., 2003).

Most infections are established during the first three months of lactation, and approximately 80% of them persist until the end of lactation (Rainard and Poutrel, 1982). If no antibiotic therapy is administered during the dry period, most of these infections will still be present after calving. This lengthy persistence of subclinical mastitis punctuated by clinical episodes explains why older cows are more frequently infected.

3.2 The infective process

The first stage in the infective process is contamination of the teat tip. Colonisation of the teat canal increases the likelihood of infection in this area. After crossing the teat canal, *S. aureus* can obtain access to the lumen of the mammary gland, which always contains milk, even immediately after milking. It should be noted that when bacteria are disseminated beyond the teat canal, a very small number of CFU (fewer than 100) is sufficient to induce a mastitis in a healthy gland, with a probability of success of more than 0.95 (Poutrel and Lerondelle, 1978; Le Marechal et al., 2011b). This suggests, therefore, that the teat canal plays an important role in protecting the udder, and that a healthy udder is highly susceptible to *S. aureus*.

Once they have entered the lumen of the mammary gland, staphylococci can multiply rapidly. It has been shown that a few hours after the inoculation of a few hundred bacteria, the levels of *S. aureus* could reach thousands of CFU/mL of milk. However, in other cases, it may take two or three days before bacteria can be isolated from milk after an experimental infection.

This time lag may be due to the peculiar growth conditions that prevail in milk, where the bioavailability of iron is low (10^{-18} M) due to the high concentration of iron binding proteins such as lactoferrin or transferrin. The addition of an iron chelating agent to a culture medium (other than milk) is therefore used to mimic the conditions encountered in the udder (Le Marechal et al., 2009). Furthermore, the growth of *S. aureus* is possible but is slowed down in the absence of oxygen. In milk, the partial pressure of oxygen is low (23 mm Hg) and it decreases during mastitis, since the oxygen level in mastitis milk is 10 times lower than that of healthy milk (Mayer et al., 1988).

Various hypotheses have been put forward in the literature regarding subsequent stages of the intra-mammary infective process. The next stage may be the adherence of staphylococci to mammary epithelial cells (MEC) in the cisterns and ducts. Several *in vitro* studies have shown that *S. aureus* can adhere to MEC and that its adhesion capacities are strain-dependent (Bouchard et al., 2013; Hensen et al., 2000b). The adherence of staphylococci to the mammary epithelium is not easy to demonstrate *in vivo*. However, several authors have reported the association of *S. aureus* with the mammary epithelium following experimental infection (Hensen et al., 2000b). *S. aureus* may adhere better at sites of microdamage in the epithelium that expose the tissue and extracellular matrix proteins for which *S. aureus* has multiple adhesins.

A further stage may also be the internalisation of *S. aureus* in MEC, which could partly explain the persistence and chronicity of staphylococcal mastitis. Internalisation into host cells is a mechanism used to evade host defences. It is now well established that *S. aureus* can adhere to and internalise in MEC (Bouchard et al., 2013). A gamut of surface-exposed (protein A, fibrinogen- and fibronectin-binding proteins) and secreted (enterotoxins, haemolysins and coagulase) virulence factors allows it to colonise, invade and multiply in host tissues (Heilmann, 2011; Le Marechal et al., 2011b,c).

The invasion of bovine MEC (e.g. MAC-T cell line) *in vitro* may be massive regarding some strains isolated from mastitis (Bouchard et al., 2013). Staphylococci isolated from mastitis can invade bovine MEC in primary culture, and the degree of invasion is

correlated to the efficacy of adhesion (Hensen et al., 2000b). Fibronectin binding proteins appear necessary for adhesion and invasion by *S. aureus* (Lammers et al., 1999). After entering MAC-T cells, staphylococci can escape from the endosome and the cells thus invaded enter apoptosis (Bayles et al., 1998). If apoptosis is followed by exfoliation of the mammary epithelium, this may constitute a mechanism for clearance of the pathogen during milking, but it may also be a means for *S. aureus* to spread within the mammary gland. It has been shown that MEC and macrophages isolated in milk from naturally infected glands contain *S. aureus* cells, and in most cases these bacteria are cultivable, indicating that they can survive within the cells following internalisation (Hebert et al., 2000).

Although the invasion of MEC has not been proven *in vivo*, that of the interstitial tissue has been observed during clinical mastitis: the histological examination of mammary tissue sections revealed staphylococci in clusters in sub-epithelial positions (Hensen et al., 2000a).

The udder is not totally invaded by bacteria. Histological examinations have shown circumscribed sites of infection, and it is probable that this infection spreads into udder tissues via the ducts. However, the vast majority of mammary gland tissues, including the parenchyma, are actually infected. At a later phase in the infective process, *S. aureus* may be organised in micro-colonies that can form a biofilm. But to date, intramammary biofilm formation has remained theoretical and has not been demonstrated *in vivo*.

The inflammatory and immune responses induced by colonisation and invasion of the mammary gland attract polymorphonuclear and other leukocytes (monocytes and lymphocytes) in very large numbers. These cells produce mediators that are responsible for the clinical symptoms, and their antibacterial efficacy determines the course of the infection.

The outcome of *S. aureus* mastitis is highly variable and can range from subclinical to gangrenous mastitis. The severity of mastitis due to *E. coli* is mainly determined by host factors and not by strain features (Burvenich et al., 2003). By contrast, in *S. aureus* mastitis, inter-strain variations exist in terms of virulence potential (Guinane et al., 2008; Le Marechal et al., 2011b,c). Differences in pathogenic potential between otherwise closely related bovine strains correlate with gene content and the levels of cytolytic toxin expression (Guinane et al., 2008). **a**-haemolysin (also called **a**-toxin) seems to play an important role in the severity of mastitis (Zhao and Lacasse, 2008) and **a**-haemolysin producing strains were rapidly associated with gangrenous mastitis. It has been shown that **a**-haemolysin mutants are less virulent in mouse and rabbit models (including those for mastitis), and that immunisation with **a**-haemolysin can control its lethal effects (Menzies and Kernodle, 1996; Patel et al., 1987).

Recent studies have shown that strains isolated from severe mastitis also differ from mild isolates regarding a number of other traits, which include the overproduction of toxins and proteases such as SspB and SspA that belong to a proteolytic cascade involved in blood clot formation. Similarly, it appears that strains associated with severe mastitis have a greater capacity for iron acquisition (Le Marechal et al., 2011b,c).

Most mastitis and human strains congregate in distinct genetic clusters, but there is no significant variation in the distribution of virulence genes (van Leeuwen et al., 2005). However, some general trends can be seen in terms of the equipment found in virulence genes. Exoprotein genes (enzymes or toxins) are not evenly distributed between strains with respect to their human or ruminant origins, while adhesin genes do not seem to show any preferential association. Many exoprotein genes are carried by mobile elements (pathogenicity islands, prophages). *S. aureus* strains share 78% of their genes, but 22% are strain-specific and group in 18 different

chromosomal regions called regions of difference (RD) (Fitzgerald and Musser, 2001). Many of these RDs include mobile genetic elements, which is in line with the important role played by horizontal gene transfer and recombination in the evolution of *S. aureus*. Although some host-specific variants exist for genes such as *vwb* or *sec*, no *S. aureus* virulence factors have to date been specifically associated with mastitis (‘mastitis-specific genes’) when compared with other infections.

3.3 Prophylactic and control methods

Early studies defined control procedures to combat contagious mastitis, whose main reservoir is the infected udder. The principal measures include milking procedures, appropriate teat disinfection after milking, the segregation or reform of infected animals, and preventing the introduction of infected animals in a context of herd turnover. To prevent spread of the infection within the herd, quarters infected with *S. aureus* must be diagnosed rapidly so that they can be treated and the infected animals can be isolated or reformed.

The efficacy of antibiotic therapies varies considerably, from 4% to 92%, depending on the agents used (Barkema et al., 2006). Among intra-mammary infections, *S. aureus* mastitis is the most difficult to treat, with cure rates often lower than 25% during lactation. These failures of antibiotic therapy are not linked to antibiotic resistance. The incidence of antibiotic resistance among ruminant strains is indeed quite low in both large and small ruminants, except for penicillin (25–85% of strains depending on the geographical area) (Alves et al., 2009; Barkema et al., 2006; Moser et al., 2013; Oliveira et al., 2012; Tel et al., 2012). Surprisingly, successful treatment rates are low when mastitis is caused by a penicillin-resistant strain, even when the treatment is not based on antibiotics of the beta-lactam family. Since penicillin-resistance determinants are borne by pathogenicity islands, this phenotype may be accompanied by other virulence genes, which could explain this phenomenon (Barkema et al., 2006). Some authors recommend not treating mastitis caused by *S. aureus* that produces beta-lactamases (Barkema et al., 2006). MRSA strains are still very rare in ruminants. The use of methicillin is banned for the treatment of mastitis in ruminants, and ruminant strains are not subject to the same selective pressure as human strains (Pinto Ferreira et al., 2012). There have been sporadic reports of MRSA in bovine milk and mastitis (see Verkade, (this issue)), often caused by strains from human lineages. Recently, another group of livestock-associated MRSA strains was discovered in dairy cattle in the UK; they were found in a number of *S. aureus* lineages (CC130, ST425, and CC1943) that were thought to be bovine-specific but are carried or found in clinical isolates in humans (García-Alvarez et al., 2011; Holmes and Zadoks, 2011).

Internalisation and intracellular localisation (in neutrophils or MEC), the formation of micro-abscesses or intramammary biofilms, and the in vivo persistence of small colony variants, may explain these treatment failures. Treatment is most frequently

administered via the teat canal (intra-mammary route), sometimes in combination with parenteral therapy.

In order to comply with demands from society and prevent the emergence of resistant strains, alternative methods for mastitis control are currently under investigation in order to reduce the massive use of antibiotics in livestock.

Vaccination would be particularly suited to restricting mammary infections. However, the development of vaccines against staphylococcal mastitis has proved difficult and those currently available only display limited efficacy when used in the field. Vaccination against *S. aureus* mastitis thus remains the Holy Grail, despite the fact that numerous types of vaccines have been tested and reported in the literature (Bharathan and Mullarky, 2011; Pereira et al., 2011).

Some of the first vaccines were bacterins containing one or more killed strains that were generally representative of endemic strains (Lee et al., 2005). Toxoids (inactivated toxins) can also be added to the bacterins. **a** and **b** haemolysins are often used as they are produced by nearly all ruminant strains (Lee et al., 2005; Watson et al., 1996). Capsular polysaccharides have also been tested (Prenafeta et al., 2010). Some commercial vaccines have been developed, based on these approaches (Table 4). However, although they have been shown to reduce the incidence of *S. aureus* mastitis, none is wholly satisfactory and they do not confer total protection against *S. aureus* mastitis (Middleton et al., 2006; Middleton, 2008; Middleton et al., 2009; Pankey et al., 1985). Overall, bacterin toxoid vaccines are effective in enhancing a spontaneous cure and can often significantly reduce SCC and chronic mastitis, but they are not adapted to preventing new cases of mastitis.

Live-attenuated *S. aureus* vaccines have also been trialled, with good results (Buzzola et al., 2006; Pellegrino et al., 2008; Pellegrino et al., 2010). However, most were initially tested on mice, and extrapolating their results from mice to cows has not always produced the results anticipated.

Other studies have reported on the testing of subunit vaccines using a variety of purified antigenic determinants (usually surface proteins). Several adhesin-based vaccines have been tested alone or in combination: FnBP-A (Mamo et al., 1994), CnBP (Mamo et al., 2000), protein A (Pankey et al., 1985), ClfA and capsule (Tuchscher et al., 2008), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GapC/B) (Perez-Casal et al., 2006). These vaccines improved cure rates or reduced the incidence of severe mastitis, the number of bacteria produced and damage to tissue (Mamo et al., 1994; Mamo et al., 2000; Pankey et al., 1985). However, once again, most were only tested in mice and, although promising, the results need to be validated in ruminants. MastaVac, a commercially available vaccine, is based on a recombinant mutant of staphylococcal enterotoxin C (SEC) and has been shown to be effective in preventing new infections due to a virulent *S. aureus* strain that secretes enterotoxins A–D (Chang et al., 2008). Another vaccine based on SEC combined with glutathione-S-transferase is also efficient in altering the course of mastitis (Cui et al., 2010). More recent strategies such as DNA vaccines are also being evaluated. Different

Table 4
Examples of commercial vaccines against *S. aureus* mastitis

Name	Reference	Vaccine composition
Patent No. WO2006106166(A1) Spanish patent No. 9200223	Martinez-Pulgarin et al. (2009) Amorena et al. (1994)	Recombinant live-attenuated <i>S. aureus</i> strain (deleted for <i>katA</i> and <i>hly</i> genes) Inactivated bacteria of <i>S. aureus</i> (1A) and <i>S. simulans</i> (C388), <i>S. aureus</i> exotoxins, dextran sulphate adjuvant, purified exopolysaccharides of <i>S. aureus</i> , liposomes containing polysaccharides
Mastivac I (patent No. PTC/IL98/00627)	Leitner et al. (2003)	Bacterial toxoid vaccine composed of a crude extract of BS449, ZO3984, VLVL8407 and supernatant of VLVL8407 with incomplete Freund's adjuvant
Lysigin /Somato-Staph (US Vet. Lic. No. 124) Ovax MGS	Fatro (Italian company)	Bacterin composed of five <i>S. aureus</i> strains Inactivated <i>S. aureus</i> gangrenous mastitis

surface proteins have been tested in the context of mastitis: clumping factor A (ClfA) (Brouillette et al., 2002), FnBP and ClfA (Shkreta et al., 2004), fibrinogen binding protein (Efb), FnBPA, ClfA and Cna (Castagliuolo et al., 2006), or GapB and GapC (Kerro-Deogo et al., 2006). These DNA vaccines were tested in experimental mastitis in a mice model. But Shkreta et coll. tested the FnBPA and ClfA combination vaccine in cows and showed that although it induced cellular and antibody responses against FnBP and ClfA, it was not fully effective in protecting cows against *S. aureus* infection (Shkreta et al., 2004).

Vaccination is not yet a major prophylactic measure because the protection it endows has not been proven in extensive or independent trials.

In the context of mastitis, this type of approach requires further study in order to gain a clearer understanding of *S. aureus* virulence factors, to identify new candidate vaccines (e.g. through whole genome sequencing and serological proteome analysis (Le Marechal et al., 2011b; Tedeschi et al., 2009)), and to improve vaccination protocols in ruminants.

Other strategies have also been explored, of which the use of lactic acid bacteria as a mammary probiotic is an emerging and promising concept. Intramammary infusions with *Lactococcus lactis* DPC3147 in cows with chronic subclinical or clinical mastitis have been tested and were shown to be active in preventing the onset of mastitis, and to be equally effective as antibiotic therapy for mastitis (Crispie et al., 2008; Klostermann et al., 2008). The intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL 1724 in bovine udders at drying off did not result in any alterations to structural aspects of the udder or the appearance of milk. *L. perolens* was found to associate with epithelial cells without causing any morphological or cellular modifications. Although these techniques are promising, their protective effect still needs to be demonstrated during experimental mastitis challenges (Frola et al., 2013). Similarly, three *Lactobacillus casei* strains were shown to be able to inhibit *S. aureus* adhesion and invasion *in vitro*, in bovine mammary epithelial cells (Bouchard et al., 2013). The use of probiotic LAB therefore appears to constitute a promising alternative for the prevention and treatment of contagious mastitis.

Lactococcal bacteriocins have also been tested as an alternative strategy to prevent mastitis in cows. Lacticin 3147 was combined with teat seal (Crispie et al., 2005) and was shown to be effective in reducing the number of *S. aureus* in a naturally infected teat (Klostermann et al., 2008). Lacticin NK34 was also tested in a mouse model and displayed an 80% survival rate in the treated group versus 7.5% in the control group during experimental *S. aureus* infection (Kim et al., 2010). Nisin, another lactococcal bacteriocin, was tested in a germicidal formulation as a teat dip to prevent mastitis. This germicide was more effective than four other agents containing iodophore (1%, 0.5%, 0.1%) or chlorhexidine digluconate (0.5%), and caused no teat irritation (Sears et al., 1992). Improved cure rates were also obtained in cows suffering from *S. aureus* mastitis (Cao et al., 2007). Nisin is the main active ingredient in Consept (a teat dip; Applied Microbiology, Inc., New York, NY) and Wipe-Out (a wipe; Applied Microbiology) (Ryan et al., 1998).

Tests on phage therapy have been unsuccessful to date. Bacteriophage K, a strictly lytic bacteriophage active on various *S. aureus* strains, was inoculated in the mammary gland of cows suffering from subclinical *S. aureus* mastitis, but was unable to cure the cows. Moreover, phage infusions in healthy mammary glands induced a marked rise in SCC. Similar findings were observed with the use of bacteriophage K to cure experimentally induced mastitis (Lerondelle and Poutrel, 1980). It was shown that whey proteins binding to the surface of *S. aureus* blocked phage attachment, thus explaining the failure of phage therapy in the mammary gland (Gill et al., 2006).

Genetic selection for mastitis resistance in ruminants, based on somatic cell counts (low SCC correlates with low mastitis incidence) (Pantoja et al., 2009), is now being considered for both large and small ruminants (Rupp et al., 2009). Some recent studies also identified quantitative trait loci (QTL) for SCC and clinical mastitis (Sorensen et al., 2008). A more direct strategy is to breed transgenic cows that are able to produce lysostaphin directly in their milk (Wall et al., 2005). The milk produced by these animals was able to lyse *S. aureus* and, in a context of experimental mastitis, the recombinant cows were fully protected against three different *S. aureus* strains. However, the social acceptability of using such animals will be a major barrier in many countries. Other limitations are also the presence of residual lysostaphin, even after cheese making, and the possible development of resistance to lysostaphin by horizontal transfer from coagulase-negative staphylococci (Rainard, 2005).

4 Concluding remarks

S. aureus is a fascinating pathogen whose versatility in terms of infections and hosts makes it a serious threat to animal health, food security and, consequently, human and public health. The genomic analysis of bovine and poultry isolates has helped to demonstrate the human evolutionary origin of some clones, and shed light on the molecular mechanisms underlying host adaptation. These approaches need to be extended to other livestock isolates, and population genomic analysis may contribute to a clearer understanding of how and why some clones spread so efficiently in a given host population. Despite host adaptation and specialisation, some *S. aureus* clones seem to lack specific host tropism and can easily be transmitted from animals to humans and vice-versa. This raises the question of whether *S. aureus* diseases should be regarded as zoonoses or humanoses; nevertheless, this means that *S. aureus* constitutes a paradigm for studies in the framework of the One Health concept, involving close cooperation between experts in animal, human and public health sciences.

Acknowledgements

Vincent Peton is the recipient of a PhD Grant from INRA and Region Bretagne.

References

- Acton, D.S., Plat-Sinnige, M.J., vande, W.W., de, G.N., van, B.A., 2009. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 115–127.
- Adkesson, M.J., Travis, E.K., Weber, M.A., Kirby, J.P., Junge, R.E., 2007. Vacuum-assisted closure for treatment of a deep shell abscess and osteomyelitis in a tortoise. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 231, 1249–1254.
- Alves, P.D., McCulloch, J.A., Even, S., Le, M.C., Thierry, A., Grosset, N., Azevedo, V., Rosa, C.A., Vautor, E., Le Loir, Y., 2009. Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from small and large ruminants reveals a host rather than tissue specificity. *Vet. Microbiol.* 137, 190–195.
- Amorena, B., Baselga, R., Albizu, I., 1994. Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. *Vaccine* 12, 243–249.
- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Zadoks, R.N., 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.
- Barrio, M.B., Rainard, P., Prevost, G., 2006. LukM/LukF^{PV} is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. *Microbes Infect.* 8, 2068–2074.
- Bates, P., 2003. Bacterial associations with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*). *Vet. Rec.* 152, 206–208.
- Bayles, K.W., Wesson, C.A., Liou, L.E., Fox, L.K., Bohach, G.A., Trumble, W.R., 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 66, 336–342.
- Ben Zakour, N.L., Sturdevant, D.E., Even, S., Guinane, C.M., Barbey, C., Alves, P.D., Cochet, M.F., Gautier, M., Otto, M., Fitzgerald, J.R., Le Loir, Y., 2008. Genome-

- wide analysis of ruminant *Staphylococcus aureus* reveals diversification of the core genome. *J. Bacteriol.* 190, 6302 – 6317.
- Bergonier, D., de, C.R., Rupp, R., Lagriffoul, G., Berthelot, X., 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* 34, 689 – 716.
- Bersoff-Matcha, S.J., Roper, C.C., Liapis, H., Little, J.R., 1998. Primary pulmonary botryomycosis: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* 26, 620 – 624.
- Bharathan, M., Mullarky, I.K., 2011. Targeting mucosal immunity in the battle to develop a mastitis vaccine. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16, 409 – 419.
- Bouchard, D., Peton, V., Almeida, S., Le Marechal, C., Miyoshi, A., Azevedo, V., Berkova, N., Rault, L., Francois, P., Schrenzel, J., Even, S., Hernandez, D., Le Loir, Y., 2012. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* newbould 305, a strain associated with mild bovine mastitis. *J. Bacteriol.* 194, 6292 – 6293.
- Bouchard, D.S., Rault, L., Berkova, N., Le Loir, Y., Even, S., 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 877 – 885.
- Bramble, M., Morris, D., Tolomeo, P., Lautenbach, E., 2011. Potential role of pet animals in household transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a narrative review. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 617 – 620.
- Bramley, A.J., Patel, A.H., O' Reilly, M., Foster, R., Foster, T.J., 1989. Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. *Infect. Immun.* 57, 2489 – 2494.
- Brouillette, E., Lacasse, P., Shkreta, L., Belanger, J., Grondin, G., Diarra, M.S., Fournier, S., Talbot, B.G., 2002. DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 20, 2348 – 2357.
- Burger, R.A., Atuahene, Y.O., Arscott, G.H., 1984. Effect of several dermatitis preventing agents on foot pad dermatitis in dwarf and normal sized single comb white Leghorn layers. *Poult. Sci.* 63, 997 – 1002.
- Burvenich, C., Van, M.V., Mehrzad, J., ez-Fraile, A., Duchateau, L., 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34, 521 – 564.
- Buzzola, F.R., Barbagelata, M.S., Caccuri, R.L., Sordelli, D.O., 2006. Attenuation and persistence of and ability to induce protective immunity to a *Staphylococcus aureus* aroA mutant in mice. *Infect. Immun.* 74, 3498 – 3506.
- Cao, L.T., Wu, J.Q., Xie, F., Hu, S.H., Mo, Y., 2007. Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 3980 – 3985.
- Capurro, A., Aspan, A., Ericsson, U.H., Persson, W.K., Artursson, K., 2010. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *J. Dairy Sci.* 93, 180 – 191.
- Castagliuolo, I., Piccinini, R., Beggio, E., Palu, G., Mengoli, C., Ditadi, F., Vicenzoni, G., Zeccoli, A., 2006. Mucosal genetic immunization against four adhesins protects against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Vaccine* 24, 4393 – 4402.
- Chang, B.S., Moon, J.S., Kang, H.M., Kim, Y.I., Lee, H.K., Kim, J.D., Lee, B.S., Koo, H.C., Park, Y.H., 2008. Protective effects of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. *Vaccine* 26, 2081 – 2091.
- Clausen, B., Ashford, W.A., 1980. Bacteriologic survey of black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *J. Wildl. Dis.* 16, 475 – 480.
- Colgrove, G.S., Migaki, G., 1976. Cerebral abscess associated with stranding in a dolphin. *J. Wildl. Dis.* 12, 271 – 274.
- Collen, D., Van, H.B., Schlott, B., Hartmann, M., Guhrs, K.H., Lijnen, H.R., 1993. Mechanisms of activation of mammalian plasma fibrinolytic systems with streptokinase and with recombinant staphylokinase. *Eur. J. Biochem.* 216, 307 – 314.
- Creche, C.B., Johnson, B.G., Alsentzer, A.R., Hohenboken, M., Edwards, K.M., Talbot III, T.R., 2009. Vaccination as infection control: a pilot study to determine the impact of *Staphylococcus aureus* vaccination on nasal carriage. *Vaccine* 28, 256 – 260.
- Crispie, F., Twomey, D., Flynn, J., Hill, C., Ross, P., Meaney, W., 2005. The lantibiotic lactacin 3147 produced in a milk-based medium improves the efficacy of a bismuth-based teat seal in cattle deliberately infected with *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Res.* 72, 159 – 167.
- Crispie, F., Alonso-Gomez, M., O' Loughlin, C., Klostermann, K., Flynn, J., Arkins, S., Meaney, W., Paul, R.R., Hill, C., 2008. Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *J. Dairy Res.* 75, 374 – 384.
- Cucarella, C., Tormo, M.A., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J.R., 2004. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 72, 2177 – 2185.
- Cui, J.C., Zhang, B.J., Lin, Y.C., Wang, Q.K., Qian, A.D., Nakane, A., Hu, D.L., Tong, G.Z., 2010. Protective effect of glutathione S-transferase-fused mutant staphylococcal enterotoxin C against *Staphylococcus aureus*-induced bovine mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135, 64 – 70.
- de la Fuente, R., Ballesteros, C., Bautista, V., Medina, A., Orden, J.A., Dominguez-Bernal, G., Vindel, A., 2011. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* isolates from different countries are clonal in nature. *Vet. Microbiol.* 150, 198 – 202.
- Deringer, J.R., Ely, R.J., Monday, S.R., Stauffacher, C.V., Bohach, G.A., 1997. Vbeta-dependent stimulation of bovine and human T cells by host-specific staphylococcal enterotoxins. *Infect. Immun.* 65, 4048 – 4054.
- Devriese, L.A., 1984. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *J. Appl. Bacteriol.* 56, 215 – 220.
- Devriese, L.A., Nzuambe, D., Godard, C., 1985. Identification and characteristics of staphylococci isolated from lesions and normal skin of horses. *Vet. Microbiol.* 10, 269 – 277.
- Devriese, L.A., Hendrickx, W., Godard, C., Okerman, L., Haesebrouck, F., 1996. A new pathogenic *Staphylococcus aureus* type in commercial rabbits. *Zentralbl. Veterinarmed B* 43, 313 – 315.
- Erlacher-Reid, C., Dunn, J.L., Camp, T., Macha, L., Mazzaro, L., Tuttle, A.D., 2012. Evaluation of potential variables contributing to the development and duration of plantar lesions in a population of aquarium-maintained African penguins (*Spheniscus demersus*). *Zoo Biol.* 31, 291 – 305.
- Fitzgerald, J.R., 2012. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. *Trends Microbiol.* 20, 192 – 198.
- Fitzgerald, J.R., Musser, J.M., 2001. Evolutionary genomics of pathogenic bacteria. *Trends Microbiol.* 9, 547 – 553.
- Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J., Kapur, V., 1997. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol. Infect.* 119, 261 – 269.
- Fitzgerald, J.R., Monday, S.R., Foster, T.J., Bohach, G.A., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Smyth, C.J., 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J. Bacteriol.* 183, 63 – 70.
- Foster, A.P., 2012. Staphylococcal skin disease in livestock. *Vet. Dermatol.* 23 (342 – 51), e63.
- Fox, L.K., Zadoks, R.N., Gaskins, C.T., 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.* 107, 295 – 299 (%20).
- Frola, I.D., Pellegrino, M.S., Magnano, G., Giraud, J.A., Espeche, M.C., Nader-Macias, M.E., Boggi, C.I., 2013. Histological examination of non-lactating bovine udders inoculated with *Lactobacillus perolens* CRL 1724. *J. Dairy Res.* 80, 28 – 35.
- Fromageau, A., Cunha, P., Gilbert, F.B., Rainard, P., 2011. Purified *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM/E^D does not trigger inflammation in the bovine mammary gland. *Microb. Pathog.* 51, 396 – 401.
- Fudaba, Y., Nishifuji, K., Andresen, L.O., Yamaguchi, T., Komatsuzawa, H., Amagai, M., Sugai, M., 2005. *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxins selectively digest porcine desmoglein 1. *Microb. Pathog.* 39, 171 – 176.
- Fueyo, J.M., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., Muniz, J., Alvarez, M.A., Martin, M.C., 2005. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1278 – 1284.
- Garcia-Alvarez, L., Holden, M.T., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F., Curran, M.D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D.J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S.D., Edwards, G.F., Girvan, E.K., Kearns, A.M., Pichon, B., Hill, R.L., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J., Holmes, M.A., 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* 11, 595 – 603.
- Gharsa, H., Ben, S.K., Lozano, C., Gomez-Sanz, E., Klibi, N., Ben, S.R., Gomez, P., Zarazaga, M., Boudabous, A., Torres, C., 2012. Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineages of *Staphylococcus aureus* in healthy sheep in Tunisia. *Vet. Microbiol.* 156, 367 – 373.
- Gill, J.J., Sabour, P.M., Leslie, K.E., Griffiths, M.W., 2006. Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K. *J. Appl. Microbiol.* 101, 377 – 386.
- Gougoulis, D.A., Kyriazakis, I., Tzora, A., Taitzoglou, I.A., Skoufos, J., Fthenakis, G.C., 2008. Effects of lamb sucking on the bacterial flora of teat duct and mammary gland of ewes. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 22 – 26.
- Guinane, C.M., Sturdevant, D.E., Herron-Olson, L., Otto, M., Smyth, D.S., Villaruz, A.E., Kapur, V., Hartigan, P.J., Smyth, C.J., Fitzgerald, J.R., 2008. Pathogenomic analysis of the common bovine *Staphylococcus aureus* clone (ET3): emergence of a virulent subtype with potential risk to public health. *J. Infect. Dis.* 197, 205 – 213.
- Guinane, C.M., Ben Zakour, N.L., Tormo-Mas, M.A., Weinert, L.A., Lowder, B.V., Cartwright, R.A., Smyth, D.S., Smyth, C.J., Lindsay, J.A., Gould, K.A., Witney, A., Hinds, J., Bollback, J.P., Rambaut, A., Penades, J.R., Fitzgerald, J.R., 2010. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol. Evol.* 2, 454 – 466.
- Halasa, T., Nielen, M., De Roos, A.P., Van, H.R., de, J.G., Lam, T.J., van, W.T., Hogeveen, H., Van, H.R., 2009. Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. *J. Dairy Sci.* 92, 599 – 606.
- Hamir, A.N., 2010. Systemic *Staphylococcus aureus* infection in a free-ranging raccoon (*Procyon lotor*). *J. Wildl. Dis.* 46, 665 – 668.
- Haveri, M., Hovinen, M., Roslof, A., Pyoral, S., 2008. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3728 – 3735.
- Hebert, A., Sayasith, K., Senechal, S., Dubreuil, P., Lagace, J., 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol. Lett.* 193, 57 – 62.
- Heilmann, C., 2011. Adhesion mechanisms of staphylococci. *Adv. Exp. Med. Biol.* 715, 105 – 123.
- Hennekinne, J.A., Kerouanton, A., Brisabois, A., De Buyser, M.L., 2003. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J. Appl. Microbiol.* 94, 321 – 329.
- Hensen, S.M., Pavicic, M.J., Lohuis, J.A., de Hoog, J.A., Poutrel, B., 2000a. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J. Dairy Sci.* 83, 1966 – 1975.
- Hensen, S.M., Pavicic, M.J., Lohuis, J.A., Poutrel, B., 2000b. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Dairy Sci.* 83, 418 – 429.

- Hermans, K., De, H.P., Devriese, L.A., Hendrickx, W., Godard, C., Haesebrouck, F., 1999. Colonization of rabbits with *Staphylococcus aureus* in flocks with and without chronic staphylococcosis. *Vet. Microbiol.* 67, 37–46.
- Hermans, K., Devriese, L.A., Haesebrouck, F., 2003. Rabbit staphylococcosis: difficult solutions for serious problems. *Vet. Microbiol.* 91, 57–64.
- Herron, L.L., Chakravarty, R., Dwan, C., Fitzgerald, J.R., Musser, J.M., Retzel, E., Kapur, V., 2002. Genome sequence survey identifies unique sequences and key virulence genes with unusual rates of amino acid substitution in bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immunol.* 70, 3978–3981.
- Herron-Olson, L., Fitzgerald, J.R., Musser, J.M., Kapur, V., 2007. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2, e1120.
- Holmes, M.A., Zadoks, R.N., 2011. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16, 373–382.
- Isigidi, B., Devriese, L., Godard, C., Hoof van, J., 1990. Characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with meat products and meat workers. *Lett. Appl. Microbiol.* 11, 145–147.
- Kerro-Dego, O., Prysliak, T., Potter, A.A., Perez-Casal, J., 2006. DNA-protein immunization against the GapB and GapC proteins of a mastitis isolate of *Staphylococcus aureus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113, 125–138.
- Kim, S.Y., Shin, S., Koo, H.C., Youn, J.H., Paik, H.D., Park, Y.H., 2010. In vitro antimicrobial effect and in vivo preventive and therapeutic effects of partially purified lantibiotic lactacin NK34 against infection by *Staphylococcus aureus* species isolated from bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 93, 3610–3615.
- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R.P., Hill, C., Meaney, W., 2008. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *J. Dairy Res.* 75, 365–373.
- Kvist, P.H., Jensen, E.S., Aalbaek, B., Jensen, H.E., 2002. Evaluation of the pathology, pathogenesis and aetiology of auricular elephantiasis in slaughter pigs. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 49, 517–522.
- Lammers, A., Nuijten, P.J., Smith, H.E., 1999. The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 180, 103–109.
- Latasa, C., Solano, C., Penades, J.R., Lasa, I., 2006. Biofilm-associated proteins. *C. R. Biol.* 329, 849–857.
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2, 63–76.
- Le Marechal, C., Jan, G., Even, S., McCulloch, J.A., Azevedo, V., Thiery, R., Vautor, E., Le Loir, Y., 2009. Development of serological proteome analysis of mastitis by *Staphylococcus aureus* in ewes. *J. Microbiol. Methods* 79, 131–136.
- Le Marechal, C., Hernandez, D., Schrenzel, J., Even, S., Berkova, N., Thiery, R., Vautor, E., Fitzgerald, J.R., Francois, P., Le Loir, Y., 2011a. Genome sequences of two *Staphylococcus aureus* ovine strains that induce severe (strain O11) and mild (strain O46) mastitis. *J. Bacteriol.* 193, 2353–2354.
- Le Marechal, C., Jardin, J., Jan, G., Even, S., Pulido, C., Guibert, J.-M., Hernandez, D., Francois, P., Schrenzel, J., Demon, D., Meyer, E., Berkova, N., Thiery, R., Vautor, E., Le Loir, Y., 2011b. *Staphylococcus aureus* seroproteomes discriminate ruminant isolates causing mild or severe mastitis. *Vet. Res.* 42, 35–55.
- Le Marechal, C., Seyffert, N., Jardin, J., Hernandez, D., Jan, G., Rault, L., Azevedo, V., Francois, P., Schrenzel, J., van de Guchte, M., Even, S., Berkova, N., Thiery, R., Fitzgerald, J.R., Vautor, E., Le Loir, Y., 2011c. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS One* 6, e27354.
- Le Marechal, C., Thiery, R., Vautor, E., Le Loir, Y., 2011d. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. *Dairy Sci. Technol.* 91, 247–282.
- Lee, J.W., O'Brien, C.N., Guidry, A.J., Paape, M.J., Shafer-Weaver, K.A., Zhao, X., 2005. Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. *Can. J. Vet. Res.* 69, 11–18.
- Leitner, G., Yadin, N., Lubashevsky, E., Ezra, E., Glickman, A., Chaffer, M., Winkler, M., Saran, A., Trainin, Z., 2003. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. II field trial. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 93, 153–158.
- Lerondelle, C., Poutrel, B., 1980. Bacteriophage treatment trials on staphylococcal udder infection in lactating cows (author's transl). *Ann. Rech. Vet.* 11, 421–426.
- Lowder, B.V., Fitzgerald, J.R., 2010. Human origin for avian pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Virulence* 1, 283–284.
- Lowder, B.V., Guinane, C.M., Ben Zakour, N.L., Weinert, L.A., Conway-Morris, A., Cartwright, R.A., Simpson, A.J., Rambaut, A., Nubel, U., Fitzgerald, J.R., 2009. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 19545–19550.
- Mamo, W., Boden, M., Flock, J.I., 1994. Vaccination with *Staphylococcus aureus* fibrinogen binding proteins (FgBPs) reduces colonisation of *S. aureus* in a mouse mastitis model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 10, 47–53.
- Mamo, W., Froman, G., Muller, H.P., 2000. Protection induced in mice vaccinated with recombinant collagen-binding protein (CnBP) and alpha-toxoid against intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* 44, 381–384.
- Martinez-Pulgarin, S., Dominguez-Bernal, G., Orden, J.A., de la, F.R., 2009. Simultaneous lack of catalase and beta-toxin in *Staphylococcus aureus* leads to increased intracellular survival in macrophages and epithelial cells and to attenuated virulence in murine and ovine models. *Microbiology* 155, 1505–1515.
- Martrenchar, A., Boilletot, E., Huonnic, D., Pol, F., 2002. Risk factors for foot-pad dermatitis in chicken and turkey broilers in France. *Prev. Vet. Med.* 52, 213–226.
- Mayer, S.J., Waterman, A.E., Keen, P.M., Craven, N., Bourne, F.J., 1988. Oxygen concentration in milk of healthy and mastitic cows and implications of low oxygen tension for the killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils. *J. Dairy Res.* 55, 513–519.
- McBurney, S., Veitch, A.M., Daoust, P.Y., 2000. Bacterial valvular endocarditis in a black bear from Labrador. *J. Wildl. Dis.* 36, 788–791.
- McCarthy, A.J., Lindsay, J.A., Loeffler, A., 2012. Are all methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) equal in all hosts? Epidemiological and genetic comparison between animal and human MRSA. *Vet. Dermatol.* 23, 267–274.
- McNamee, P.T., Smyth, J.A., 2000. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis ('femoral head necrosis') of broiler chickens: a review. *Avian Pathol.* 29, 253–270.
- Meemken, D., Blaha, T., Hotzel, H., Strommenger, B., Klein, G., Ehrlich, R., Monecke, S., Kehrenberg, C., 2013. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from wild boars. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1739–1742.
- Melchior, M.B., van Osch, M.H., Lam, T.J., Vernooij, J.C., Gastra, W., Fink-Gremmels, J., 2011. Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility. *J. Dairy Sci.* 94, 5926–5937.
- Menzies, B.E., Kernodle, D.S., 1996. Passive immunization with antiserum to a nontoxic alpha-toxin mutant from *Staphylococcus aureus* is protective in a murine model. *Infect. Immun.* 64, 1839–1841.
- Meulemans, L., Hermans, K., Duchateau, L., Haesebrouck, F., 2007. High and low virulence *Staphylococcus aureus* strains in a rabbit skin infection model. *Vet. Microbiol.* 125, 333–340.
- Middleton, J.R., 2008. *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 7, 805–815.
- Middleton, J.R., Ma, J., Rinehart, C.L., Taylor, V.N., Luby, C.D., Steevens, B.J., 2006. Efficacy of different Lysigin formulations in the prevention of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy heifers. *J. Dairy Res.* 73, 10–19.
- Middleton, J.R., Luby, C.D., Adams, D.S., 2009. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data. *Vet. Microbiol.* 134, 192–198.
- Miller, M.A., Fales, W.H., Tyler, J.W., Suedmeyer, W.K., 2001. Pulmonary botryomycosis in a Scottish highland steer. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 74–76.
- Monecke, S., Kuhnert, P., Hotzel, H., Slickers, P., Ehrlich, R., 2007. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Vet. Microbiol.* 125, 128–140.
- Moodley, A., Espinosa-Gongora, C., Nielsen, S.S., McCarthy, A.J., Lindsay, J.A., Guardabassi, L., 2012. Comparative host specificity of human- and pig-associated *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *PLoS One* 7, e49344.
- Morris, D.O., Lautenbach, E., Zaoutis, T., Leckerman, K., Edelstein, P.H., Rankin, S.C., 2012. Potential for pet animals to harbour methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* when residing with human MRSA patients. *Zoonoses Public Health* 59, 286–293.
- Moser, A., Stephan, R., Corti, S., Johler, S., 2013. Comparison of genomic and antimicrobial resistance features of latex agglutination test-positive and latex agglutination test-negative *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 96, 329–334.
- Musser, J.M., Selander, R.K., 1990. Genetic analysis of natural populations of *Staphylococcus aureus*. In: Novick, R.P. (Ed.), *Molecular Biology of the Staphylococci*, New York, VCH Publishers, pp. 59–68.
- Nagase, N., Sasaki, A., Yamashita, K., Shimizu, A., Wakita, Y., Kitai, S., Kawano, J., 2002. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 245–250.
- Nagel, M., Dischinger, J., Turck, M., Verrier, D., Oedenkoven, M., Ngoubangoye, B., Le, F.G., Drexler, J.F., Bierbaum, G., Gonzalez, J.P., 2012. Human-associated *Staphylococcus aureus* strains within great ape populations in Central Africa (Gabon). *Clin. Microbiol. Infect.*
- Oliveira, L., Langoni, H., Hulland, C., Ruegg, P.L., 2012. Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 95, 1913–1920.
- Ote, I., Taminiou, B., Duprez, J.N., Dizier, I., Mainil, J.G., 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 153, 285–292.
- Pandey, G.S., Nomura, Y., Kobayashi, K., Fujise, H., Yamada, T., 1998. Cutaneous staphylococcal granuloma in a free living zebra (*Equus burchelli*) in Zambia. *J. Vet. Med. Sci.* 60, 137–138.
- Pankey, J.W., Boddie, N.T., Watts, J.L., Nickerson, S.C., 1985. Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. *J. Dairy Sci.* 68, 726–731.
- Pantoja, J.C., Hulland, C., Ruegg, P.L., 2009. Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 92, 139–148.
- Park, Y.H., Lee, S.U., Ferens, W.A., Samuels, S., Davis, W.C., Fox, L.K., Ahn, J.S., Seo, K.S., Chang, B.S., Hwang, S.Y., Bohach, G.A., 2006. Unique features of bovine lymphocytes exposed to a staphylococcal enterotoxin. *J. Vet. Sci.* 7, 233–239.
- Patel, A.H., Nowlan, P., Weavers, E.D., Foster, T., 1987. Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. *Infect. Immun.* 55, 3103–3110.
- Paterson, G.K., Larsen, A.R., Robb, A., Edwards, G.E., Pennycott, T.W., Foster, G., Mot, D., Hermans, K., Baert, K., Peacock, S.J., Parkhill, J., Zadoks, R.N., Holmes, M.A., 2012. The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2809–2813.

- Pellegrino, M., Giraudo, J., Raspanti, C., Nagel, R., Odierno, L., Primo, V., Bogno, C., 2008. Experimental trial in heifers vaccinated with *Staphylococcus aureus* avirulent mutant against bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 127, 186–190.
- Pellegrino, M., Giraudo, J., Raspanti, C., Odierno, L., Bogno, C., 2010. Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. *Vaccine* 28, 4523–4528.
- Pellerin, J.L., 2010. Infections à *Staphylococcus aureus* chez l'animal (hors mammifères). In: Le Loir, Y., Gautier, M. (Eds.), *Staphylococcus aureus*. Lavoisier, Paris, pp. 203–210.
- Penna, B., Vargas, R., Medeiros, L., Martins, G.M., Martins, R.R., Lilienbaum, W., 2010. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Vet. Dermatol.* 21, 292–296.
- Pereira, U.P., Oliveira, D.G., Mesquita, L.R., Costa, G.M., Pereira, L.J., 2011. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: a systematic review. *Vet. Microbiol.* 148, 117–124.
- Perez-Casal, J., Prysliak, T., Kerro-Dego, O., Potter, A.A., 2006. Immune responses to a *Staphylococcus aureus* GapC/B chimera and its potential use as a component of a vaccine for *S. aureus* mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 109, 85–97.
- Pinto Ferreira, J., Correa, M.T., Lyman, R., Anderson, K.L., 2012. A review of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in dairy cattle. *Bovine Pract.* 46, 1–9.
- Poutrel, B., Lerondelle, C., 1978. Induced staphylococcal infections in the bovine mammary gland. Influence of the month of lactation and other factors related to the cow. *Ann. Rech. Vet.* 9, 119–128.
- Prenafeta, A., March, R., Foix, A., Casals, I., Costa, L., 2010. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 134, 208–217.
- Prevost, G., Colin, D.A., Staali, L., Baba, M.L., Gravel, A., Werner, S., Sanni, A., Meunier, O., Monteil, H., 1998. Pore-forming leukotoxins from *Staphylococcus aureus*: variability of the target cells and 2 pharmacological processes. *Pathol. Biol. (Paris)* 46, 435–441.
- Pyrh, I.T., Scott, P.R., Penny, C.D., 1994. Possible involvement of *Staphylococcus aureus* as a primary pathogen in lamb septicaemia. *Vet. Rec.* 134, 679–680.
- Rainard, P., 2005. Tackling mastitis in dairy cows. *Nat. Biotechnol.* 23, 430–432.
- Rainard, P., 2007. *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM/F⁺ is secreted and stimulates neutralising antibody response in the course of intramammary infection. *Vet. Res.* 38, 685–696.
- Rainard, P., Poutrel, B., 1982. Dynamics of nonclinical bovine intramammary infections with major and minor pathogens. *Am. J. Vet. Res.* 43, 2143–2146.
- Rainard, P., Corrales, J.C., Barrio, M.B., Cochar, 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.
- Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M., Besser, T.E., 1994. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 77, 3354–3364.
- Rodgers, J.D., McCullagh, J.J., McNamee, P.T., Smyth, J.A., Ball, H.J., 1999. Comparison of *Staphylococcus aureus* recovered from personnel in a poultry hatchery and in broiler parent farms with those isolated from skeletal disease in broilers. *Vet. Microbiol.* 69, 189–198.
- Rooijackers, S.H., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M.R., Presanis, J.S., Sim, R.B., van Wamel, W.J., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A., 2005. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat. Immunol.* 6, 920–927.
- Rosell, J.M., de la Fuente, L.F., 2009. Culling and mortality in breeding rabbits. *Prev. Vet. Med.* 88, 120–127.
- Rupp, R., Bergonier, D., Dion, S., Hygonenq, M.C., Aurel, M.R., Robert-Granic, C., Foucras, G., 2009. Response to somatic cell count-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment in sheep. *J. Dairy Sci.* 92, 1203–1219.
- Ryan, M.P., Meaney, W.J., Ross, R.P., Hill, C., 1998. Evaluation of lactacin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2287–2290.
- Sakwinska, O., Giddey, M., Moreillon, M., Morisset, D., Waldvogel, A., Moreillon, P., 2011. *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5908–5915.
- Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Ohtsuka, M., Hongo, I., Fukata, T., Kabeya, H., Maruyama, S., Hiramatsu, K., 2012. Population genetic structures of *Staphylococcus aureus* isolates from cats and dogs in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2152–2155.
- Schijffelen, M.J., Boel, C.H., van Strijp, J.A., Fluit, A.C., 2010. Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis. *BMC Genomics* 11, 376.
- Sears, P.M., Smith, B.S., Stewart, W.K., Gonzalez, R.N., Rubino, S.D., Gusik, S.A., Kulisek, E.S., Projan, S.J., Blackburn, P., 1992. Evaluation of a nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows. *J. Dairy Sci.* 75, 3185–3190.
- Shepherd, M.A., Fleming, V.M., Connor, T.R., Corander, J., Feil, E.J., Fraser, C., Hanage, W.P., 2013. Historical zoonoses and other changes in host tropism of *Staphylococcus aureus*, identified by phylogenetic analysis of a population dataset. *PLoS One* 8, e62369.
- Shimizu, A., Kawano, J., Ozaki, J., Sasaki, N., Kimura, S., Kamada, M., Anzai, S., Saito, H., Sato, H., 1991. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from lesions of horses. *J. Vet. Med. Sci.* 53, 601–606.
- Shkreta, L., Talbot, B.G., Diarra, M.S., Lacasse, P., 2004. Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. *Vaccine* 23, 114–126.
- Simonova, M., Fotta, M., Laukova, A., 2007. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from rabbits. *Folia Microbiol. (Praha)* 52, 291–296.
- Simpson, V.R., Davison, N.J., Kearns, A.M., Pichon, B., Hudson, L.O., Koyle, M., Blackett, T., Butler, H., Rasigade, J.P., Whatmore, A.M., 2013. Association of a lukM-positive clone of *Staphylococcus aureus* with fatal exudative dermatitis in red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *Vet. Microbiol.* 162, 987–991.
- Skoufos, I., Voidarou, C., Bezirtzoglou, E., Tzora, A., 2006. Effects of machine-milking on the bacterial flora of teat duct and mammary gland of ewes. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 499–501.
- Smyth, D.S., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Fitzgerald, J.R., Deobald, C.F., Bohach, G.A., Smyth, C.J., 2005. Superantigen genes encoded by the egc cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *J. Med. Microbiol.* 54, 401–411.
- Smyth, D.S., Feil, E.J., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Tollersrud, T., Fitzgerald, J.R., Enright, M.C., Smyth, C.J., 2009. Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 58, 1343–1353.
- Sorensen, L.P., Guldbandsen, B., Thomsen, J.R., Lund, M.S., 2008. Pathogen-specific effects of quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in Danish Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 91, 2493–2500.
- Sung, J.M., Lloyd, D.H., Lindsay, J.A., 2008. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology* 154, 1949–1959.
- Szweda, P., Schielmann, M., Milewski, S., Frankowska, A., Jakubczak, A., 2012. Biofilm production and presence of ica and bap genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the Eastern Poland. *Pol. J. Microbiol.* 61, 65–69.
- Takeuchi, S., Matsunaga, K., Inubushi, S., Higuchi, H., Imaizumi, K., Kaidoh, T., 2002. Structural gene and strain specificity of a novel cysteine protease produced by *Staphylococcus aureus* isolated from a diseased chicken. *Vet. Microbiol.* 89, 201–210.
- Tarello, W., 2002. A possible relationship between bumblefoot responsive to potassium arsenite and micrococci in the blood of three birds of prey. *Acta Vet. Hung.* 50, 143–150.
- Tedeschi, G., Taverna, F., Negri, A., Piccinini, R., Nonnis, S., Ronchi, S., Zecconi, A., 2009. Serological proteome analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis. *Vet. Microbiol.* 134, 388–391.
- Tel, O.Y., Aslantas, O., Keskin, O., Yilmaz, E.S., Demir, C., 2012. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from gangrenous mastitis of ewes. *Acta Vet. Hung.* 60, 189–197.
- Tuchscherer, L.P., Buzzola, F.R., Alvarez, L.P., Lee, J.C., Sordelli, D.O., 2008. Antibodies to capsular polysaccharide and clumping factor A prevent mastitis and the emergence of unencapsulated and small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in mice. *Infect. Immun.* 76, 5738–5744.
- van Belkum, A., Emonts, M., Wertheim, H., de Jongh, C., Nouwen, J., Bartels, H., Cole, A., Cole, A., Hermans, P., Boelens, H., Toom, N.L., Snijders, S., Verbrugh, H., van Leeuwen, W., 2007. The role of human innate immune factors in nasal colonization by *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.* 9, 1471–1477.
- van den Berg, S., van Wamel, W.J., Snijders, S.V., Ouwering, B., de Vogel, C.P., Boelens, H.A., Willems, R.J., Huijsdens, X.W., Verreck, F.A., Kondova, I., Heidt, P.J., Verbrugh, H.A., van Belkum, A., 2011. Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) are natural hosts of specific *Staphylococcus aureus* lineages. *PLoS One* 6, e26170.
- van Leeuwen, W.B., Melles, D.C., Alaidan, A., Al-Ahdal, M., Boelens, H.A., Snijders, S.V., Wertheim, H., van, D.E., Peeters, J.K., van der Spek, P.J., Gorkink, R., Simons, G., Verbrugh, H.A., van, B.A., 2005. Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187, 4584–4591.
- Van Pelt, R.W., Dietrich, R.A., 1973. Staphylococcal infection and toxoplasmosis in a young harbor seal. *J. Wildl. Dis.* 9, 258–261.
- van Wamel, W.J., Rooijackers, S.H., Ruyken, M., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A., 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J. Bacteriol.* 188, 1310–1315.
- Vancraeynest, D., Haesebrouck, F., Deplano, A., Denis, O., Godard, C., Wildemaue, C., Hermans, K., 2006. International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 418–422.
- Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J.M., Huard, C., Pepin, M., 2003. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 96, 69–79.
- Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J.M., Chevalier, N., Pepin, M., 2005. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy sheep. *Vet. Microbiol.* 106, 235–239.
- Vautor, E., Abadie, G., Pont, A., Thiery, R., 2008. Evaluation of the presence of the bap gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Vet. Microbiol.* 127, 407–411.
- Vautor, E., Cockfield, J., Le Marechal, C., Le Loir, Y., Chevalier, M., Robinson, D.A., Thiery, R., Lindsay, J., 2009. Difference in virulence between *Staphylococcus aureus* isolates causing gangrenous mastitis versus subclinical mastitis in a dairy sheep flock. *Vet. Res.* 40, 56.
- Verkade, E., Kluytmans, J. in this Special Issue (<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.02.013>).
- Viana, D., Selva, L., Segura, P., Penades, J.R., Corpa, J.M., 2007. Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbit lesions. *Vet. Microbiol.* 121, 288–298.

- Viana, D., Blanco, J., Tormo-Mas, M.A., Selva, L., Guinane, C.M., Baselga, R., Corpa, J., Lasa, I., Novick, R.P., Fitzgerald, J.R., Penades, J.R., 2010. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. *Mol. Microbiol.* 77, 1583 – 1594.
- Viana, D., Selva, L., Callanan, J.J., Guerrero, I., Ferrian, S., Corpa, J.M., 2011. Strains of *Staphylococcus aureus* and pathology associated with chronic suppurative mastitis in rabbits. *Vet. J.* 190, 403 – 407.
- Vincze, S., Stamm, I., Monecke, S., Kopp, P.A., Semmler, T., Wieler, L.H., Lubke-Becker, A., Walther, B., 2013. Molecular analysis of human and canine *Staphylococcus aureus* strains reveals distinct extended-host-spectrum genotypes independent of their methicillin resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 655 – 662.
- Wall, R.J., Powell, A.M., Paape, M.J., Kerr, D.E., Bannerman, D.D., Pursel, V.G., Wells, K.D., Talbot, N., Hawk, H.W., 2005. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat. Biotechnol.* 23, 445 – 451.
- Watson, D.L., McColl, M.L., Davies, H.I., 1996. Field trial of a staphylococcal mastitis vaccine in dairy herds: clinical, subclinical and microbiological assessments. *Aust. Vet. J.* 74, 447 – 450.
- Weinert, L.A., Welch, J.J., Suchard, M.A., Lemey, P., Rambaut, A., Fitzgerald, J.R., 2012. Molecular dating of human-to-bovid host jumps by *Staphylococcus aureus* reveals an association with the spread of domestication. *Biol. Lett.* 8, 829 – 832.
- Wilcox, C.S., Patterson, J., Cheng, H.W., 2009. Use of thermography to screen for subclinical bumblefoot in poultry. *Poult. Sci.* 88, 1176 – 1180.
- Wilson, G.J., Seo, K.S., Cartwright, R.A., Connelley, T., Chuang-Smith, O.N., Merriman, J.A., Guinane, C.M., Park, J.Y., Bohach, G.A., Schlievert, P.M., Morrison, W.I., Fitzgerald, J.R., 2011. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS Pathog.* 7, e1002271.
- Wobeser, G., Kost, W., 1992. Starvation, staphylococcosis, and vitamin A deficiency among mallards overwintering in Saskatchewan. *J. Wildl. Dis.* 28, 215 – 222.
- Yamada, T., Tochimarui, N., Nakasuji, S., Hata, E., Kobayashi, H., Eguchi, M., Kaneko, J., Kamio, Y., Kaidoh, T., Takeuchi, S., 2005. Leukotoxin family genes in *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and prevalence of lukM-lukF-PV genes by bacteriophages in bovine isolates. *Vet. Microbiol.* 110, 97 – 103.
- Zhao, X., Lacasse, P., 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Anim. Sci.* 86, 57 – 65.
- Zhu, X.Y., Wu, C.C., Hester, P.Y., 2001. Systemic distribution of *Staphylococcus aureus* following intradermal footpad challenge of broilers. *Poult. Sci.* 80, 145 – 150.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acton, D. S., Plat-Sinnige, M. J. T., Wamel, W. van, Groot, N. de & Belkum, A. van. (2009).** Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**, 115–127.
- Adkesson, M. J., Travis, E. K., Weber, M. A., Kirby, J. P. & Junge, R. E.. (2007).** Vacuum-assisted closure for treatment of a deep shell abscess and osteomyelitis in a tortoise. *J Am Vet Med Assoc* **231**, 1249–1254.
- Allard, M., Moisan, H., Brouillette, É., Gervais, A. L., Jacques, M., Lacasse, P., Diarra, M. S. & Malouin, F.. (2006).** Transcriptional modulation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated genes during growth *in vitro* and in a tissue cage model *in vivo*. *Microbes Infect* **8**, 1679–1690.
- Allard, M., Ster, C., Jacob, C. L., Scholl, D., Diarra, M. S., Lacasse, P. & Malouin, F.. (2013).** The expression of a putative exotoxin and an ABC transporter during bovine intramammary infection contributes to the virulence of *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol* **162**, 761–770.
- Almeida, R. A., Matthews, K. R., Cifrian, E., Guidry, A. J. & Oliver, S. P.. (1996).** *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* **79**, 1021–1026.
- Almeida, R. A., Matthews, K. R. & Oliver, S. P.. (1997).** Eukaryotic and prokaryotic cell functions required for invasion of *Staphylococcus aureus* into bovine mammary epithelial cells. *J Vet Med Ser B* **44**, 139–145.
- Almeida, R. A. & Oliver, S. P.. (2006).** Trafficking of *Streptococcus uberis* in bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog* **41**, 80–89.
- Almeida, R. A., Dogan, B., Klaessing, S., Schukken, Y. H. & Oliver, S. P.. (2011).** Intracellular fate of strains of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with acute or chronic mastitis. *Vet Res Commun* **35**, 89–101.
- Alonzo, F. I., Kozhaya, L., Rawlings, S. A., Reyes-Robles, T., DuMont, A. L., Myszka, D. G., Landau, N., Unutmaz, D. & Torres, V. J.. (2013).** CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. *Nature* **493**, 51–55.
- Alves, P. D. D., McCulloch, J. A., Even, S., Le Maréchal, C., Thierry, A., Grosset, N., Azevedo, V., Rosa, C. A., Vautor, E. & Le Loir, Y.. (2009).** Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from small and large ruminants reveals a host rather than tissue specificity. *Vet Microbiol* **137**, 190–195.
- Amorena, B., Baselga, R. & Albizu, I. (1994).** Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. *Vaccine* **12**, 243–249.
- Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J. & Hultgren, S. J.. (2003).** Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* **301**, 105–107.
- Anderson, G. G., Goller, C. C., Justice, S., Hultgren, S. J. & Seed, P. C.. (2010).** Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. *Infect Immun* **78**, 963–975.
- Anderson, K. L., Smith, A. R., Shanks, R. D., Whitmore, H. L., Davis, L. E. & Gustafsson, B. K.. (1986).** Endotoxin-induced bovine mastitis: immunoglobulins, phagocytosis, and effect of flunixin meglumine. *Am J Vet Res* **47**, 2405–2410.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodríguez-Quñones, F.. (2003).** Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 215–237.
- Argudín, M. A., Tenhagen, B.-A., Fetsch, A., Sachsenroder, J., Kasbohrer, A., Schroeter, A., Hammerl, J. A., Hertwig, S., Helmuth, R. & other authors. (2011).** Virulence and resistance determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from nonhuman sources. *Appl Environ Microbiol* **77**, 3052–3060.

- Armand-Lefevre, L., Ruimy, R. & Andremont, A. (2005).** Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg Infect Dis* **11**, 711–714.
- Atalla, H., Gyles, C., Jacob, C. L., Moisan, H., Malouin, F. & Mallard, B. (2008).** Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. *Foodborne Pathog Dis* **5**, 785–799.
- Atalla, H., Gyles, C., Wilkie, B., Leslie, K. & Mallard, B. (2009).** Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection of dairy cows with a *Staphylococcus aureus* small colony variant (*S. aureus* SCV) in comparison to other bovine strains. *Vet Microbiol* **137**, 326–334.
- Atalla, H., Gyles, C. & Mallard, B. (2010).** Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol* **143**, 319–328.
- Atkins, K. L., Burman, J. D., Chamberlain, E. S., Cooper, J. E., Poutrel, B., Bagby, S., Jenkins, A. T. A., Feil, E. J. & van den Elsen, J. M. H. (2008).** *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: Host specificity and mechanisms of immune complex formation. *Mol Immunol* **45**, 1600–1611.
- Bannerman, D. D., Paape, M. J., Lee, J.-W., Zhao, X., Hope, J. C. & Rainard, P. (2004).** *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**, 463–472.
- Bannerman, D. D., Paape, M. J. & Chockalingam, A. (2006).** *Staphylococcus aureus* intramammary infection elicits increased production of transforming growth factor- α , β 1, and β 2. *Vet Immunol Immunopathol* **112**, 309–315.
- Bardiau, M., Detilleux, J., Farnir, F., Mainil, J. G. & Ote, I. (2014).** Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol* **169**, 74–79.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H. & Zadoks, R. N. (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.
- Barrio, M. B., Rainard, P. & Prévost, G. (2006).** LukM/LukF'-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. *Microbes Infect* **8**, 2068–2074.
- Barrot-Debreil, E. (2008).** *Les analyses bactériologiques du lait des infections mammaires bovines applicables au cabinet vétérinaire en pratique courante et leurs intérêts dans le traitement des mammites*. Thèse de doctorat, France: École nationale vétérinaire d'Alfort.
- Basheer, R. & Iordanescu, S. (1991).** The *Staphylococcus aureus* chromosomal gene *plaC*, identified by mutations amplifying plasmid pT181, encodes a sigma factor. *Nucleic Acids Res* **19**, 4921–4924.
- Bates, P. (2003).** Bacterial associations with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*). *Vet Rec* **152**, 206–208.
- Bayles, K. W., Wesson, C. A., Liou, L. E., Fox, L. K., Bohach, G. A. & Trumble, W. R. (1998).** Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* **66**, 336–342.
- Beasley, F. C. & Heinrichs, D. E. (2010).** Siderophore-mediated iron acquisition in the staphylococci. *J Inorg Biochem*, 2nd Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry **104**, 282–288.
- Beasley, F. C., Marolda, C. L., Cheung, J., Buac, S. & Heinrichs, D. E. (2011).** *Staphylococcus aureus* transporters Hts, Sir, and Sst capture iron liberated from human transferrin by

- staphyloferrin A, staphyloferrin B, and catecholamine stress hormones, respectively, and contribute to virulence. *Infect Immun* **79**, 2345–2355.
- Becker, K., Ballhausen, B., Köck, R. & Kriegeskorte, A. (2014).** Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: The ‘mec alphabet’ with specific consideration of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Int J Med Microbiol*.
- Bens, C. C. P. M., Voss, A. & Klaassen, C. H. W. (2006).** Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Clin Microbiol* **44**, 1875–1876.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H. & other authors. (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141–147.
- Bergonier, D., de Crommoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G. & Berthelot, X. (2003).** Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res* **34**, 689–716.
- Bersoff-Matcha, S. J., Roper, C. C., Liapis, H. & Little, J. R. (1998).** Primary pulmonary botryomycosis: case report and review. *Clin Infect Dis* **26**, 620–624.
- Bhakdi, S. & Tranum-Jensen, J. (1991).** Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* **55**, 733–751.
- Bharathan, M. & Mullarky, I. K. (2011).** Targeting mucosal immunity in the battle to develop a mastitis vaccine. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **16**, 409–419.
- Bishop, J. G., Schanbacher, F. L., Ferguson, L. C. & Smith, K. L. (1976).** *In vitro* growth inhibition of mastitis-causing coliform bacteria by bovine apo-lactoferrin and reversal of inhibition by citrate and high concentrations of apo-lactoferrin. *Infect Immun* **14**, 911–918.
- Blum, S., Sela, N., Heller, E. D., Sela, S. & Leitner, G. (2012).** Genome analysis of bovine-mastitis-associated *Escherichia coli* O32:H37 strain P4. *J Bacteriol* **194**, 3732.
- Boichard, D. & Brochard, M. (2012).** New phenotypes for new breeding goals in dairy cattle. *Anim Int J Anim Biosci* **6**, 544–550.
- Boisset, S., Geissmann, T., Huntzinger, E., Fechter, P., Bendridi, N., Possedko, M., Chevalier, C., Helfer, A. C., Benito, Y. & other authors. (2007).** *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* **21**, 1353–1366.
- Bouchard, D., Peton, V., Almeida, S., Le Marechal, C., Miyoshi, A., Azevedo, V., Berkova, N., Rault, L., Francois, P. & other authors. (2012).** Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild bovine mastitis. *J Bacteriol* **194**, 6292–6293.
- Bouchard, D. S., Rault, L., Berkova, N., Le Loir, Y. & Even, S. (2013).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol* **79**, 877–885.
- Bramble, M., Morris, D., Tolomeo, P. & Lautenbach, E. (2010).** Potential role of pet animals in household transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A narrative review. *Vector-Borne Zoonotic Dis* **11**, 617–620.
- Bramley, A. J. (1976).** Variations in the susceptibility of lactating and non-lactating bovine udders to infection when infused with *Escherichia coli*. *J Dairy Res* **43**, 205–211.
- Bramley, A. J., Patel, A. H., O’Reilly, M., Foster, R. & Foster, T. J. (1989).** Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. *Infect Immun* **57**, 2489–2494.

- Brenaut, P., Lefèvre, L., Rau, A., Laloë, D., Pisoni, G., Moroni, P., Bevilacqua, C. & Martin, P.** (2014). Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. *Vet Res* **45**, 16.
- Brouillette, E., Lacasse, P., Shkreta, L., Bélanger, J., Grondin, G., Diarra, M. S., Fournier, S. & Talbot, B. G.** (2002). DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* **20**, 2348–2357.
- Brown, K. L. & Hughes, K. T.** (1995). The role of anti-sigma factors in gene regulation. *Mol Microbiol* **16**, 397–404.
- Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A. & Duchateau, L.** (2003). Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* **34**, 521–564.
- Buxton, T. B., Horner, J., Hinton, A. & Rissing, J. P.** (1987). *In vivo* glycocalyx expression by *Staphylococcus aureus* phage type 52/52A/80 in *S. aureus* osteomyelitis. *J Infect Dis* **156**, 942–946.
- Buzzola, F. R., Alvarez, L. P., Tuchscher, L. P. N., Barbagelata, M. S., Lattar, S. M., Calvino, L. & Sordelli, D. O.** (2007). Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse *agr* groups to invade mammary epithelial cells. *Infect Immun* **75**, 886–891.
- Camussone, C. M., Veaute, C. M., Porporatto, C., Morein, B., Marcipar, I. S. & Calvino, L. F.** (2013). Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell vaccine formulated with ISCOMATRIX™ adjuvant. *J Dairy Res* **80**, 72–80.
- Camussone, C. M., Veaute, C. M., Pujato, N., Morein, B., Marcipar, I. S. & Calvino, L. F.** (2014). Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell and lysate vaccine formulated with ISCOM Matrix adjuvant. *Res Vet Sci* **96**, 86–94.
- Cao, L. T., Wu, J. Q., Xie, F., Hu, S. H. & Mo, Y.** (2007). Efficacy of Nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* **90**, 3980–3985.
- Carroll, R. K., Rivera, F. E., Cavaco, C. K., Johnson, G. M., Martin, D. & Shaw, L. N.** (2014). The lone S41 family C-terminal processing protease in *Staphylococcus aureus* is localized to the cell wall and contributes to virulence. *Microbiol Read Engl*.
- Cassat, J. E., Hammer, N. D., Campbell, J. P., Benson, M. A., Perrien, D. S., Mrak, L. N., Smeltzer, M. S., Torres, V. J. & Skaar, E. P.** (2013). A secreted bacterial protease tailors the *Staphylococcus aureus* virulence repertoire to modulate bone remodeling during osteomyelitis. *Cell Host Microbe* **13**, 759–772.
- Castagliuolo, I., Piccinini, R., Beggiao, E., Palù, G., Mengoli, C., Ditadi, F., Vicenzoni, G. & Zecconi, A.** (2006). Mucosal genetic immunization against four adhesins protects against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Vaccine* **24**, 4393–4402.
- Chambers, H. F. & Deleo, F. R.** (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* **7**, 629–641.
- Chambers, H. F.** (2001). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* **7**, 178–182.
- Chaneton, L., Tirante, L., Maito, J., Chaves, J. & Bussmann, L. E.** (2008). Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. *J Dairy Sci* **91**, 1865–1873.
- Chang, B. S., Moon, J. S., Kang, H.-M., Kim, Y.-I., Lee, H.-K., Kim, J.-D., Lee, B.-S., Koo, H. C. & Park, Y. H.** (2008). Protective effects of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. *Vaccine* **26**, 2081–2091.
- Chavakis, T., Hussain, M., Kanse, S. M., Peters, G., Bretzel, R. G., Flock, J.-I., Herrmann, M. & Preissner, K. T.** (2002). *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as

- anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* **8**, 687–693.
- Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K. T. & Herrmann, M. (2005).** *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium. The role of bacterial ‘Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules’ (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost.*
- Chen, C.-J., Unger, C., Hoffmann, W., Lindsay, J. A., Huang, Y.-C. & Gotz, F. (2013).** Characterization and comparison of 2 distinct epidemic Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clones of ST59 lineage. *PLoS ONE* **8**.
- Cheng, A. G., Kim, H. K., Burts, M. L., Krausz, T., Schneewind, O. & Missiakas, D. M. (2009).** Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues. *FASEB J* **23**, 3393–3404.
- Cheng, A. G., McAdow, M., Kim, H. K., Bae, T., Missiakas, D. M. & Schneewind, O. (2010).** Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. *PLoS Pathog* **6**, e1001036.
- Cheung, A. L., Bayer, A. S., Zhang, G., Gresham, H. & Xiong, Y.-Q. (2004).** Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **40**, 1–9.
- Cheung, A. L., Yang, S.-J., Bayer, A. S. & Xiong, Y. Q. (2009).** Disparity in the *in vitro* versus *in vivo* regulation of fibronectin-binding proteins by 2 global regulators, *saeRS* and *sigB*, in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **200**, 1371–1374.
- Cheung, G. Y. C., Duong, A. C. & Otto, M. (2012a).** Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes Infect Inst Pasteur* **14**, 380–386.
- Cheung, J., Murphy, M. E. P. & Heinrichs, D. E. (2012b).** Discovery of an iron-regulated citrate synthase in *Staphylococcus aureus*. *Chem Biol* **19**, 1568–1578.
- Choorit, W., Kaneko, J., Muramoto, K. & Kamio, Y. (1995).** Existence of a new protein component with the same function as the LukF component of leukocidin or γ -hemolysin and its gene in *Staphylococcus aureus* P83. *FEBS Lett* **357**, 260–264.
- Cifrian, E., Guidry, A. J., Bramley, A. J., Norcross, N. L., Bastida-Corcuera, F. D. & Marquardt, W. W. (1996).** Effect of staphylococcal beta toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol* **48**, 187–198.
- Clarke, S. R., Brummell, K. J., Horsburgh, M. J., McDowell, P. W., Mohamad, S. A. S., Stapleton, M. R., Acevedo, J., Read, R. C., Day, N. P. J. & other authors. (2006).** Identification of *in vivo*-expressed antigens of *Staphylococcus aureus* and their use in vaccinations for protection against nasal carriage. *J Infect Dis* **193**, 1098–1108.
- Claro, T., Widaa, A., O’Seaghdha, M., Miajlovic, H., Foster, T. J., O’Brien, F. J. & Kerrigan, S. W. (2011).** *Staphylococcus aureus* protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis. *PloS One* **6**, e18748.
- Clausen, B. & Ashford, W. A. (1980).** Bacteriologic survey of black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *J Wildl Dis* **16**, 475–480.
- Clement, S., Vaudaux, P., François, P., Schrenzel, J., Huggler, E., Kampf, S., Chaponnier, C., Lew, D. & Lacroix, J.-S. (2005).** Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J Infect Dis* **192**, 1023–1028.
- CNIEL. (2014).** *L’économie laitière en chiffres – édition 2014*, 2014th edn.
- Cockfield, J. D., Pathak, S., Edgeworth, J. D. & Lindsay, J. A. (2007).** Rapid determination of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *J Med Microbiol* **56**, 614–619.

- Colgrove, G. S. & Migaki, G.. (1976).** Cerebral abscess associated with stranding in a dolphin. *J Wildl Dis* **12**, 271–274.
- Collen, D., Van Hoef, B., Schlott, B., Hartmann, M., Gührs, K.-H. & Lijnen, H. R. (1993).** Mechanisms of activation of mammalian plasma fibrinolytic systems with streptokinase and with recombinant staphylokinase. *Eur J Biochem* **216**, 307–314.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318–1322.
- Creech, C. B. I., Johnson, B. G., Alsentzer, A. R., Hohenboken, M., Edwards, K. M. & Talbot III, T. R. (2009).** Vaccination as infection control: A pilot study to determine the impact of *Staphylococcus aureus* vaccination on nasal carriage. *Vaccine* **28**, 256–260.
- Crispie, F., Twomey, D., Flynn, J., Hill, C., Ross, P. & Meaney, W. (2005).** The lantibiotic lactacin 3147 produced in a milk-based medium improves the efficacy of a bismuth-based teat seal in cattle deliberately infected with *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Res* **72**, 159–167.
- Crispie, F., Alonso-Gómez, M., O’Loughlin, C., Klostermann, K., Flynn, J., Arkins, S., Meaney, W., Paul Ross, R. & Hill, C. (2008).** Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *J Dairy Res* **75**, 374–384.
- Cucarella, C., Tormo, M. Á., Úbeda, C., Trotonda, M. P., Monzón, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, Í. & Penadés, J. R. (2004).** Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **72**, 2177–2185.
- Cui, J.-C., Zhang, B.-J., Lin, Y.-C., Wang, Q.-K., Qian, A.-D., Nakane, A., Hu, D.-L. & Tong, G.-Z. (2010).** Protective effect of glutathione S-transferase-fused mutant staphylococcal enterotoxin C against *Staphylococcus aureus*-induced bovine mastitis. *Vet Immunol Immunopathol* **135**, 64–70.
- Dale, S. E., Sebulsky, M. T. & Heinrichs, D. E. (2004).** Involvement of SirABC in iron-siderophore import in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **186**, 8356–8362.
- Dalla Serra, M., Coraiola, M., Viero, G., Comai, M., Potrich, C., Ferreras, M., Baba-Moussa, L., Colin, D. A., Menestrina, G. & other authors. (2005).** *Staphylococcus aureus* bicomponent γ -hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, can form mixed pores containing all components. *J Chem Inf Model* **45**, 1539–1545.
- DeLaval. (2014).** La glande mammaire.
- Deora, R. & Misra, T. K. (1996).** Characterization of the primary sigma factor of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **271**, 21828–21834.
- Depke, M., Burian, M., Schäfer, T., Bröker, B. M., Ohlsen, K. & Völker, U. (2012).** The alternative sigma factor B modulates virulence gene expression in a murine *Staphylococcus aureus* infection model but does not influence kidney gene expression pattern of the host. *Int J Med Microbiol IJMM* **302**, 33–39.
- Deringer, J. R., Ely, R. J., Monday, S. R., Stauffacher, C. V. & Bohach, G. A. (1997).** Vbeta-dependent stimulation of bovine and human T cells by host-specific staphylococcal enterotoxins. *Infect Immun* **65**, 4048–4054.
- Devriese, L. A. (1984).** A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *J Appl Bacteriol* **56**, 215–220.
- Devriese, L. A., Van Damme, L. R. & Fameree, L. (1972).** Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B J Vet Med Ser B* **19**, 598–605.
- Devriese, L. A., Nzuambe, D. & Godard, C. (1985).** Identification and characteristics of staphylococci isolated from lesions and normal skin of horses. *Vet Microbiol* **10**, 269–277.

- De la Fuente, R., Díez, R. M., Domínguez-Bernal, G., Orden, J. A. & Martínez-Pulgarín, S. (2010).** Restoring catalase activity in *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* leads to loss of pathogenicity for lambs. *Vet Res* **41**, 41.
- De la Fuente, R., Ballesteros, C., Bautista, V., Medina, A., Orden, J. A., Domínguez-Bernal, G. & Vindel, A. (2011).** *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* isolates from different countries are clonal in nature. *Vet Microbiol* **150**, 198–202.
- Dias, R. S., Eller, M. R., Duarte, V. S., Pereira, A. L., Silva, C. C., Mantovani, H. C., Oliveira, L. L., de A. M Silva, E. & De Paula, S. O. (2013).** Use of phages against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J Anim Sci* **91**, 3930–3939.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M. & Schlievert, P. M. (2000).** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* **13**, 16–34.
- Dogan, B., Klaessig, S., Rishniw, M., Almeida, R. A., Oliver, S. P., Simpson, K. & Schukken, Y. H. (2006).** Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Vet Microbiol* **116**, 270–282.
- Dogan, B., Rishniw, M., Bruant, G., Harel, J., Schukken, Y. H. & Simpson, K. W. (2012).** Phylogroup and *lpfA* influence epithelial invasion by mastitis associated *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* **159**, 163–170.
- Döpfer, D., Nederbragt, H., Almeida, R. A. & Gaastra, W. (2001).** Studies about the mechanism of internalization by mammary epithelial cells of *Escherichia coli* isolated from persistent bovine mastitis. *Vet Microbiol* **80**, 285–296.
- Dufour, D., Germon, P., Brusseau, E., Le Roux, Y. & Dary, A. (2011).** First evidence of the presence of genomic islands in *Escherichia coli* P4, a mammary pathogen frequently used to induce experimental mastitis. *J Dairy Sci* **94**, 2779–2793.
- DuMont, A. L., Nygaard, T. K., Watkins, R. L., Smith, A., Kozhaya, L., Kreiswirth, B. N., Shopsin, B., Unutmaz, D., Voyich, J. M. & Torres, V. J. (2011).** Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol Microbiol* **79**, 814–825.
- DuMont, A. L., Yoong, P., Liu, X., Day, C. J., Chumblor, N. M., James, D. B. A., Alonzo, F., Bode, N. J., Lacy, D. B. & other authors. (2014).** Identification of a crucial residue required for *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxicity and receptor recognition. *Infect Immun* **82**, 1268–1276.
- Ebling, T. L., Fox, L. K., Bayles, K. W., Bohach, G. A., Byrne, K. M., Davis, W. C., Ferens, W. A. & Hillers, J. K. (2001).** Bovine mammary immune response to an experimental intramammary infection with a *Staphylococcus aureus* strain containing a gene for staphylococcal enterotoxin C1. *J Dairy Sci* **84**, 2044–2050.
- Edwards, A. M., Potts, J. R., Josefsson, E. & Massey, R. C. (2010).** *Staphylococcus aureus* host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS Pathog* **6**, e1000964 (A. Cheung, Ed.).
- Entenza, J.-M., Moreillon, P., Senn, M. M., Kormanec, J., Dunman, P. M., Berger-Bächi, B., Projan, S. & Bischoff, M. (2005).** Role of sigmaB in the expression of *Staphylococcus aureus* cell wall adhesins ClfA and FnbA and contribution to infectivity in a rat model of experimental endocarditis. *Infect Immun* **73**, 990–998.
- Espersen, F. (1985).** Complement activation by clumping factor and protein A from *Staphylococcus aureus* strain E 2371. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C]* **93**, 59–64.
- Fabres-Klein, M. H., Aguilar, A. P., Silva, M. P., Silva, D. M. & Ribon, A. O. B. (2014).** Moving towards the immunodiagnosis of staphylococcal intramammary infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*.

- Falugi, F., Kim, H. K., Missiakas, D. M. & Schneewind, O. (2013).** Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. *mBio* **4**, e00575–00513.
- Fechter, P., Caldelari, I., Lioliou, E. & Romby, P. (2014).** Novel aspects of RNA regulation in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett*, Paris **588**, 2523–2529.
- Felden, B., Vandenesch, F., Bouloc, P. & Romby, P. (2011).** The *Staphylococcus aureus* RNome and its commitment to virulence. *PLoS Pathog* **7**, e1002006.
- Ferens, W. A. & Bohach, G. A. (2000).** Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: Superantigens and internalization by host cells. *J Lab Clin Med* **135**, 225–230.
- Ferreira, J. P., Correa, M. T., Lyman, R. & Anderson, K. L. (2012).** A review of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in dairy cattle. *Bov Pract* **46**, 1–9.
- Fitzgerald, J. R., Meaney, W. J., Hartigan, P. J., Smyth, C. J. & Kapur, V. (1997).** Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol Infect* **119**, 261–269.
- Fitzgerald, J. R., Monday, S. R., Foster, T. J., Bohach, G. A., Hartigan, P. J., Meaney, W. J. & Smyth, C. J. (2001).** Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J Bacteriol* **183**, 63–70.
- Foster, A. P. (2012).** Staphylococcal skin disease in livestock. *Vet Dermatol* **23**, 342–351, e63.
- Foster, T. J. & Höök, M. (1998).** Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **6**, 484–488.
- Fourichon, C., Seegers, H., Bareille, N. & Beaudeau, F. (1999).** Effects of disease on milk production in the dairy cow: a review. *Prev Vet Med* **41**, 1–35.
- Fox, L. K., Zadoks, R. N. & Gaskins, C. T. (2005).** Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol* **107**, 295–299.
- Fraunholz, M. & Sinha, B. (2012).** Intracellular *Staphylococcus aureus*: Live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol* **2**.
- Frola, I. D., Pellegrino, M. S., Espeche, M. C., Giraud, J. A., Nader-Macias, M. E. & Bogni, C. I. (2012).** Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders. *J Dairy Res* **79**, 84–92.
- Frola, I. D., Pellegrino, M. S., Magnano, G., Giraud, J. A., Espeche, M. C., Nader-Macias, M. E. & Bogni, C. I. (2013).** Histological examination of non-lactating bovine udders inoculated with *Lactobacillus perolens* CRL 1724. *J Dairy Res* **80**, 28–35.
- Fromageau, A., Gilbert, F. B., Prévost, G. & Rainard, P. (2010).** Binding of the *Staphylococcus aureus* leucotoxin LukM to its leucocyte targets. *Microb Pathog* **49**, 354–362.
- Fromageau, A., Cunha, P., Gilbert, F. B. & Rainard, P. (2011).** Purified *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM/F' does not trigger inflammation in the bovine mammary gland. *Microb Pathog* **51**, 396–401.
- Fudaba, Y., Nishifuji, K., Andresen, L. O., Yamaguchi, T., Komatsuzawa, H., Amagai, M. & Sugai, M. (2005).** *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxins selectively digest porcine desmoglein 1. *Microb Pathog* **39**, 171–176.
- Fueyo, J. M., Mendoza, M. C., Rodicio, M. R., Muniz, J., Alvarez, M. A. & Martin, M. C. (2005).** Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J Clin Microbiol* **43**, 1278–1284.
- Fu, Y., Zhou, E., Liu, Z., Li, F., Liang, D., Liu, B., Song, X., Zhao, F., Fen, X. & other authors. (2013).** *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* **155**, 245–252.

- García-Álvarez, L., Holden, M. T., Lindsay, H., Webb, C. R., Brown, D. F., Curran, M. D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D. J. & other authors. (2011).** Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* **11**, 595–603.
- Garzoni, C., Francois, P., Huyghe, A., Couzinet, S., Tapparel, C., Charbonnier, Y., Renzoni, A., Lucchini, S., Lew, D. P. & other authors. (2007).** A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC Genomics* **8**, 171.
- Gauduchon, V., Werner, S., Prevost, G., Monteil, H. & Colin, D. A. (2001).** Flow cytometric determination of Panton-Valentine leucocidin S component binding. *Infect Immun* **69**, 2390–2395.
- Geoghegan, J. A., Corrigan, R. M., Gruszka, D. T., Speziale, P., O’Gara, J. P., Potts, J. R. & Foster, T. J. (2010).** Role of Surface Protein SasG in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **192**, 5663–5673.
- Gharsa, H., Ben Slama, K., Lozano, C., Gómez-Sanz, E., Klibi, N., Ben Sallem, R., Gómez, P., Zarazaga, M., Boudabous, A. & Torres, C. (2012).** Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineages of *Staphylococcus aureus* in healthy sheep in Tunisia. *Vet Microbiol* **156**, 367–373.
- Gill, J. J., Sabour, P. m., Leslie, K. e. & Griffiths, M. w. (2006).** Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K. *J Appl Microbiol* **101**, 377–386.
- Girardeau, J. P., Lalioui, L., Said, A. M. O., De Champs, C. & Le Bouguéneq, C. (2003).** Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the *afa-8* operon: evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections. *J Clin Microbiol* **41**, 218–226.
- Goerke, C., Wirtz, C., Flückiger, U. & Wolz, C. (2006).** Extensive phage dynamics in *Staphylococcus aureus* contributes to adaptation to the human host during infection. *Mol Microbiol* **61**, 1673–1685.
- Goldammer, T., Zerbe, H., Molenaar, A., Schuberth, H.-J., Brunner, R. M., Kata, S. R. & Seyfert, H.-M. (2004).** Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**, 174–185.
- Gómez, M. I., Lee, A., Reddy, B., Muir, A., Soong, G., Pitt, A., Cheung, A. & Prince, A. (2004).** *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med* **10**, 842–848.
- Goodyear, C. S. & Silverman, G. J. (2003).** Death by a B Cell Superantigen. *J Exp Med* **197**, 1125–1139.
- Gouaux, J. E., Braha, O., Hobaugh, M. R., Song, L., Cheley, S., Shustak, C. & Bayley, H. (1994).** Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12828–12831.
- Gougoulis, D., Kyriazakis, I., Tzora, A., Taitzoglou, I., Skoufos, J. & Fthenakis, G. (2007).** Effects of lamb sucking on the bacterial flora of teat duct and mammary gland of ewes. *Reprod Domest Anim* **0**, 070824033729004–???
- Goyache, J., Ruiz-Santa Quiteria, J. A., Orden, J. A., Hernandez, F. J., Gómez-Lucía, E., de la Fuente, R., Bergdoll, M. S. & Suárez, G. (1990).** TSST-1 production by *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*. *Res Microbiol* **141**, 1073–1076.
- Graveland, H., Wagenaar, J. A., Heesterbeek, H., Mevius, D., van Duijkeren, E. & Heederik, D. (2010).** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene. *PLoS ONE* **5**.

- Gruber, T. M. & Gross, C. A. (2003).** Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**, 441–466.
- Gudding, R., McDonald, J. S. & Cheville, N. F. (1984).** Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis: bacteriologic, histologic, and ultrastructural pathologic findings. *Am J Vet Res* **45**, 2525–2531.
- Guidry, A. J., Berning, L. M. & Hambleton, C. N. (1993).** Opsonization of *Staphylococcus aureus* by bovine immunoglobulin isotypes. *J Dairy Sci* **76**, 1285–1289.
- Guinane, C. M., Sturdevant, D. E., Herron-Olson, L., Otto, M., Smyth, D. S., Villaruz, A. E., Kapur, V., Hartigan, P. J., Smyth, C. J. & Fitzgerald, J. R. (2008).** Pathogenomic analysis of the common bovine *Staphylococcus aureus* clone (ET3): emergence of a virulent subtype with potential risk to public health. *J Infect Dis* **197**, 205–213.
- Guinane, C. M., Ben Zakour, N. L., Tormo-Mas, M. A., Weinert, L. A., Lowder, B. V., Cartwright, R. A., Smyth, D. S., Smyth, C. J., Lindsay, J. A. & other authors. (2010).** Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol Evol* **2**, 454–466.
- Haenni, M., Galofaro, L., Ponsin, C., Bes, M., Laurent, F. & Madec, J.-Y. (2011).** Staphylococcal bovine mastitis in France: enterotoxins, resistance and the human Geraldine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Antimicrob Chemother* **66**, 216–218.
- Hallin, M., De Mendonça, R., Denis, O., Lefort, A., El Garch, F., Butaye, P., Hermans, K. & Struelens, M. J. (2011).** Diversity of accessory genome of human and livestock-associated ST398 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Infect Genet Evol* **11**, 290–299.
- Hamir, A. N. (2010).** Systemic *Staphylococcus aureus* infection in a free-ranging raccoon (*Procyon lotor*). *J Wildl Dis* **46**, 665–668.
- Hatzenbuehler, J. & Pulling, T. J. (2011).** Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician* **84**, 1027–1033.
- Haveri, M., Hovinen, M., Roslöf, A. & Pyörälä, S. (2008).** Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J Clin Microbiol* **46**, 3728–3735.
- Hébert, A., Sayasith, K., Sénéchal, S., Dubreuil, P. & Lagacé, J. (2000).** Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett* **193**, 57–62.
- Heilmann, C. (2011).** Adhesion mechanisms of Staphylococci. In *Bact Adhes*, Advances in Experimental Medicine and Biology, pp. 105–123. Edited by D. Linke & A. Goldman. Springer Netherlands.
- Helmann, J. D. & Chamberlin, M. J. (1988).** Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* **57**, 839–872.
- Helmann, J. D. (2002).** The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. In *Adv Microb Physiol*, pp. 47–110. Elsevier.
- Hennekinne, J. a., Kerouanton, A., Brisabois, A. & De Buyser, M. I. (2003).** Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J Appl Microbiol* **94**, 321–329.
- Henry-Stanley, M. J., Shepherd, M. M., Wells, C. L. & Hess, D. J. (2011).** Role of *Staphylococcus aureus* protein A in adherence to silastic catheters. *J Surg Res* **167**, 9–13.
- Hensen, S. M., Pavčić, M. J., Lohuis, J. A., de Hoog, J. A. & Poutrel, B. (2000a).** Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 *in situ*. *J Dairy Sci* **83**, 1966–1975.

- Hensen, S. M., Pavičić, M. J. A. M. P., Lohuis, J. A. C. M. & Poutrel, B. (2000b).** Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J Dairy Sci* **83**, 418–429.
- Hernandez, D., van der Mee-Marquet, N., Kluytmans, J., Donnio, P.-Y., Quentin, R., Corvaglia, A.-R. & Francois, P. (2013).** Whole-genome sequences of *Staphylococcus aureus* ST398 strains of animal origin. *Genome Announc* **1**, e00689–13–e00689–13.
- Herron, L. L., Chakravarty, R., Dwan, C., Fitzgerald, J. R., Musser, J. M., Retzel, E. & Kapur, V. (2002).** Genome sequence survey identifies unique sequences and key virulence genes with unusual rates of amino acid substitution in bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **70**, 3978–3981.
- Herron-Olson, L., Fitzgerald, J. R., Musser, J. M. & Kapur, V. (2007).** Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **2**, e1120.
- Hill, A. W. (1988).** Pathogenicity of two strains of *Streptococcus uberis* infused into lactating and non-lactating bovine mammary glands. *Res Vet Sci* **45**, 400–404.
- Himsworth, C. G., Miller, R. R., Montoya, V., Hoang, L., Romney, M. G., Al-Rawahi, G. N., Kerr, T., Jardine, C. M., Patrick, D. M. & other authors. (2014).** Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by wild urban Norway rats (*Rattus norvegicus*). *PLoS ONE* **9**, e87983.
- Hoch, J. A. (2000).** Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**, 165–170.
- Holden, M. T. G., Feil, E. J., Lindsay, J. A., Peacock, S. J., Day, N. P. J., Enright, M. C., Foster, T. J., Moore, C. E., Hurst, L. & other authors. (2004).** Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9786–9791.
- Holmes, M. A. & Zadoks, R. N. (2011).** Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **16**, 373–382.
- Hua, L., Hilliard, J. J., Shi, Y., Tkaczyk, C., Cheng, L. I., Yu, X., Datta, V., Ren, S., Feng, H. & other authors. (2014).** Assessment of an anti-alpha-toxin monoclonal antibody for prevention and treatment of *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 1108–1117.
- Huang, T.-W., Chen, F.-J., Miu, W.-C., Liao, T.-L., Lin, A.-C., Huang, I.-W., Wu, K.-M., Tsai, S.-F., Chen, Y.-T. & Lauderdale, T.-L. Y. (2012).** Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* M013, a pvl-Positive, ST59-SCCmec Type V Strain Isolated in Taiwan. *J Bacteriol* **194**, 1256–1257.
- Huseby, M., Shi, K., Brown, C. K., Digre, J., Mengistu, F., Seo, K. S., Bohach, G. A., Schlievert, P. M., Ohlendorf, D. H. & Earhart, C. A. (2007).** Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**, 8719–8726.
- 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.
- Ibarra, J. A., Pérez-Rueda, E., Carroll, R. K. & Shaw, L. N. (2013).** Global analysis of transcriptional regulators in *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* **14**, 126.
- IDF. (2011).** Bulletin of the IDF No. 448/2011 - Suggested Interpretation of Mastitis Terminology (revision of Bulletin of IDF N° 338/1999) 35.
- Inoshima, I., Inoshima, N., Wilke, G. A., Powers, M. E., Frank, K. M., Wang, Y. & Wardenburg, J. B. (2011).** A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat Med* **17**, 1310–1314.

- Institut de l'élevage. (2009).** *Traite des vaches laitières: matériel, installation, entretien.* France Agricole Editions.
- Isigidi, B. k., Devriese, L. a., Godard, C. & Hoof, J. V.. (1990).** Characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with meat products and meat workers. *Lett Appl Microbiol* **11**, 145–147.
- Jäger, S., Jonas, B., Pfanzelt, D., Horstkotte, M. A., Rohde, H., Mack, D. & Knobloch, J. K.-M. (2009).** Regulation of biofilm formation by sigma B is a common mechanism in *Staphylococcus epidermidis* and is not mediated by transcriptional regulation of *sarA*. *Int J Artif Organs* **32**, 584–591.
- Jarraud, S., Peyrat, M. A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougél, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M. & Lina, G.. (2001).** *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol Baltim Md 1950* **166**, 669–677.
- Jevons, M. P. (1961).** 'Celbenin' - resistant Staphylococci. *Br Med J* **1**, 124–125.
- Jönsson, K., Signäs, C., Müller, H. P. & Lindberg, M. (1991).** Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur J Biochem FEBS* **202**, 1041–1048.
- Jusko, M., Potempa, J., Kantyka, T., Bielecka, E., Miller, H. K., Kalinska, M., Dubin, G., Garred, P., Shaw, L. N. & Blom, A. M. (2014).** Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system. *J Innate Immun* **6**, 31–46.
- Kalinka, J., Hachmeister, M., Geraci, J., Sordelli, D., Hansen, U., Niemann, S., Oetermann, S., Peters, G., Löffler, B. & Tuchscher, L. (2014).** *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. *Int J Med Microbiol*.
- Kaneko, J., Muramoto, K. & Kamio, Y. (1997).** Gene of LukF-PV-like component of Pantone-Valentine Leukocidin in *Staphylococcus aureus* P83 is linked with *lukM*. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**, 541–544.
- Kawabata, S., Morita, T., Iwanaga, S. & Igarashi, H. (1985).** Enzymatic properties of staphylothrombin, an active molecular complex formed between staphylocoagulase and human prothrombin. *J Biochem (Tokyo)* **98**, 1603–1614.
- Keane, O. M., Budd, K. E., Flynn, J. & McCoy, F.. (2013).** Pathogen profile of clinical mastitis in Irish milk-recording herds reveals a complex aetiology. *Vet Rec* **173**, 17.
- Kerro-Dego, O., Prysliak, T., Potter, A. A. & Perez-Casal, J. (2006).** DNA–protein immunization against the GapB and GapC proteins of a mastitis isolate of *Staphylococcus aureus*. *Vet Immunol Immunopathol* **113**, 125–138.
- Kim, S. Y., Shin, S., Koo, H. C., Youn, J.-H., Paik, H.-D. & Park, Y. H. (2010).** *In vitro* antimicrobial effect and *in vivo* preventive and therapeutic effects of partially purified lantibiotic lactacin NK34 against infection by *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. *J Dairy Sci* **93**, 3610–3615.
- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R. P., Hill, C. & Meaney, W.. (2008).** Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *J Dairy Res* **75**, 365–373.
- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Meaney, W. J., Paul Ross, R. & Hill, C. (2010).** Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lactacin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. *J Dairy Res* **77**, 231–238.
- Knight, G. M., Budd, E. L., Whitney, L., Thornley, A., Al-Ghusein, H., Planche, T. & Lindsay, J. A. (2012).** Shift in dominant hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) clones over time. *J Antimicrob Chemother* **67**, 2514–2522.

- Kreger, A. S., Kim, K.-S., Zaboretzky, F. & Bernheimer, A. W. (1971).** Purification and properties of staphylococcal delta hemolysin. *Infect Immun* **3**, 449–465.
- Kristiansen, S. V., Pascual, V. & Lipsky, P. E. (1994).** Staphylococcal protein A induces biased production of Ig by VH3-expressing B lymphocytes. *J Immunol* **153**, 2974–2982.
- Kullik & Giachino. (1997).** The alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* : regulation of the sigB operon in response to growth phase and heat shock. *Arch Microbiol* **167**, 151–159.
- Kullik, I., Giachino, P. & Fuchs, T. (1998).** Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J Bacteriol* **180**, 4814–4820.
- Kusch, K., Hanke, K., Holtfreter, S., Schmutte, M., Kohler, C., Erck, C., Wehland, J., Hecker, M., Ohlsen, K. & other authors. (2011).** The influence of SaeRS and $\sigma(B)$ on the expression of superantigens in different *Staphylococcus aureus* isolates. *Int J Med Microbiol IJMM* **301**, 488–499.
- Kvist, P. H., Jensen, E. S., Aalbaek, B. & Jensen, H. E. (2002).** Evaluation of the pathology, pathogenesis and aetiology of auricular elephantiasis in slaughter pigs. *J Vet Med Ser A* **49**, 517–522.
- Laarman, A. J., Ruyken, M., Malone, C. L., van Strijp, J. A. G., Horswill, A. R. & Rooijackers, S. H. M. (2011).** *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *J Immunol Baltim Md 1950* **186**, 6445–6453.
- Lacasse, P., Lauzon, K., Diarra, M. S. & Petitclerc, D. (2008).** Utilization of lactoferrin to fight antibiotic-resistant mammary gland pathogens. *J Anim Sci* **86**, 66–71.
- Lammers, A., Nuijten, P. J. M. & Smith, H. E. (1999).** The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol Lett* **180**, 103–109.
- Larkin, E. A., Stiles, B. G. & Ulrich, R. G. (2010).** Inhibition of toxic shock by human monoclonal antibodies against staphylococcal enterotoxin B. *PLoS ONE* **5**, e13253.
- Lasagno, M. C., Vissio, C., Reinoso, E. B., Raspanti, C., Yaciuk, R., Larriestra, A. J. & Odierno, L. M. (2012).** Development of an experimentally induced *Streptococcus uberis* subclinical mastitis in goats. *Vet Microbiol* **154**, 376–383.
- Latasa, C., Solano, C., Penadés, J. R. & Lasa, I. (2006).** Biofilm-associated proteins. *C R Biol, Les défis de la microbiologie et des maladies infectieuses* *Frontiers in microbiology and infectious diseases* **329**, 849–857.
- Lee, J.-W., O'Brien, C. N., Guidry, A. J., Paape, M. J., Shafer-Weaver, K. A. & Zhao, X. (2005).** Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. *Can J Vet Res Rev Can Rech Vét* **69**, 11–18.
- Lee, L. Y. L., Höök, M., Haviland, D., Wetsel, R. A., Yonter, E. O., Syribeys, P., Vernachio, J. & Brown, E. L. (2004).** Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J Infect Dis* **190**, 571–579.
- Leitner, G., Yadlin, N., Lubashevsky, E., Ezra, E., Glickman, A., Chaffer, M., Winkler, M., Saran, A. & Trainin, Z. (2003).** Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. II. Field trial. *Vet Immunol Immunopathol* **93**, 153–158.
- Lerondelle, C. & Poutrel, B. (1980).** [Bacteriophage treatment trials on staphylococcal udder infection in lactating cows (author's transl)]. *Ann Rech Vét Ann Vet Res* **11**, 421–426.
- Le Bouguéneq, C. & Bertin, Y. (1999).** AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet Res* **30**, 317–342.

- Le Loir, Y., Baron, F. & Gautier, M. (2003).** *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res GMR* **2**, 63–76.
- Le Maréchal, C. (2010, November 23).** *Staphylococcus aureus et mammites : identification de facteurs staphylococciques impliqués dans la sévérité des mammites ovines*. Rennes: Agrocampus Ouest.
- Le Maréchal, C., Thiéry, R., Vautor, E. & Le Loir, Y. (2011a).** Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. *Dairy Sci Technol* **91**, 247–282.
- Le Maréchal, C., Jardin, J., Jan, G., Even, S., Pulido, C., Guibert, J.-M., Hernandez, D., François, P., Schrenzel, J. & other authors. (2011b).** *Staphylococcus aureus* seroproteomes discriminate ruminant isolates causing mild or severe mastitis. *Vet Res* **42**, 35.
- Le Maréchal, C., Seyffert, N., Jardin, J., Hernandez, D., Jan, G., Rault, L., Azevedo, V., François, P., Schrenzel, J. & other authors. (2011c).** Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS One* **6**, e27354.
- Le Maréchal, C., Hernandez, D., Schrenzel, J., Even, S., Berkova, N., Thiéry, R., Vautor, E., Fitzgerald, J. R., François, P. & Le Loir, Y. (2011d).** Genome sequences of two *Staphylococcus aureus* ovine strains that induce severe (strain O11) and mild (strain O46) mastitis. *J Bacteriol* **193**, 2353–2354.
- Le Maréchal, C., Jan, G., Even, S., McCulloch, J. A., Azevedo, V., Thiéry, R., Vautor, E. & Le Loir, Y. (2009).** Development of serological proteome analysis of mastitis by *Staphylococcus aureus* in ewes. *J Microbiol Methods* **79**, 131–136.
- Li, L. & Zhang, Z. (2014).** Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle. *Mol Biol Rep* **41**, 5829–5838.
- Li, S., Skov, R. L., Han, X., Larsen, A. R., Larsen, J., Sørum, M., Wulf, M., Voss, A., Hiramatsu, K. & Ito, T. (2011).** Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 3046–3050.
- Lindsay, J. A. (2013).** Hospital-associated MRSA and antibiotic resistance—What have we learned from genomics? *Int J Med Microbiol*, Special Issue Antibiotic Resistance **303**, 318–323.
- Löffler, B., Hussain, M., Grundmeier, M., Brück, M., Holzinger, D., Varga, G., Roth, J., Kahl, B. C., Proctor, R. A. & Peters, G. (2010).** *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog* **6**, e1000715.
- Lonetto, M. A., Brown, K. L., Rudd, K. E. & Buttner, M. J. (1994).** Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7573–7577.
- Lowder, B. V. & Fitzgerald, J. R. (2010).** Human origin for avian pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Virulence* **1**, 283–284.
- Lowy, F. D. (1998).** *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**, 520–532.
- Luzzago, C., Locatelli, C., Franco, A., Scaccabarozzi, L., Gualdi, V., Viganò, R., Sironi, G., Besozzi, M., Castiglioni, B. & other authors. (2014).** Clonal diversity, virulence-associated genes and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates from nasal cavities and soft tissue infections in wild ruminants in Italian Alps. *Vet Microbiol* **170**, 157–161.
- Ma, J., Cocchiari, J. & Lee, J. C. (2004).** Evaluation of serotypes of *Staphylococcus aureus* strains used in the production of a bovine mastitis bacterin. *J Dairy Sci* **87**, 178–182.

- Mamo, W., Bodén, M. & Flock, J.-I. (1994).** Vaccination with *Staphylococcus aureus* fibrinogen binding proteins (FgBPs) reduces colonisation of *S. aureus* in a mouse mastitis model. *FEMS Immunol Med Microbiol* **10**, 47–53.
- Mamo, W., Fröman, G. & Müller, H. (2000).** Protection induced in mice vaccinated with recombinant collagen-binding protein (CnBP) and alpha-toxoid against intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* **44**, 381–384.
- Martínez-Pulgarín, S., Domínguez-Bernal, G., Orden, J. A. & Fuente, R. de la. (2009).** Simultaneous lack of catalase and beta-toxin in *Staphylococcus aureus* leads to increased intracellular survival in macrophages and epithelial cells and to attenuated virulence in murine and ovine models. *Microbiology* **155**, 1505–1515.
- Matthews, K. R., Almeida, R. A. & Oliver, S. P. (1994).** Bovine mammary epithelial cell invasion by *Streptococcus uberis*. *Infect Immun* **62**, 5641–5646.
- Mayer, S. J., Waterman, A. E., Keen, P. M., Craven, N. & Bourne, F. J. (1988).** Oxygen concentration in milk of healthy and mastitic cows and implications of low oxygen tension for the killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils. *J Dairy Res* **55**, 513–519.
- McBurney, S., Veitch, A. M. & Daoust, P.-Y. (2000).** Bacterial valvular endocarditis in a black bear from Labrador. *J Wildl Dis* **36**, 788–791.
- McCarthy, A. J., Lindsay, J. A. & Loeffler, A. (2012).** Are all meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) equal in all hosts? Epidemiological and genetic comparison between animal and human MRSA. *Vet Dermatol* **23**, 267–275, e53–54.
- McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P. & Foster, T. J. (1994).** Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **11**, 237–248.
- McGavin, M. J., Zahradka, C., Rice, K. & Scott, J. E. (1997).** Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. *Infect Immun* **65**, 2621–2628.
- Meehl, M., Herbert, S., Götz, F. & Cheung, A. (2007).** Interaction of the GraRS two-component system with the VraFG ABC transporter to support vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2679–2689.
- Meemken, D., Blaha, T., Hotzel, H., Strommenger, B., Klein, G., Ehricht, R., Monecke, S. & Kehrenberg, C. (2013).** Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from wild boars. *Appl Environ Microbiol* **79**, 1739–1742.
- Meier, S., Goerke, C., Wolz, C., Seidl, K., Homerova, D., Schulthess, B., Kormanec, J., Berger-Bachi, B. & Bischoff, M. (2007).** SigmaB and the sigmaB-dependent *arlRS* and *yabJ-spoVG* loci affect capsule formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **75**, 4562–4571.
- Melchior, M. B., van Osch, M. H. J., Lam, T. J. G. M., Vernooij, J. C. M., Gaastra, W. & Fink-Gremmels, J. (2011).** Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility. *J Dairy Sci* **94**, 5926–5937.
- Metzner, M., Sauter-Louis, C., Seemueller, A., Petzl, W. & Klee, W. (2014).** Infrared thermography of the udder surface of dairy cattle: Characteristics, methods, and correlation with rectal temperature. *Vet J* **199**, 57–62.
- Meyer, F., Girardot, R., Piemont, Y., Prevost, G. & Colin, D. A. (2009).** Analysis of the specificity of Pantón-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin F component binding. *Infect Immun* **77**, 266–273.
- Middleton, J. R. (2008).** *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* **7**, 805–815.
- Middleton, J. R., Ma, J., Rinehart, C. L., Taylor, V. N., Luby, C. D. & Steevens, B. J. (2006).** Efficacy of different Lysin formulations in the prevention of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy heifers. *J Dairy Res* **73**, 10–19.

- Middleton, J. R., Luby, C. D. & Adams, D. S. (2009).** Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: A review and new data. *Vet Microbiol*, Special Issue: Heifer and CNS Mastitis **134**, 192–198.
- Miller, H. K., Carroll, R. K., Burda, W. N., Krute, C. N., Davenport, J. E. & Shaw, L. N. (2012).** The extracytoplasmic function sigma factor σ_S protects against both intracellular and extracytoplasmic stresses in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **194**, 4342–4354.
- Miller, L. G., Perdreau-Remington, F., Rieg, G., Mehdi, S., Perlroth, J., Bayer, A. S., Tang, A. W., Phung, T. O. & Spellberg, B. (2005).** Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *N Engl J Med* **352**, 1445–1453.
- Miller, M. A., Fales, W. H., Tyler, J. W. & Suedmeyer, W. K. (2001).** Pulmonary botryomycosis in a scottish highland steer. *J Vet Diagn Invest* **13**, 74–76.
- Mitchell, G., Lamontagne, C.-A., Brouillette, E., Grondin, G., Talbot, B. G., Grandbois, M. & Malouin, F. (2008).** *Staphylococcus aureus* SigB activity promotes a strong fibronectin-bacterium interaction which may sustain host tissue colonization by small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients. *Mol Microbiol* **70**, 1540–1555.
- Mitchell, G., Séguin, D. L., Asselin, A.-E., Déziel, E., Cantin, A. M., Frost, E. H., Michaud, S. & Malouin, F. (2010a).** *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC Microbiol* **10**, 33.
- Mitchell, G., Brouillette, E., Séguin, D. L., Asselin, A.-E., Jacob, C. L. & Malouin, F. (2010b).** 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**, 18–27.
- Mitchell, G., Grondin, G., Bilodeau, G., Cantin, A. M. & Malouin, F. (2011).** Infection of polarized airway epithelial cells by normal and small-colony variant strains of *Staphylococcus aureus* is increased in cells with abnormal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and is influenced by NF- κ B. *Infect Immun* **79**, 3541–3551.
- Moisan, H., Brouillette, E., Jacob, C. L., Langlois-Begin, P., Michaud, S. & Malouin, F. (2006).** Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *J Bacteriol* **188**, 64–76.
- Mondal, R., Ganguly, T., Chanda, P. K., Bandhu, A., Jana, B., Sau, K., Lee, C. Y. & Sau, S. (2010).** Stabilization of the primary sigma factor of *Staphylococcus aureus* by core RNA polymerase. *BMB Rep* **43**, 176–181.
- Monecke, S., Kuhnert, P., Hotzel, H., Slickers, P. & Ehricht, R. (2007).** Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Vet Microbiol* **125**, 128–140.
- Moodley, A., Espinosa-Gongora, C., Nielsen, S. S., McCarthy, A. J., Lindsay, J. A. & Guardabassi, L. (2012).** Comparative host specificity of human- and pig- associated *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *PLoS One* **7**, e49344.
- Mootz, J. M., Malone, C. L., Shaw, L. N. & Horswill, A. R. (2013).** Staphopains modulate *Staphylococcus aureus* biofilm integrity. *Infect Immun* **81**, 3227–3238.
- Morikawa, K., Inose, Y., Okamura, H., Maruyama, A., Hayashi, H., Takeyasu, K. & Ohta, T. (2003).** A new staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: functional significance and implication for the evolutionary processes. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech* **8**, 699–712.

- Morikawa, K., Takemura, A. J., Inose, Y., Tsai, M., Nguyen Thi, L. T., Ohta, T. & Msadek, T. (2012).** Expression of a cryptic secondary sigma factor gene unveils natural competence for DNA transformation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* **8**, e1003003.
- Morinaga, N., Kaihou, Y. & Noda, M. (2003).** Purification, cloning and characterization of variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. *Microbiol Immunol* **47**, 81–90.
- Morris, D. O., Lautenbach, E., Zautis, T., Leckerman, K., Edelstein, P. H. & Rankin, S. C. (2012).** Potential for pet animals to harbour methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* when residing with human MRSA patients. *Zoonoses Public Health* **59**, 286–293.
- Moser, A., Stephan, R., Corti, S. & Johler, S. (2013).** Comparison of genomic and antimicrobial resistance features of latex agglutination test-positive and latex agglutination test-negative *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. *J Dairy Sci* **96**, 329–334.
- Mulders, M. N., Haenen, A. P. J., Geenen, P. L., Vesseur, P. C., Poldervaart, E. S., Bosch, T., Huijsdens, X. W., Hengeveld, P. D., Dam-Deisz, W. D. C. & other authors. (2010).** Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in The Netherlands. *Epidemiol Infect* **138**, 743–755.
- Mullarky, I. K., Su, C., Frieze, N., Park, Y. H. & Sordillo, L. M. (2001).** *Staphylococcus aureus agr* genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. *Infect Immun* **69**, 45–51.
- Musser, J. M. & Selander, R. K. (1990).** Genetic analysis of natural populations of *Staphylococcus aureus*. In *Mol Biol Staphylococci*. Edited by R. P. Novick. VCH Publishers.
- Nagase, N., Sasaki, A., Yamashita, K., Shimizu, A., Wakita, Y., Kitai, S. & Kawano, J. (2002).** Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *J Vet Med Sci* **64**, 245–250.
- Nagel, M., Dischinger, J., Türck, M., Verrier, D., Oedenkoven, M., Ngoubangoye, B., Le Flohic, G., Drexler, J. F., Bierbaum, G. & Gonzalez, J.-P. (2013).** Human-associated *Staphylococcus aureus* strains within great ape populations in Central Africa (Gabon). *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* **19**, 1072–1077.
- Naidu, A. S., Andersson, M., Miedzobrodzki, J., Forsgren, A. & Watts, J. L. (1991).** Bovine lactoferrin receptors in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J Dairy Sci* **74**, 1218–1226.
- Nathawat, P., Bhati, T., Sharma, S. K., Mohammed, N. & Kataria, A. K. (2013).** Prevalence of *Staphylococcus aureus* in lactating goats with clinical mastitis and their antibiogram studies. *ABAH Bioflux* **5**, 32–37.
- Nguyen, T., Ghebrehiwet, B. & Peerschke, E. I. B. (2000).** *Staphylococcus aureus* protein A recognizes platelet gC1qR/p33: a novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets. *Infect Immun* **68**, 2061–2068.
- Nickerson, N., Ip, J., Passos, D. T. & McGavin, M. J. (2010).** Comparison of Staphopain A (ScpA) and B (SspB) precursor activation mechanisms reveals unique secretion kinetics of proSspB (Staphopain B), and a different interaction with its cognate Staphostatin, SspC. *Mol Microbiol* **75**, 161–177.
- Ní Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Höök, M. & Foster, T. J. (1998).** Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **30**, 245–257.
- Nilsen, H., Olsen, H. G., Hayes, B., Nome, T., Sehested, E., Svendsen, M., Meuwissen, T. H. E. & Lien, S. (2009).** Characterization of a QTL region affecting clinical mastitis and protein yield on BTA6. *Anim Genet* **40**, 701–712.

- Noda, M., Kato, I., Hirayama, T. & Matsuda, F. (1980).** Fixation and inactivation of staphylococcal leukocidin by phosphatidylcholine and ganglioside GM1 in rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **29**, 678–684.
- Novick, R. P. (2003).** Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* **48**, 1429–1449.
- Oliveira, L., Langoni, H., Hulland, C. & Ruegg, P. L. (2012).** Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *J Dairy Sci* **95**, 1913–1920.
- Oncel, S., Pinar, E., Sener, G., Calli, C. & Karagoz, U. (2010).** Evaluation of bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. *J Otolaryngol - Head Neck Surg J Oto-Rhino-Laryngol Chir Cervico-Faciale* **39**, 52–55.
- O'Seaghda, M., van Schooten, C. J., Kerrigan, S. W., Emsley, J., Silverman, G. J., Cox, D., Lenting, P. J. & Foster, T. J. (2006).** *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *FEBS J* **273**, 4831–4841.
- Ote, I., Taminiau, B., Duprez, J.-N., Dizier, I. & Mainil, J. G. (2011).** Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol* **153**, 285–292.
- Otto, M. (2013a).** Community-associated MRSA: what makes them special? *Int J Med Microbiol IJMM* **303**, 324–330.
- Otto, M. (2013b).** Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med* **64**, 175–188.
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patiño, A. & Baizabal-Aguirre, V. M. (2007).** Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect* **54**, 399–409.
- Paget, M. S. & Helmann, J. D. (2003).** The $\sigma 70$ family of sigma factors. *Genome Biol* **4**, 203.
- Pandey, G. S., Nomura, Y., Kobayashi, K., Fujise, H. & Yamada, T. (1998).** Cutaneous staphylococcal granuloma in a free living zebra (*Equus burchelli*) in Zambia. *J Vet Med Sci* **60**, 137–138.
- Pankey, J. W., Boddie, N. T., Watts, J. L. & Nickerson, S. C. (1985).** Evaluation of Protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. *J Dairy Sci* **68**, 726–731.
- Pantoja, J. C. F., Hulland, C. & Ruegg, P. L. (2009).** Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. *J Dairy Sci* **92**, 139–148.
- Panton, P. N. & Valentine, F. C. O. (1932).** STAPHYLOCOCCAL TOXIN. *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 5662 **219**, 506–508.
- Park, Y. H., Lee, S. U., Ferens, W. A., Samuels, S., Davis, W. C., Fox, L. K., Ahn, J. S., Seo, K. S., Chang, B. S. & other authors. (2006).** Unique features of bovine lymphocytes exposed to a staphylococcal enterotoxin. *J Vet Sci* **7**, 233.
- Paterson, G. K., Larsen, A. R., Robb, A., Edwards, G. E., Pennycott, T. W., Foster, G., Mot, D., Hermans, K., Baert, K. & other authors. (2012).** The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *J Antimicrob Chemother* **67**, 2809–2813.
- Patti, J. M. & Höök, M. (1994).** Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 752–758.

- Pellegrino, M., Giraud, J., Raspanti, C., Nagel, R., Odierno, L., Primo, V. & Bogni, C. (2008).** Experimental trial in heifers vaccinated with *Staphylococcus aureus* avirulent mutant against bovine mastitis. *Vet Microbiol* **127**, 186–190.
- Pellegrino, M., Giraud, J., Raspanti, C., Odierno, L. & Bogni, C. (2010).** Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. *Vaccine* **28**, 4523–4528.
- Pellerin, J.-L. (2009).** *Staphylococcus aureus* chez l'animal (hors mammites). In *Staphylococcus Aureus*, Monographies de microbiologie, pp. 203–210. Edited by Y. Le Loir & M. Gautier. Paris: Lavoisier.
- Penna, B., Varges, R., Medeiros, L., Martins, G. M., Martins, R. R. & Lilenbaum, W. (2010).** Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Vet Dermatol* **21**, 292–296.
- Pereira, U. P., Oliveira, D. G. S., Mesquita, L. R., Costa, G. M. & Pereira, L. J. (2011).** Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. *Vet Microbiol* **148**, 117–124.
- Perez-Casal, J., Prysliak, T., Kerro-Dego, O. & Potter, A. A. (2006).** Immune responses to a *Staphylococcus aureus* GapC/B chimera and its potential use as a component of a vaccine for *S. aureus* mastitis. *Vet Immunol Immunopathol* **109**, 85–97.
- Periasamy, S., Joo, H.-S., Duong, A. C., Bach, T.-H. L., Tan, V. Y., Chatterjee, S. S., Cheung, G. Y. C. & Otto, M. (2012).** How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1281–1286.
- Peton, V. & Le Loir, Y. (2013).** *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect Genet Evol.*
- Pichon, C. & Felden, B. (2005).** Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14249–14254.
- Pighetti, G. M. & Elliott, A. A. (2011).** Gene polymorphisms: the keys for marker assisted selection and unraveling core regulatory pathways for mastitis resistance. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **16**, 421–432.
- Plouin-Gaudon, I., Clement, S., Huggler, E., Chaponnier, C., François, P., Lew, D., Schrenzel, J., Vaudaux, P. & Lacroix, J. S. (2006).** Intracellular residency is frequently associated with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *Rhinology* **44**, 249–254.
- Porrero, M. C., Mentaberre, G., Sánchez, S., Fernández-Llario, P., Gómez-Barrero, S., Navarro-Gonzalez, N., Serrano, E., Casas-Díaz, E., Marco, I. & other authors. (2013).** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in different free-living wild animal species in Spain. *Vet J Lond Engl 1997* **198**, 127–130.
- Porrero, M. C., Mentaberre, G., Sánchez, S., Fernández-Llario, P., Casas-Díaz, E., Mateos, A., Vidal, D., Lavín, S., Fernández-Garayzábal, J.-F. & Domínguez, L. (2014).** Carriage of *Staphylococcus aureus* by free-living wild animals in Spain. *Appl Environ Microbiol* **80**, 4865–4870.
- Potrich, C., Bastiani, H., Colin, D. A., Huck, S., Prévost, G. & Serra, M. D. (2009).** The influence of membrane lipids in *Staphylococcus aureus* gamma-hemolysins pore formation. *J Membr Biol* **227**, 13–24.
- Poutrel, B. & Lerondelle, C. (1978).** Induced staphylococcal infections in bovine mammary-gland - Influence of month of lactation and other factors related to cow. *Ann Rech Vet* **9**, 119–128.
- Poutrel, B., Boutonnier, A., Sutra, L. & Fournier, J. M. (1988).** Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. *J Clin Microbiol* **26**, 38–40.

- Prasad, L. B. & Newbould, F. H. (1968).** Inoculation of the bovine teat duct with *Staphylococcus Aureus*: the relationship of teat duct length, milk yield and milking rate to development of intramammary infection. *Can Vet J Rev Vét Can* **9**, 107–115.
- Prenafeta, A., March, R., Foix, A., Casals, I. & Costa, L. (2010).** Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: Possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Vet Immunol Immunopathol* **134**, 208–217.
- Prevost, G., Mourey, L., Colin, D. A. & Menestrina, G. (2001).** Staphylococcal pore-forming toxins. *Pore-Form Toxins* **257**, 53–83.
- Price, L. B., Stegger, M., Hasman, H., Aziz, M., Larsen, J., Andersen, P. S., Pearson, T., Waters, A. E., Foster, J. T. & other authors. (2012).** *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *mBio* **3**.
- Proctor, R. A., Langevelde, P. van, Kristjansson, M., Maslow, J. N. & Arbeit, R. D. (1995).** Persistent and relapsing infections associated with Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* **20**, 95–102.
- Pyrah, I. T., Scott, P. R. & Penny, C. D. (1994).** Possible involvement of *Staphylococcus aureus* as a primary pathogen in lamb septicaemia. *Vet Rec* **134**, 679–680.
- Qu, T., Feng, Y., Jiang, Y., Zhu, P., Wei, Z., Chen, Y., Otto, M. & Yu, Y. (2014).** Whole genome analysis of a community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST59 isolate from a case of human sepsis and severe pneumonia in China. *PLoS One* **9**, e89235.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M. & Ziebuhr, W. (2000).** Alternative transcription factor sigma(B) is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J Bacteriol* **182**, 6824–6826.
- Rainard, P. & Poutrel, B. (1982).** Dynamics of nonclinical bovine intramammary infections with major and minor pathogens. *Am J Vet Res* **43**, 2143–2146.
- Rainard, P. (2005).** Tackling mastitis in dairy cows. *Nat Biotechnol* **23**, 430–432.
- Rainard, P. (2007).** *Staphylococcus aureus* leucotoxin LukM/F' is secreted and stimulates neutralising antibody response in the course of intramammary infection. *Vet Res* **38**, 685–696.
- Rainard, P. & Gilbert, F. B. (2009).** Les mammites dues à *Staphylococcus aureus*. In *Staphylococcus Aureus*, Monographies de microbiologie, pp. 211–232. Edited by Y. Le Loir & M. Gautier. Paris: Lavoisier.
- Rainard, P. & Riollot, C. (2006).** Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res* **37**, 369–400.
- Rainard, P., Corrales, J.-C., Barrio, M. B., 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.
- Rall, V. L. M., Miranda, E. S., Castilho, I. G., Camargo, C. H., Langoni, H., Guimarães, F. F., Araújo Júnior, J. P. & Fernandes Júnior, A. (2014).** Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. *J Dairy Sci* **97**, 829–837.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A. I. & Mann, M. (2002).** Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* **12**, 1231–1245.
- Rasigade, J. P., Moulay, A., Lhoste, Y., Tristan, A., Bes, M., Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G., Laurent, F. & Dumitrescu, O. (2011).** Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* **11**, 263.

- Reed, S. B., Wesson, C. A., Liou, L. E., Trumble, W. R., Schlievert, P. M., Bohach, G. A. & Bayles, K. W. (2001). Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* serine protease operon. *Infect Immun* **69**, 1521–1527.
- Resch, G., François, P., Morisset, D., Stojanov, M., Bonetti, E. J., Schrenzel, J., Sakwinska, O. & Moreillon, P. (2013). Human-to-bovine jump of *Staphylococcus aureus* CC8 is associated with the loss of a β -hemolysin converting prophage and the acquisition of a new staphylococcal cassette chromosome. *PLoS ONE* **8**, e58187 (J. R. Fitzgerald, Ed.).
- Richter, A., Sting, R., Popp, C., Rau, J., Tenhagen, B.-A., Guerra, B., Hafez, H. M. & Fetsch, A. (2012). Prevalence of types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in turkey flocks and personnel attending the animals. *Epidemiol Infect* **140**, 2223–2232.
- Riollet, C., Rainard, P. & Poutrel, B. (2000). Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Adv Exp Med Biol* **480**, 247–258.
- Riollet, C., Rainard, P. & Poutrel, B. (2001). Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J Dairy Sci* **84**, 1077–1084.
- Rit, K. (2014). A case report of Small Colony variant of *Staphylococcus aureus* isolated from a patient with chronic osteomyelitis in a tertiary care hospital of eastern India. *Adv Biomed Res* **3**.
- Roberson, J. R., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gay, J. M. & Besser, T. E. (1994). Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J Dairy Sci* **77**, 3354–3364.
- Rodgers, J. D., McCullagh, J. J., McNamee, P. T., Smyth, J. A. & Ball, H. J. (1999). Comparison of *Staphylococcus aureus* recovered from personnel in a poultry hatchery and in broiler parent farms with those isolated from skeletal disease in broilers. *Vet Microbiol* **69**, 189–198.
- Rolain, J.-M., François, P., Hernandez, D., Bittar, F., Richet, H., Fournous, G., Mattenberger, Y., Bosdure, E., Stremmler, N. & other authors. (2009). Genomic analysis of an emerging multiresistant *Staphylococcus aureus* strain rapidly spreading in cystic fibrosis patients revealed the presence of an antibiotic inducible bacteriophage. *Biol Direct* **4**, 1.
- Romilly, C., Lays, C., Tomasini, A., Caldelari, I., Benito, Y., Hammann, P., Geissmann, T., Boisset, S., Romby, P. & Vandenesch, F. (2014). A non-coding RNA promotes bacterial persistence and decreases virulence by regulating a regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* **10**, e1003979.
- Rooijackers, S. H. M., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M. R., Presanis, J. S., Sim, R. B., van Wamel, W. J. B., van Kessel, K. P. M. & van Strijp, J. A. G. (2005). Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol* **6**, 920–927.
- Rumi, M. V., Huguet, M. J., Bentancor, A. B. & Gentilini, E. R. (2013). The *icaA* gene in staphylococci from bovine mastitis. *J Infect Dev Ctries* **7**.
- Rupp, R. & Boichard, D. (1999). Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, production, udder type traits, and milking ease in first lactation Holsteins. *J Dairy Sci* **82**, 2198–2204.
- Rupp, R., Bergonier, D., Dion, S., Hygonenq, M. C., Aurel, M. R., Robert-Granié, C. & Foucras, G. (2009). Response to somatic cell count-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment in sheep. *J Dairy Sci* **92**, 1203–1219.
- Rupp, R. & Boichard, D. (2003). Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet Res* **34**, 671–688.
- Rushen, J., Munksgaard, L., Marnet, P. G. & DePassillé, A. M. (2001). Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. *Appl Anim Behav Sci* **73**, 1–14.
- Ryan, M. P., Meaney, W. J., Ross, R. P. & Hill, C. (1998). Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2287–2290.

- Sachse, F., Becker, K., Von Eiff, C., Metze, D. & Rudack, C. (2010). *Staphylococcus aureus* invades the epithelium in nasal polyposis and induces IL-6 in nasal epithelial cells in vitro. *Allergy* **65**, 1430–1437.
- Sahana, G., Lund, M. S., Andersson-Eklund, L., Hastings, N., Fernandez, A., Iso-Touru, T., Thomsen, B., Viitala, S., Sørensen, P. & other authors. (2008). Fine-mapping QTL for mastitis resistance on BTA9 in three Nordic red cattle breeds. *Anim Genet* **39**, 354–362.
- Sakoulas, G., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., Wennersten, C., Venkataraman, L., Novick, R. P. & Gold, H. S. (2002). Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1492–1502.
- Sakwinska, O., Giddey, M., Moreillon, M., Morisset, D., Waldvogel, A. & Moreillon, P. (2011). *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. *Appl Environ Microbiol* **77**, 5908–5915.
- Sanchez, C. J., Ward, C. L., Romano, D. R., Hurtgen, B. J., Hardy, S. K., Woodbury, R. L., Trevino, A. V., Rathbone, C. R. & Wenke, J. C. (2013). *Staphylococcus aureus* biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption in vitro. *BMC Musculoskelet Disord* **14**, 187.
- Sandholm, M., Kaartinen, L. & Pyörälä, S. (1990). Bovine mastitis-why does antibiotic therapy not always work? An overview. *J Vet Pharmacol Ther* **13**, 248–260.
- Santana, R. C. M., Zafalon, L. F., Esteves, S. N., Tanaka, E. V., Pilon, L. E. & Massa, R. (2013). Occurrence of etiologic agents causing subclinical mastitis in Morada Nova and Santa Ines ewes. *Ars Vet* **29**, 148–152.
- Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Ohtsuka, M., Hongo, I., Fukata, T., Kabeya, H., Maruyama, S. & Hiramatsu, K. (2012). Population genetic structures of *Staphylococcus aureus* isolates from cats and dogs in Japan. *J Clin Microbiol* **50**, 2152–2155.
- Schijffelen, M. J., Boel, C. E., van Strijp, J. A. & Fluit, A. C. (2010). Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis. *BMC Genomics* **11**, 376.
- Schmelcher, M., Powell, A. M., Becker, S. C., Camp, M. J. & Donovan, D. M. (2012). Chimeric phage lysins act synergistically with lysostaphin to kill mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands. *Appl Environ Microbiol* **78**, 2297–2305.
- Schukken, Y. H., Rauch, B. J. & Morelli, J. (2013). Defining standardized protocols for determining the efficacy of a postmilking teat disinfectant following experimental exposure of teats to mastitis pathogens. *J Dairy Sci* **96**, 2694–2704.
- Schulthess, B., Meier, S., Homerova, D., Goerke, C., Wolz, C., Kormanec, J., Berger-Bächli, B. & Bischoff, M. (2009). Functional characterization of the σ B-dependent *yabJ-spoVG* operon in *Staphylococcus aureus*: role in methicillin and glycopeptide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 1832–1839.
- Schulthess, B., Bloes, D. A., François, P., Girard, M., Schrenzel, J., Bischoff, M. & Berger-Bächli, B. (2011). The σ B-dependent *yabJ-spoVG* operon is involved in the regulation of extracellular nuclease, lipase, and protease expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **193**, 4954–4962.
- Sears, P. M., Smith, B. S., Stewart, W. K., Gonzalez, R. N., Rubino, S. D., Gusik, S. A., Kulisek, E. S., Projan, S. J. & Blackburn, P. (1992). Evaluation of a Nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows. *J Dairy Sci* **75**, 3185–3190.
- Seyffert, N., Le Maréchal, C., Jardin, J., McCulloch, J. A., Rosado, F. R., Miyoshi, A., Even, S., Jan, G., Berkova, N. & other authors. (2012). *Staphylococcus aureus* proteins differentially

- recognized by the ovine immune response in mastitis or nasal carriage. *Vet Microbiol* **157**, 439–447.
- Shannon, O. & Flock, J.-I. (2004).** Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* binds to platelets and inhibits platelet aggregation. *Thromb Haemost* **91**, 779–789.
- Shaw, L. N., Lindholm, C., Prajsnar, T. K., Miller, H. K., Brown, M. C., Golonka, E., Stewart, G. C., Tarkowski, A. & Potempa, J. (2008).** Identification and characterization of sigma, a novel component of the *Staphylococcus aureus* stress and virulence responses. *PLoS One* **3**, e3844.
- Shepherd, M. A., Fleming, V. M., Connor, T. R., Corander, J., Feil, E. J., Fraser, C. & Hanage, W. P. (2013).** Historical zoonoses and other changes in host tropism of *Staphylococcus aureus*, identified by phylogenetic analysis of a population dataset. *PLoS ONE* **8**, e62369.
- Shimizu, A., Kawano, J., Ozaki, J., Sasaki, N., Kimura, S., Kamada, M., Anzai, S., Saito, H. & Sato, H. (1991).** Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from lesions of horses. *J Vet Med Sci Jpn Soc Vet Sci* **53**, 601–606.
- Shkreta, L., Talbot, B. G., Diarra, M. S. & Lacasse, P. (2004).** Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. *Vaccine* **23**, 114–126.
- Shore, A. C., Deasy, E. C., Slickers, P., Brennan, G., O’Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R. & Coleman, D. C. (2011).** Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 3765–3773.
- Simpson, V. R., Davison, N. J., Kearns, A. M., Pichon, B., Hudson, L. O., Koylass, M., Blackett, T., Butler, H., Rasigade, J. P. & Whatmore, A. M. (2013).** Association of a *lukM*-positive clone of *Staphylococcus aureus* with fatal exudative dermatitis in red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *Vet Microbiol* **162**, 987–991.
- Sinha, B. & Fraunholz, M. (2010).** *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int J Med Microbiol* **300**, 170–175.
- Skoufos, I., Voidarou, C., Bezirtzoglou, E. & Tzora, A. (2006).** Effects of machine-milking on the bacterial flora of teat duct and mammary gland of ewes. *J Vet Med Ser B* **53**, 499–501.
- Smith, T. C. & Pearson, N. (2011).** The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. *Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N* **11**, 327–339.
- Smyth, D. S., Hartigan, P. J., Meaney, W. J., Fitzgerald, J. R., Deobald, C. F., Bohach, G. A. & Smyth, C. J. (2005).** Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *J Med Microbiol* **54**, 401–411.
- Smyth, D. S., Feil, E. J., Meaney, W. J., Hartigan, P. J., Tollersrud, T., Fitzgerald, J. R., Enright, M. C. & Smyth, C. J. (2009).** Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* **58**, 1343–1353.
- Sørensen, L. P., Guldbrandtsen, B., Thomassen, J. R. & Lund, M. S. (2008).** Pathogen-specific effects of quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in Danish holstein cattle. *J Dairy Sci* **91**, 2493–2500.
- Spaan, A. N., Henry, T., van Rooijen, W. J. M., Perret, M., Badiou, C., Aerts, P. C., Kemmink, J., de Haas, C. J. C., van Kessel, K. P. M. & other authors. (2013).** The staphylococcal toxin Pantone-Valentine leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe* **13**, 584–594.

- Stec-Niemczyk, J., Pustelny, K., Kisielewska, M., Bista, M., Boulware, K. T., Stennicke, H. R., Thogersen, I. B., Daugherty, P. S., Enghild, J. J. & other authors. (2009).** Structural and functional characterization of SplA, an exclusively specific protease of *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* **419**, 555–564.
- Stefani, S., Chung, D. R., Lindsay, J. A., Friedrich, A. W., Kearns, A. M., Westh, H. & Mackenzie, F. M. (2012).** Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents* **39**, 273–282.
- Ster, C., Beaudoin, F., Diarra, M. S., Jacques, M., Malouin, F. & Lacasse, P. (2010).** Evaluation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated proteins as vaccine targets. *Vet Immunol Immunopathol* **136**, 311–318.
- Stevens, Q. E. J., Seibly, J. M., Chen, Y. H., Dickerman, R. D., Noel, J. & Kattner, K. A. (2007).** Reactivation of dormant lumbar methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis after 12 years. *J Clin Neurosci* **14**, 585–589.
- Stewart, J. R., Townsend, F. I., Lane, S. M., Dyar, E., Hohn, A. A., Rowles, T. K., Staggs, L. A., Wells, R. S., Balmer, B. C. & Schwacke, L. H. (2014).** Survey of antibiotic-resistant bacteria isolated from bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the southeastern USA. *Dis Aquat Organ* **108**, 91–102.
- Stout, V. G. & Iandolo, J. J. (1990).** Chromosomal gene transfer during conjugation by *Staphylococcus aureus* is mediated by transposon-facilitated mobilization. *J Bacteriol* **172**, 6148–6150.
- Strandberg, Y., Gray, C., Vuocolo, T., Donaldson, L., Broadway, M. & Tellam, R. (2005).** Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine* **31**, 72–86.
- Sugimoto, M., Itoh, T., Gotoh, Y., Kawahara, T., Moriya, H., Uchimura, Y. & Sugimoto, Y. (2011).** Enhanced clinical mastitis resistance in Holsteins with a FEZL p.Gly105(12_13) polymorphism. *J Dairy Sci* **94**, 2103–2107.
- Sung, J. M.-L., Lloyd, D. H. & Lindsay, J. A. (2008).** *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology* **154**, 1949–1959.
- Svennersten-Sjaunja, K. & Olsson, K. (2005).** Endocrinology of milk production. *Domest Anim Endocrinol* **29**, 241–258.
- Swanson, K., Gorodetsky, S., Good, L., Davis, S., Musgrave, D., Stelwagen, K., Farr, V. & Molenaar, A. (2004).** Expression of a beta-defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis. *Infect Immun* **72**, 7311–7314.
- Switalski, L. M., Speziale, P. & Höök, M. (1989).** Isolation and characterization of a putative collagen receptor from *Staphylococcus aureus* strain Cowan 1. *J Biol Chem* **264**, 21080–21086.
- Szweda, P., Schielmann, M., Milewski, S., Frankowska, A. & Jakubczak, A. (2012).** Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. *Pol J Microbiol Pol Tow Mikrobiol Pol Soc Microbiol* **61**, 65–69.
- Tamilselvam, B., Almeida, R. A., Dunlap, J. R. & Oliver, S. P. (2006).** *Streptococcus uberis* internalizes and persists in bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog* **40**, 279–285.
- Tan, N. C.-W., Cooksley, C. M., Roscioli, E., Drilling, A. J., Douglas, R., Wormald, P.-J. & Vreugde, S. (2014).** Small-colony variants and phenotype switching of intracellular *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis. *Allergy* **69**, 1364–1371.
- Tao, L., Wu, X. & Sun, B. (2010).** Alternative sigma factor sigmaH modulates prophage integration and excision in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* **6**, e1000888.

- Tedeschi, G., Taverna, F., Negri, A., Piccinini, R., Nonnis, S., Ronchi, S. & Zecconi, A. (2009).** Serological proteome analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from sub-clinical mastitis. *Vet Microbiol* **134**, 388–391.
- Tel, O. Y. & Bozkaya, F. (2012).** Identifying the bacteria causing ovine gangrenous mastitis and detection of *Staphylococcus aureus* in gangrenous milk by PCR. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* **18**, 401–406.
- Thakker, M., Park, J.-S., Carey, V. & Lee, J. C. (1998).** *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect Immun* **66**, 5183–5189.
- Tkaczyk, C., Hua, L., Varkey, R., Shi, Y., Dettinger, L., Woods, R., Barnes, A., MacGill, R. S., Wilson, S. & other authors. (2012).** Identification of anti-alpha toxin monoclonal antibodies that reduce the severity of *Staphylococcus aureus* dermonecrosis and exhibit a correlation between affinity and potency. *Clin Vaccine Immunol* **19**, 377–385.
- Tormo, M. Á., Knecht, E., Götz, F., Lasa, I. & Penadés, J. R. (2005).** Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology* **151**, 2465–2475.
- Trouillet, S., Rasigade, J.-P., Lhoste, Y., Ferry, T., Vandenesch, F., Etienne, J. & Laurent, F. (2011).** A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *J Microbiol Methods* **86**, 145–149.
- Tuchscher, L. P. N., Buzzola, F. R., Alvarez, L. P., Caccuri, R. L., Lee, J. C. & Sordelli, D. O. (2005).** Capsule-negative *Staphylococcus aureus* induces chronic experimental mastitis in mice. *Infect Immun* **73**, 7932–7937.
- Tuchscher, L. P. N., Buzzola, F. R., Alvarez, L. P., Lee, J. C. & Sordelli, D. O. (2008).** Antibodies to capsular polysaccharide and clumping factor A prevent mastitis and the emergence of unencapsulated and Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* in mice. *Infect Immun* **76**, 5738–5744.
- UniProt. (n.d.).** UniProt.
- Valle, J., Latasa, C., Gil, C., Toledo-Arana, A., Solano, C., Penades, J. R. & Lasa, I. (2012).** Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathog* **8**.
- Vancraeynest, D., Haesebrouck, F., Deplano, A., Denis, O., Godard, C., Wildemauwe, C. & Hermans, K. (2006).** International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. *J Vet Med Ser B* **53**, 418–422.
- Vandenesch, F., Lina, G. & Henry, T. (2012).** *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front Cell Infect Microbiol* **2**, 12.
- Van Belkum, A., Emons, M., Wertheim, H., de Jongh, C., Nouwen, J., Bartels, H., Cole, A., Cole, A., Hermans, P. & other authors. (2007).** The role of human innate immune factors in nasal colonization by *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect* **9**, 1471–1477.
- Van Cauwenberge, P., Van Zele, T. & Bachert, C. (2008).** Chronic rhinosinusitis and nasal polyposis: the etiopathogenesis revealed? *Verh - K Acad Voor Geneeskde Van Belg* **70**, 305–322.
- Van den Berg, S., van Wamel, W. J. B., Snijders, S. V., Ouwering, B., de Vogel, C. P., Boelens, H. A., Willems, R. J. L., Huijsdens, X. W., Verreck, F. A. W. & other authors. (2011).** Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) are natural hosts of specific *Staphylococcus aureus* lineages. *PLoS ONE* **6**, e26170.

- Van den Eede, A., Martens, A., Lipinska, U., Struelens, M., Deplano, A., Denis, O., Haesebrouck, F., Gasthuys, F. & Hermans, K. (2009).** High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. *Vet Microbiol* **133**, 138–144.
- Von Eiff, C., Becker, K., Metze, D., Lubritz, G., Hockmann, J., Schwarz, T. & Peters, G. (2001).** Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: A cause for antibiotic treatment failure in a patient with Darier's disease. *Clin Infect Dis* **32**, 1643–1647.
- Van Leeuwen, W. B., Melles, D. C., Alaidan, A., Al-Ahdal, M., Boelens, H. A. M., Snijders, S. V., Wertheim, H., Duijkeren, E. van, Peeters, J. K. & other authors. (2005).** Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **187**, 4584–4591.
- Van Loo, I., Huijsdens, X., Tiemersma, E., de Neeling, A., van de Sande-Bruinsma, N., Beaujean, D., Voss, A. & Kluytmans, J. (2007).** Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* **13**, 1834–1839.
- Van Pelt, R. W. & Dietrich, R. A. (1973).** Staphylococcal infection and toxoplasmosis in a young harbor seal. *J Wildl Dis* **9**, 258–261.
- Van Wamel, W. J. B., Rooijackers, S. H. M., Ruyken, M., Kessel, K. P. M. van & Strijp, J. A. G. van. (2006).** The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on β -hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol* **188**, 1310–1315.
- Vardakas, K. Z., Kontopidis, I., Gkegkes, I. D., Rafailidis, P. I. & Falagas, M. E. (2013).** Incidence, characteristics, and outcomes of patients with bone and joint infections due to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a systematic review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **32**, 711–721.
- Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J.-M., Chevalier, N. & Pépin, M. (2005).** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy sheep. *Vet Microbiol* **106**, 235–239.
- Vautor, E., Abadie, G., Pont, A. & Thiery, R. (2008).** Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Vet Microbiol* **127**, 407–411.
- Vautor, E., Cockfield, J., Le Marechal, C., Le Loir, Y., Chevalier, M., Robinson, D. A., Thiery, R. & Lindsay, J. (2009).** Difference in virulence between *Staphylococcus aureus* isolates causing gangrenous mastitis versus subclinical mastitis in a dairy sheep flock. *Vet Res* **40**, 56.
- Ventura, C. L., Malachowa, N., Hammer, C. H., Nardone, G. A., Robinson, M. A., Kobayashi, S. D. & DeLeo, F. R. (2010).** Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *PLoS ONE* **5**, e11634.
- Verdon, J., Girardin, N., Lacombe, C., Berjeaud, J.-M. & Héchard, Y. (2009).** δ -hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides* **30**, 817–823.
- Verkade, E. & Kluytmans, J. (2014).** Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: animal reservoirs and human infections. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* **21**, 523–530.
- Verkaik, N. J., Boelens, H. A., de Vogel, C. P., Tavakol, M., Bode, L. G. M., Verbrugh, H. A., van Belkum, A. & van Wamel, W. J. B. (2010).** Heterogeneity of the humoral immune response following *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **29**, 509–518.
- Viana, D., Blanco, J., Tormo-Más, M. Á., Selva, L., Guinane, C. M., Baselga, R., Corpa, J. M., Lasa, Í., Novick, R. P. & other authors. (2010).** Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein: molecular basis of *S. aureus* host adaptation. *Mol Microbiol* **77**, 1583–1594.

- Viçosa, G. N., Le Loir, A., Le Loir, Y., de Carvalho, A. F. & Nero, L. A. (2013).** *egc* characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates obtained from raw milk and cheese. *Int J Food Microbiol* **165**, 227–230.
- Vincze, S., Stamm, I., Monecke, S., Kopp, P. A., Semmler, T., Wieler, L. H., Lübke-Becker, A. & Walther, B. (2013).** Molecular analysis of human and canine *Staphylococcus aureus* strains reveals distinct extended-host-spectrum genotypes independent of their methicillin resistance. *Appl Environ Microbiol* **79**, 655–662.
- Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C. & Wulf, M. (2005).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis* **11**, 1965–1966.
- Wall, R. J., Powell, A. M., Paape, M. J., Kerr, D. E., Bannerman, D. D., Pursel, V. G., Wells, K. D., Talbot, N. & Hawk, H. W. (2005).** Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol* **23**, 445–451.
- Wang, R., Braughton, K. R., Kretschmer, D., Bach, T.-H. L., Queck, S. Y., Li, M., Kennedy, A. D., Dorward, D. W., Klebanoff, S. J. & other authors. (2007).** Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* **13**, 1510–1514.
- Wang, R., Khan, B. A., Cheung, G. Y. C., Bach, T.-H. L., Jameson-Lee, M., Kong, K.-F., Queck, S. Y. & Otto, M. (2011).** *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J Clin Invest* **121**, 238–248.
- Ward, P. N., Holden, M. T. G., Leigh, J. A., Lennard, N., Bignell, A., Barron, A., Clark, L., Quail, M. A., Woodward, J. & other authors. (2009).** Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. *BMC Genomics* **10**, 54.
- Watson, D., McCOLL, M. & Davies, H. (1996).** Field trial of a staphylococcal mastitis vaccine in dairy herds: clinical, subclinical and microbiological assessments. *Aust Vet J* **74**, 447–450.
- Weigel, K. A. (2006).** Prospects for improving reproductive performance through genetic selection. *Anim Reprod Sci*, Special Issue: Nutrition and Fertility in Dairy Cattle **96**, 323–330.
- Weinert, L. A., Welch, J. J., Suchard, M. A., Lemey, P., Rambaut, A. & Fitzgerald, J. R. (2012).** Molecular dating of human-to-bovid host jumps by *Staphylococcus aureus* reveals an association with the spread of domestication. *Biol Lett* **8**, 829–832.
- Weiss, A., Ibarra, J. A., Paoletti, J., Carroll, R. K. & Shaw, L. N. (2014).** The δ subunit of RNA polymerase guides promoter selectivity and virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **82**, 1424–1435.
- Wellnitz, O. & Kerr, D. E. (2004).** Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. *Vet Immunol Immunopathol* **101**, 191–202.
- Wenz, J. R., Barrington, G. M., Garry, F. B., Ellis, R. P. & Magnuson, R. J. (2006).** *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *J Dairy Sci* **89**, 3408–3412.
- Wesson, C. A., Liou, L. E., Todd, K. M., Bohach, G. A., Trumble, W. R. & Bayles, K. W. (1998).** *Staphylococcus aureus* *Agr* and *Sar* global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect Immun* **66**, 5238–5243.
- Wilson, G. J., Seo, K. S., Cartwright, R. A., Connelley, T., Chuang-Smith, O. N., Merriman, J. A., Guinane, C. M., Park, J. Y., Bohach, G. A. & other authors. (2011).** A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of Community-Associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS Pathog* **7**, e1002271.
- Wilson, G. J. C. (2011, July 5).** *Genome scale analysis of the role of superantigens in Staphylococcus aureus disease pathogenesis*. The University of Edinburgh.

- Windig, J. J., Ouweltjes, W., Ten Napel, J., de Jong, G., Veerkamp, R. F. & De Haas, Y. (2010).** Combining somatic cell count traits for optimal selection against mastitis. *J Dairy Sci* **93**, 1690–1701.
- Wobeser, G. & Kost, W. (1992).** Starvation, staphylococcosis, and vitamin A deficiency among mallards overwintering in Saskatchewan. *J Wildl Dis* **28**, 215–222.
- Wood, A. J., Fraser, J. D., Swift, S., Patterson-Emanuelson, E. A. C., Amirapu, S. & Douglas, R. G. (2012).** Intramucosal bacterial microcolonies exist in chronic rhinosinusitis without inducing a local immune response. *Am J Rhinol Allergy* **26**, 265–270.
- Wu, S., de Lencastre, H. & Tomasz, A. (1996).** Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. *J Bacteriol* **178**, 6036–6042.
- Yamada, T., Tochimaru, N., Nakasuji, S., Hata, E., Kobayashi, H., Eguchi, M., Kaneko, J., Kamio, Y., Kaidoh, T. & Takeuchi, S. (2005).** Leukotoxin family genes in *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and prevalence of *lukM-lukF-PV* genes by bacteriophages in bovine isolates. *Vet Microbiol* **110**, 97–103.
- Yamashita, K., Kawai, Y., Tanaka, Y., Hirano, N., Kaneko, J., Tomita, N., Ohta, M., Kamio, Y., Yao, M. & Tanaka, I. (2011).** Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal γ -hemolysin reveals the β -barrel pore formation mechanism by two components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17314–17319.
- Yanai, M., Rocha, M. A., Matolek, A. Z., Chintalacharuvu, A., Taira, Y., Chintalacharuvu, K. & Beenhouwer, D. O. (2014).** Separately or combined, LukG/LukH is functionally unique compared to other staphylococcal bicomponent leukotoxins. *PLoS ONE* **9**.
- Zadoks, R. N., Gillespie, B. E., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Oliver, S. P. & Schukken, Y. H. (2003).** Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol Infect* **130**, 335–349.
- Zadoks, R. N., Tikofsky, L. L. & Boor, K. J. (2005).** Ribotyping of *Streptococcus uberis* from a dairy's environment, bovine feces and milk. *Vet Microbiol* **109**, 257–265.
- Ben Zakour, N. L., Petit, M.-A. & Le Loir, Y. (2009).** Variabilité génomique des souches de *Staphylococcus aureus*. In *Staphylococcus Aureus*, Monographies de microbiologie, pp. 40–58. Edited by Y. Le Loir & M. Gautier. Paris: Lavoisier.
- Zbinden, C., Stephan, R., Johler, S., Borel, N., Bünter, J., Bruckmaier, R. M. & Wellnitz, O. (2014).** The inflammatory response of primary bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* strains is linked to the bacterial phenotype. *PloS One* **9**, e87374.
- Zeiler, E., List, A., Alte, F., Gersch, M., Wachtel, R., Poreba, M., Drag, M., Groll, M. & Sieber, S. A. (2013).** Structural and functional insights into caseinolytic proteases reveal an unprecedented regulation principle of their catalytic triad. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 11302–11307.

Résumé

Staphylococcus aureus est un des pathogènes majeurs impliqués dans les mammites chez les ruminants. Les mammites à *S. aureus* ont la particularité de présenter des tableaux cliniques très variables selon les souches et évoluent fréquemment vers la chronicité. Cette étude vise à identifier les facteurs staphylococciques impliqués dans la sévérité et la chronicité des mammites. Afin d'étudier la chronicité, les souches bovines Newbould 305 (N305), générant des mammites subcliniques chroniques et RF122, isolées de mammites aiguës ont été comparées aux niveaux génomique, protéomique et phénotypique. De façon marquante, cette étude a montré des différences dans le contenu en éléments génétiques mobiles, l'expression des gènes impliqués dans la cytotoxicité, l'invasion des tissus et l'adaptation à l'hôte. Ces indices d'adaptation entrent probablement dans la capacité de N305 à induire des mammites chroniques. En ce qui concerne la sévérité des mammites, les souches ovines O11 (sévère) et O46 (modérée) ont été utilisées. Un gène de régulation (*sigS*) identifié au cours d'une thèse précédente a été caractérisé. SigS a été muté chez O11 pour mesurer son implication dans la sévérité des mammites. Contrairement à ce qui avait été observé dans un modèle murin d'arthrite septique, la caractérisation *in vitro* et *in vivo* de O11 *sigS* montre que ce gène n'a que peu d'influence sur la virulence dans un contexte mammitaire. Ces résultats ouvrent la voie à des études plus approfondies sur certaines fonctions qui pourront être la cible de stratégies de lutte contre les mammites à *S. aureus*.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, mammitaire, sévérité, chronicité, adaptation, génomique, protéomique

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the main pathogen involved in ruminant mastitis. *S. aureus* mastitis have the peculiarity of having highly variable clinical panels depending on the strain and are prone to chronicity. This study aims to identify staphylococcal factors involved in the severity and chronicity of mastitis. To investigate the chronicity, two bovine strains isolated from chronic subclinical (Newbould 305) and acute mastitis (RF122) were compared using genomic and proteomic techniques combined with phenotype characterization... In particular, this study showed differences in content of mobile genetic elements, the expression of genes involved in cytotoxicity, tissue invasion and adaptation to the host. The range of bovine-adaptive features might account for the propensity of N305 to persistence and mild and chronic mastitis. Regarding severity of mastitis, ovine strains O11 (acute) and O46 (mild) were used. A regulatory gene (*sigS*) identified in a previous thesis was characterized. SigS was mutated in O11 to measure its involvement in the severity of mastitis. Contrary to its role in infection in a septic arthritis murine model, our *in vitro* and *in vivo* characterization shows that SigS hardly influence *S. aureus* virulence. in a mastitis context. These studies give clues for further research on features that may be targeted in future strategies against *S. aureus* mastitis.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, mastitis, severity, chronicity, adaptation, genomics, proteomics