

EXAMEN CRITIQUE DES APPROCHES VACCINALES POUR LUTTER CONTRE LES MAMMITES BOVINES

CRITICAL APPRAISAL OF VACCINE APPROACHES TO CONTROL BOVINE MASTITIS

Par Pascal RAINARD⁽¹⁾

(Communication présentée le 6 novembre 2014)

RÉSUMÉ

Les vaccins contre les mammites sont peu nombreux à être commercialisés et peu utilisés en raison d'une efficacité limitée. Il semble que la mamelle ait établi avec ses agents pathogènes un *modus vivendi* qui favorise le maintien d'infections chroniques subcliniques. La reprogrammation de cette immunité par la vaccination dans un sens favorisant l'élimination des infections sans compromettre la fonction sécrétoire pose un défi majeur aux immunologistes. Pour améliorer l'efficacité des vaccins, les défenses immunitaires dépendantes des lymphocytes T ne devraient plus être négligées. Dans cette optique, une meilleure connaissance des populations lymphocytaires mammaires, associée aux approches de la vaccinologie systématique, devrait offrir de nouvelles perspectives de développement de vaccins efficaces.

Mots-Clés : mammites, vaccin, lymphocyte T, corrélat de protection.

SUMMARY

*Despite their interest to combat mastitis, vaccines are few and underused, owing to limited efficacy. The mammary gland may have established with its pathogens a *modus vivendi* that favours the settlement of chronic subclinical infections. Reprogramming this immune response in a way that favours bacteriological cure but spares the secretory function presents a major challenge to immunologists. To improve vaccine efficacy, stress should be put on research on T lymphocyte-dependent immune defenses. In this view, improved knowledge of mammary lymphocyte populations, in association with systems vaccinology approaches, should offer new prospects for the development of efficient vaccines.*

Key-Words: mastitis, vaccine, T lymphocyte, correlate of protection.

(1)Pascal Rainard : INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France - Université François-Rabelais de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000 Tours, France - pascal.rainard@tours.inra.fr

INTRODUCTION

Les infections mammaires sont une maladie majeure des ruminants laitiers. Leur éradication est impossible par la prophylaxie sanitaire et elles sont la cause principale de l'utilisation des antibiotiques en élevage laitier. Des vaccins efficaces constitueraient un complément utile pour le contrôle des mammites.

La quête pour un vaccin efficace contre les mammites des ruminants laitiers n'est pas une démarche nouvelle. Dans une revue publiée en 1978, J. Anderson rapporte qu'en 1938 on pouvait déjà recenser 87 comptes rendus d'essais de vaccination contre les mammites staphylococciques chez la vache et qu'au moment où il écrivait son article, l'attitude générale était à un « optimisme exaspéré » : il suffirait de sélectionner les bons antigènes, de les administrer par la voie adéquate et au bon moment du cycle de lactation (Anderson, 1978). Près de quarante ans plus tard, quelques centaines d'articles ont été publiés, 565 recensés en 2014 dans la base de données CAB Abstracts avec les mots clés « mastitis » et « vaccine ».

Sur quels résultats tangibles ces abondantes recherches ont-elles débouché ? Il n'y a actuellement que deux vaccins commercialisés en Amérique du Nord, l'un contre les mammites staphylococciques, l'autre contre les mammites colibacillaires, et un seul vaccin commercialisé en Europe (StartVac[®], Hipra), aucun en Nouvelle Zélande (Denis *et al.*, 2009). Pourtant ces vaccins sont soit relativement anciens (Lysigin[®] Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc, St Joseph MO, USA, lysat de 5 souches de *Staphylococcus aureus*, et vaccins à base de la souche rough de *Escherichia coli* J5), soit récent (StartVac[®]) mais reposant sur des concepts conçus il y a plus de trente ans. Ils sont tous à base de bactéries tuées, n'ont pas fait preuve d'effet de prévention de l'infection en conditions expérimentales et ne présentent qu'un bénéfice marginal dans les conditions du terrain (Erskine, 2012, Middleton, 2008). En effet l'efficacité des vaccins testée dans les conditions naturelles donne des résultats variables selon les essais et souvent variable d'un troupeau à l'autre dans un même essai (Poutrel & Le Page, 2012).

LES OBJECTIFS ATTENDUS D'UN VACCIN

Pour pouvoir apprécier l'efficacité d'un vaccin, un préalable est de définir les objectifs attendus de la vaccination, et les critères d'évaluation correspondants. Dans le cas des mammites, les objectifs peuvent différer en fonction de l'agent pathogène en cause. Pour les agents pathogènes fréquemment associés à des mammites cliniques sévères (comme *E. coli* ou *S. aureus*), un objectif suffisant peut être de réduire la sévérité de la phase clinique et des séquelles tissulaires compromettant la production de lait, alors que pour les pathogènes les plus contagieux (*Streptococcus agalactiae*) ou provoquant des infections moins sévères voire subcliniques mais chroniques (comme *Streptococcus uberis*) une immunité stérilisante sera recherchée. L'efficacité du vaccin sera alors appréciée selon des critères différents : diminution du nombre de nouvelles infections (effet

préventif) ou augmentation de la proportion d'infections se terminant par une guérison bactériologique (immunité stérilisante), diminution de la fréquence de mammites cliniques, ou simple réduction des pertes économiques liées aux infections mammaires.

LES RAISONS PROBABLES DE L'INSUCCÈS DES TENTATIVES VACCINALES

Pour apprécier la difficulté de l'entreprise, il faut prendre en compte les particularités du processus infectieux et de la réponse immunitaire dans la mamelle. La très grande majorité des infections mammaires sont d'origine ascendante, résultant du passage de bactéries au travers du canal du trayon. Les mammites sont essentiellement des infections des citernes, des canaux et des alvéoles, donc des infections de l'épithélium mammaire, généralement peu invasives. Dans la mamelle en lactation, le lait est un très bon milieu de culture pour les bactéries, qui se multiplient avec un temps de génération de 20 à 30 minutes. Parmi les obstacles à l'efficacité des vaccins, il faut mentionner l'effet inhibiteur du lait sur l'efficacité phagocytaire des polynucléaires neutrophiles, la forte dilution des éléments de défense (anticorps, complément, peptides antimicrobiens) par le lait, l'absence de mucus protecteur et d'une forte concentration d'IgA, l'importance de la surface épithéliale à protéger et la diversité des agents pathogènes responsables de mammites (Colditz & Watson, 1985).

Pour être un agent pathogène mammaire efficace, une bactérie doit pouvoir franchir le canal du trayon, se multiplier rapidement dans du lait de glande saine, et être capable de résister ou d'échapper, même imparfaitement, aux défenses mobilisées par l'inflammation mammaire. Un facteur d'adaptation est la capacité à ne pas induire de réaction forte du système immunitaire, ce qui explique le succès des staphylocoques coagulase négative (SCN), ou de résister même partiellement à la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles (PNN), comme le fait *S. aureus*. On peut considérer que les bactéries responsables d'infections mammaires chroniques sont capables d'adopter des modes furtifs de survie intramammaire, ce qui leur permet d'échapper aux défenses immunitaires et de coloniser durablement la mamelle (Rainard & Foucras, 2012). Une bactérie comme *E. coli* peut être considérée comme moins bien adaptée à la mamelle, dans la mesure où elle induit généralement une réaction inflammatoire intense et est généralement éliminée de la mamelle en quelques jours. Ces bactéries ont en commun d'être des pathogènes opportunistes, et de causer des infections sans nécessairement posséder des facteurs de virulence agressifs notables (à l'exception des souches toxigènes de *S. aureus*). Ce constat laisse présager qu'une approche vaccinale basée sur la neutralisation d'un facteur de virulence majeur est vouée à l'échec car sans objet. La longue coévolution de la mamelle avec les bactéries adaptées au parasitisme intramammaire observé dans les mammites chroniques subcliniques suggère aussi que de son côté le système immunitaire mammaire s'est

adapté pour tolérer ce parasitisme tout en préservant l'essentiel de l'activité sécrétoire qui est sa raison d'être (**Tableau 1**).

Caractéristiques des pathogènes mammaires	Conséquences attendues
Bactéries commensales, pathogènes opportunistes pour la mamelle	Tolérées par le système immunitaire ?
Adaptation à la mamelle : bactéries furtives	Réponse immunitaire amoindrie
Facteurs de virulence agressifs pas indispensables	Les réponses anticorps réduisent la sévérité mais n'empêchent pas la chronicité
Ne sont pas normalement présentes dans la mamelle	Induisent une réaction inflammatoire d'intensité variable selon leur degré d'adaptation au parasitisme mammaire
Induisent des infections de longue durée	Réponse immunitaire à l'équilibre entre le contrôle de l'infection et la fonction sécrétoire

Tableau 1 - Les bactéries bien adaptées au parasitisme intramammaire sont peu agressives et n'induisent pas de fortes réactions immunitaires, conséquence probable d'une longue coévolution avec leurs hôtes

Pour apprécier la difficulté de la tâche, on peut encore mentionner qu'une seule bactérie viable suffit à induire une infection mammaire (Newbould & Neave, 1965) et la capacité de bactéries GRAS (Generally recognized as safe) comme *Lactococcus lactis* à induire des mammites, ce qui suggère une faible défense immunitaire de la glande saine, et implique la nécessité d'une réaction forte à l'intrusion bactérienne pour juguler l'infection. On sait que cette réaction est d'autant plus efficace qu'elle est précoce (Colditz & Watson, 1985). On sait aussi que la mamelle est réactive à une variété d'agonistes bactériens du système immunitaire inné (Bougarn *et al.*, 2010, Porcherie *et al.*, 2012), ce qui se traduit par une réaction inflammatoire caractérisée par un afflux rapide et souvent massif de PNN et d'autres leucocytes dans le lait.

Le rhéostat de détection du système immunitaire inné de la mamelle est « réglé » à un niveau assez élevé de sensibilité, comme attendu d'un organe normalement stérile. En conséquence, toute intrusion bactérienne va induire une réaction inflammatoire. Cette réaction peut-elle être modifiée, et son efficacité améliorée, par l'immunité adaptative ? La réponse à cette question est au cœur de la problématique vaccinale des mammites.

ABSENCE D'INDUCTION DE PROTECTION PAR L'INFECTION DE LA MAMELLE

Souvent les vaccins cherchent à reproduire la ou les défenses immunitaires protectrices induites par l'infection naturelle, lorsque celle-ci induit une protection contre une réinfection. Il serait donc rassurant de savoir que les infections mammaires induisent une bonne protection. Malheureusement

ce n'est pas le cas. Il est possible de réinfecter après guérison un même quartier avec la souche bactérienne utilisée pour la première infection, avec assez peu de modification de réponse inflammatoire, lorsque la souche utilisée est bien adaptée à la mamelle, c'est-à-dire ne provoque pas de mammité sévère. On peut considérer que les vaches sont déjà protégées des formes les plus sévères lors de la première infection mammaire et ne le sont guère mieux par la suite. Toutefois, l'infection naturelle ou expérimentale induit une réponse immunitaire mesurable au travers d'une production d'anticorps (Hill *et al.*, 1983). Cette immunité n'est pas très efficace, incapable de prévenir l'infection et son passage à la chronicité, mais capable de réduire la sévérité de la phase aiguë initiale (Hill, 1988). De plus, l'effet protecteur est limité à la souche causale et aux souches étroitement apparentées.

On peut cependant se demander s'il s'agit d'une faible réponse immunitaire, d'une réponse inadaptée, ou d'une réponse adaptée permissive. On peut remarquer que dans la plupart des infections mammaires, l'infection est contenue dans des limites compatibles avec une fonction sécrétoire préservée. C'est en particulier le cas des infections par SCN, qui peuvent même sembler favorable à la production de lait (Vanderhaeghen *et al.*, 2014). On pourrait alors parler de portage plus que d'infection. Est-ce que ce *modus vivendi* résulte d'une coévolution entre l'hôte et le pathogène, avec du côté du pathogène une adaptation au parasitisme intramammaire et du côté de l'hôte, une modération de la réponse immunitaire ? Dans cette hypothèse, on a atteint un équilibre dans la relation hôte/pathogène dans la mamelle, et toute tentative pour la modifier pourrait conduire à une dégradation de la situation (**Figure 1**).



Figure 1 : Interaction des bactéries responsables de mammité avec le système immunitaire de l'hôte. La longue coévolution des bactéries responsables d'infections mammaires a pu conduire à une adaptation à la « niche intramammaire », se traduisant par une agressivité réduite. Envers ces bactéries parasites, le système immunitaire tempère sa réponse, qui peut être considérée comme permissive. D'autres bactéries, que l'on peut considérer comme moins adaptées à la niche intramammaire, sont plus agressives, et induisent des réponses immunitaires innées (réaction inflammatoire intense) et adaptatives (hypersensibilité) fortes.

ÉTUDE CRITIQUE DES APPROCHES VACCINALES POSSIBLES

Approches utilisées dans le passé et récemment

Les premiers essais de vaccination contre les infections par *S. aureus* et *S. agalactiae* ont reposé sur l'utilisation de bactéries entières tuées par la chaleur ou le formol. Avec *S. aureus* des toxines inactivées étaient souvent associées aux préparations vaccinales en vue d'induire des anticorps neutralisants. Des essais ont également été réalisés avec des bactéries vivantes injectées par voie parentérale. En général, les réponses induites par les bactéries vivantes étaient plus efficaces que celles obtenues avec les bactéries tuées (Lascelles, 1979, Watson & Kennedy, 1981). L'explication généralement avancée est que les bactéries expriment *in vivo* des antigènes qui ne sont pas produits en culture *in vitro*. Cette théorie a donné lieu à des tentatives pour induire *in vitro* des composants bactériens jugés importants pour la protection, comme les antigènes capsulaires et le « slime » produit par de nombreuses souches de staphylocoques. Cette approche développée en Australie (Watson, 1992) a été reprise récemment pour le vaccin StartVac®. Ce vaccin, récemment autorisé en Europe, qui repose sur l'utilisation de bactéries tuées, n'innove guère sur le plan de sa composition ou du type d'adjuvant utilisé. La situation des mammites colibacillaires est assez différente car un vaccin à base de bactéries tuées (souche « rough » J5) a été développé assez rapidement (Gonzalez *et al.*, 1989). La souche J5, qui a fait l'objet de nombreux essais impliquant divers adjuvants et protocoles d'immunisation, est à la base de plusieurs vaccins commercialisés, et entre dans la composition du vaccin StartVac®. S'il est largement admis que les vaccins de type J5 réduisent la sévérité des mammites colibacillaires, les mécanismes sous-jacents à cet effet protecteur n'ont pas été identifiés. Dans le cas de *S. uberis*, des essais avec des bactéries tuées ou vivantes ont montré qu'une certaine protection pouvait être obtenue, et il est apparu que cette protection semblait indépendante de l'afflux de PNN dans le lait, à la différence des autres infections mammaires. Les recherches se sont alors orientées vers d'autres directions (Leigh, 2000).

Les tentatives pour développer des vaccins basés sur l'utilisation d'agents immunogènes mieux définis ont été nombreuses. De nombreuses protéines ont été présélectionnées comme composants de vaccins de type sous-unité, et utilisées après purification ou production sous forme de protéines recombinantes. L'approche sous-unité a également été explorée avec des vaccins ADN et des immunisations de type « prime-boost » associant des séquences d'immunisation avec des protéines purifiées et un vaccin ADN (Shkreta *et al.*, 2004). Dans tous les cas, que ce soit avec les préparations à base de bactéries entières ou de composants bactériens isolés, ce sont les réponses humorales qui ont été recherchées et mesurées. L'immunité à médiation humorale a toujours été privilégiée,

pourtant aucun corrélat immunologique de risque ou de protection basés sur les titres anticorps n'a été validé.

Nouvelles approches permises par les avancées conceptuelles et techniques de la vaccinologie

La plupart des recherches publiées récemment ne sont pas basées sur de nouvelles approches. Au mieux, ce sont des réactualisations d'approches anciennes, en fonction des connaissances acquises sur les pathogènes. Si les approches classiques fondées sur l'étude des réponses à l'infection ne donnent pas de résultats satisfaisants, sur quelles connaissances peut-on fonder de nouvelles approches ? Les recherches sur le système immunitaire inné de la mamelle des ruminants ont fourni des connaissances assez développées (Aitken *et al.*, 2011, Rainard & Riollet, 2006), et ce domaine de recherche reste actif, notamment en ce qui concerne la contribution des cellules épithéliales mammaires (Gilbert *et al.*, 2013, Günther *et al.*, 2011). En comparaison, les recherches sur l'immunité mammaire adaptative à médiation cellulaire, après avoir fait l'objet d'assez nombreuses études dans les années 1980-1990, sont pratiquement au point mort, et restent très lacunaires. Pourtant il y a une prise de conscience que ce domaine de recherche a été négligé, et qu'il offre probablement le plus de perspectives d'innovation (Denis *et al.*, 2009). On peut signaler quelques travaux sur le rôle des lymphocytes T CD8+ (Wedlock *et al.*, 2014) et les cellules produisant de l'IL-17A dans la mamelle (Rainard *et al.*, 2013). Un domaine très important comme la domiciliation des lymphocytes T effecteur-mémoire dans la mamelle reste non résolu (Hodgkinson *et al.*, 2007). Une prise de conscience de l'importance vaccinale de l'immunité médiée par les lymphocytes T a eu lieu en médecine humaine, par les chercheurs aux prises avec le développement de vaccins contre des infections réfractaires jusqu'à nos jours, dont certaines sont causées par des espèces pathogènes que l'on retrouve parmi les agents majeurs des infections mammaires (*S. aureus*, *E. coli*). Cette constatation n'est pas forcément de bon augure, car les vaccins qui dépendent d'une immunité à médiation cellulaire sont particulièrement difficiles à mettre au point (Burchill *et al.*, 2013).

Deux lacunes majeures dans nos connaissances de l'immunité adaptative peuvent être identifiées en relation avec la conception de vaccins : l'une concerne les modalités de la migration des lymphocytes T effecteur-mémoire dans la mamelle, l'autre l'identification des lymphocytes T inductibles par la vaccination qui pourraient jouer un rôle de premier plan dans la défense de la mamelle. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et les lymphocytes auxiliaires T CD4+ produisant de l'IL-17 (Th17) ou de l'IFN- γ (Th1) sont des candidats possibles (Figure 2).

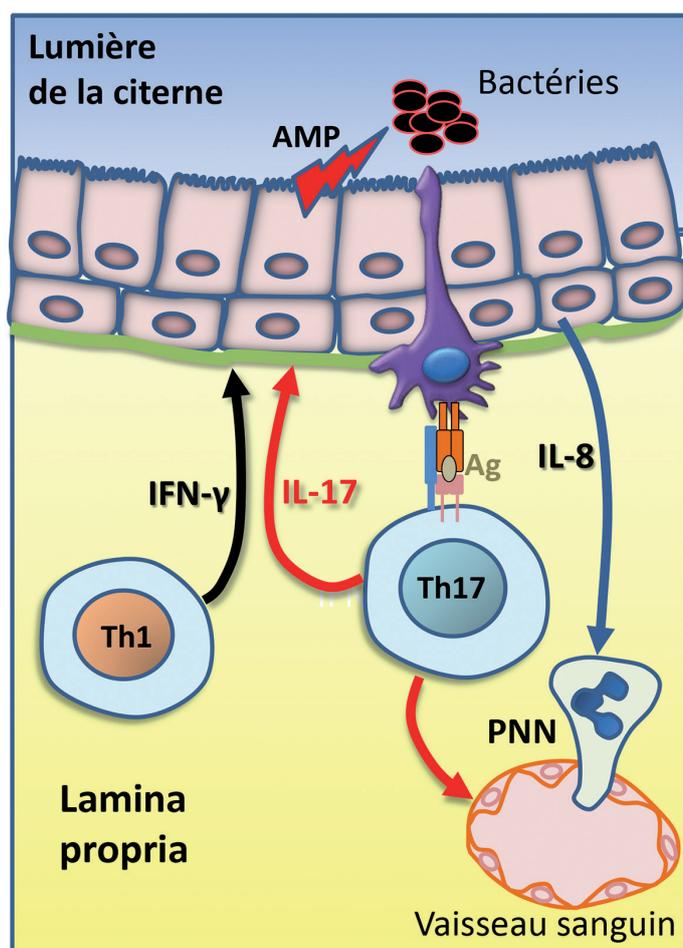


Figure 2 : Schéma hypothétique des mécanismes d'action par lesquels des lymphocytes T induits par la vaccination pourraient protéger la mamelle contre une infection. Une réponse précoce à une intrusion bactérienne suppose la présence de lymphocytes T mémoire patrouillant dans la mamelle ou résidant en position sous-épithéliale (lamina propria), capables de réagir immédiatement à la présentation de leur antigène spécifique par une cellule présentatrice. Selon ce schéma, les lymphocytes Th17, en sécrétant de l'IL-17, agirait sur les cellules endothéliales pour favoriser le recrutement de leucocytes circulants, et sur les cellules épithéliales pour induire la sécrétion de chimiokines comme l'IL-8 et de peptides antimicrobiens (AMP). Les lymphocytes Th1 de leur côté en sécrétant de l'IFN- γ , agirait sur les cellules épithéliales et sur les polymorphonucléaires neutrophiles (PNN) pour amplifier leurs réponses antibactériennes.

À supposer que l'induction d'une immunité cellulaire de type CD8 cytotoxique ou Th17 soit bénéfique dans certains types d'infection mammaire, de nombreux obstacles se dresseront encore sur le chemin de la mise au point d'un vaccin mammitaire. On peut citer les modalités d'orientation de la réponse immunitaire dans la direction voulue (antigène, adjuvant), la persistance de cette réponse pendant une durée suffisante pour couvrir la période à risque, l'obtention d'une forte proportion d'animaux bon-répondeurs, et une couverture large des souches responsables de la majorité des infections (choix des antigènes).

Un prérequis de l'efficacité d'un vaccin est l'induction de populations lymphocytaires T mémoire nombreuses et persistantes (Salerno-Goncalves & Szein, 2006). Pour une inter-

vention rapide en réponse à une intrusion bactérienne, il serait nécessaire d'induire des cellules mémoire résidant dans la mamelle ou patrouillant dans les tissus périphériques dont la mamelle, prêts à répondre instantanément. Il reste à préciser comment induire de façon préférentielle et efficace la catégorie de lymphocytes T mémoire appropriée, avec le bon schéma d'immunisation. Une meilleure connaissance de la réponse immunitaire innée des leucocytes bovins sera nécessaire pour améliorer les performances des immunoadjuvants, notamment pour l'induction de réponses immunitaires T-dépendantes chez les ruminants. Se posera aussi le problème du maintien de cette population en quantité suffisante dans le temps, autrement dit le problème de la persistance des lymphocytes T mémoire en absence de stimulation antigénique.

Pour progresser rapidement dans ces nouvelles directions, il sera indispensable de valider des corrélats de l'immunogénicité se prêtant à des analyses à moyen ou haut-débit. Ces corrélats sont des paramètres mesurables de la réponse immunitaire qui permettent de qualifier une réponse immunitaire sur les plans quantitatifs et qualitatifs. En particulier ces corrélats devront permettre de mesurer et de préciser la nature précise de la réponse vaccinale T-dépendante, qui conditionne l'effet protecteur (Seder *et al.*, 2008). Des corrélats fiables rendront possible le criblage des modalités favorables à l'induction de la réponse recherchée. Il sera également très utile d'identifier des corrélats de protection suffisamment robustes pour limiter les essais expérimentaux contrôlés (infections mammaires induites), pourtant indispensables à la mesure des paramètres immunologiques et aux modifications du processus infectieux induites par la vaccination. Afin de tirer le meilleur parti des essais contrôlés en station expérimentale ou sur le terrain, les approches de biologie des systèmes qui se développent activement en médecine humaine seront particulièrement utiles (Germain, 2010). En effet, la « vaccinologie systématique » souffre moins du déficit d'outils immunologiques disponibles en immunologie vétérinaire que les approches mécanistiques classiques. Un obstacle cependant à la mise en œuvre de l'approche mettant en œuvre la vaccinologie systématique est qu'il requiert la mise en place de réseaux pluridisciplinaires associant des bactériologistes, des immunologistes, des physiologistes, des généticiens, des biologistes moléculaires et des bioinformaticiens. Ces projets d'envergure, qui mobilisent du personnel et nécessitent des budgets conséquents, sont peu usités en médecine vétérinaire en dehors des projets multinationaux.

En conclusion, de nouvelles approches sont rendues possibles par de nouveaux outils et de nouveaux concepts, comme la protection des épithéliums par des lymphocytes de la famille des Th17, et la biologie des systèmes appliquée à la vaccinologie. Ces approches nourrissent de nouveaux espoirs de trouver

des moyens de développer des vaccins plus efficaces que les vaccins actuels. Ces approches gagneraient à être fondées sur une meilleure compréhension de l'immunité mammaire, en particulier quant aux capacités fonctionnelles des leucocytes du tissu mammaire. L'orientation des recherches vers la

protection dépendante des lymphocytes T sera probablement féconde, mais posera des problèmes difficiles à résoudre comme l'identification de corrélats immunologiques de la protection fiables et robustes, la découverte d'immunoadjuvants adaptés, et l'induction de réponses adaptées et durables dans la mamelle.

BIBLIOGRAPHIE

- Aitken, S. L., *et al.* 2011. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16: 291-304.
- Anderson, J. C. 1978. The problem of immunization against staphylococcal mastitis. *Br Vet J* 134: 412-20.
- Bougarn, S., *et al.* 2010. Muramyl dipeptide synergizes with *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid to recruit neutrophils in the mammary gland and to stimulate mammary epithelial cells. *Clin Vaccine Immunol* 17: 1797-1809.
- Burchill, M. A., *et al.* 2013. T cell vaccinology: exploring the known unknowns. *Vaccine* 31: 297-305.
- Colditz, I. G. & Watson, D. L. 1985. The immunophysiological basis for vaccinating ruminants against mastitis. *Aust Vet J* 62: 145-53.
- Denis, M., *et al.* 2009. Vaccines against bovine mastitis in the New Zealand context: what is the best way forward? *N Z Vet J* 57: 132-40.
- Erskine, R. J. 2012. Vaccination strategies for mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 28: 257-70.
- Germain, R. N. 2010. Vaccines and the future of human immunology. *Immunity* 33: 441-50.
- Gilbert, F. B., *et al.* 2013. Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Vet Res* 44: 40.
- Gonzalez, R. N., *et al.* 1989. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. *Can J Vet Res* 53: 301-5.
- Günther, J., *et al.* 2011. Comparative Kinetics of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-Specific Activation of Key Immune Pathways in Mammary Epithelial Cells Demonstrates That *S. aureus* Elicits a Delayed Response Dominated by Interleukin-6 (IL-6) but Not by IL-1A or Tumor Necrosis Factor Alpha. *Infect Immun* 79: 695-707.
- Hill, A. W. 1988. Protective effect of previous intramammary infection with *Streptococcus uberis* against subsequent clinical mastitis in the cow. *Res. Vet. Sci.* 44: 386-387.
- Hill, A. W., *et al.* 1983. Increase in specific opsonic activity in bovine milk following experimental *Escherichia coli* mastitis. *Res. Vet. Sci.* 35: 222-226.
- Hodgkinson, A. J., *et al.* 2007. Adhesion molecule expression in the bovine mammary gland. *Vet Immunol Immunopathol* 115: 205-15.
- Lascelles, A. K. 1979. The immune system of the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis. *J Dairy Sci* 62: 154-67.
- Leigh, J. A. 2000. Vaccines against bovine mastitis due to *Streptococcus uberis* current status and future prospects. *Adv Exp Med Biol* 480: 307-11.
- Middleton, J. R. 2008. *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Expert Review of Vaccines* 7: 805-815.
- Newbould, F. H. S. & Neave, F. K. 1965. The response of the bovine mammary gland to an infusion of staphylococci. *J. Dairy Res.* 32: 163-170.
- Porcherie, A., *et al.* 2012. Répertoire of *Escherichia coli* agonists sensed by innate immunity receptors of the bovine udder and mammary epithelial cells. *Vet Res* 43: 14.
- Poutrel, B. & Le Page, P. 2012. Prévention vaccinale (Startvac) des mammites à staphylocoques et à coliformes de la vache laitière. *Bulletin des GTV n°67*: 21-26.
- Rainard, P., *et al.* 2013. T helper 17-associated cytokines are produced during antigen-specific inflammation in the mammary gland. *PLOS One* 8(5): e63471.
- Rainard, P. & Foucras, G. 2012. Échec à la vaccination: bactéries furtives et infections mammaires récalcitrantes ? *Le Nouveau Praticien Vétérinaire - élevage et santé* 5: 50-56.
- Rainard, P. & Riollot, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res* 37: 369-400.
- Salerno-Goncalves, R. & Szein, M. B. 2006. Cell-mediated immunity and the challenges for vaccine development. *Trends Microbiol* 14: 536-42.
- Seder, R. A., *et al.* 2008. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 8: 247-58.
- Shkreta, L., *et al.* 2004. Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. *Vaccine* 23: 114-26.
- Vanderhaeghen, W., *et al.* 2014. Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus species* associated with ruminant udder health. *J Dairy Sci* 97: 5275-5293.
- Watson, D. L. 1992. Staphylococcal mastitis vaccine. *Vaccine* 10: 359.
- Watson, D. L. & Kennedy, J. W. 1981. Immunisation against experimental staphylococcal mastitis in sheep - effect of challenge with a heterologous strain of *Staphylococcus aureus*. *Aust Vet J* 57: 309-13.
- Wedlock, D. N., *et al.* 2014. Dairy cows produce cytokine and cytotoxic T cell responses following vaccination with an antigenic fraction from *Streptococcus uberis*. *Vet Immunol Immunopathol* 160: 51-60.