



**DÉVELOPPEMENT D'UN VACCIN VIVANT ATTÉNUÉ  
POUR LA PROTECTION CONTRE LES INFECTIONS INTRAMAMMAIRES  
À PARTIR D'UN *SMALL-COLONY VARIANT (SCV)* DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

par

Julie Côté-Gravel

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

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Janvier 2015

Le 20 janvier 2015

*le jury a accepté le mémoire de Madame Julie Côté-Gravel  
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur François Malouin

Directeur de recherche

Département de biologie

Professeur Brian G. Talbot

Codirecteur de recherche

Département de biologie

Professeur Sébastien Roy

Évaluateur interne

Département de biologie

Professeur Ryszard Brzezinski

Président-rapporteur

Département de biologie

## SOMMAIRE

*Staphylococcus aureus* est un pathogène opportuniste au potentiel de virulence élevé et particulièrement diversifié. Responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, d'infections systémiques graves, celui-ci est pleinement capable de causer la mortalité chez des patients immunodéprimés. Pourtant, *S. aureus* est également la cause de divers types d'infections à fort caractère chronique et de persistance chez l'homme et les animaux, infections qui sont difficiles à traiter par antibiothérapie, et qui le plus souvent échappent au contrôle du système immunitaire.

Les mammites à *S. aureus* sont considérées comme l'une des maladies majeures chez les bovins d'élevage, causant de lourdes pertes économiques pour l'industrie laitière. Elles se caractérisent fréquemment par des formes sous-cliniques et chroniques, rendant leur diagnostic et contrôle difficiles. La vaccination contre les infections intramammaires à *S. aureus* pourrait permettre de protéger les animaux contre les nouvelles infections, diminuant la propagation contagieuse du pathogène lors de la traite, et permettre ainsi de réduire la prévalence de celui-ci dans les troupeaux. Pourtant, aucune formulation n'a pu montrer de réelle efficacité de protection à ce jour. Puisque le déploiement d'une immunité adaptative strictement basée sur la réponse en anticorps n'est pas adéquat pour protéger contre un pathogène chronique tel que *S. aureus*, le besoin criant de développer de nouvelles méthodes et formulations de vaccin se penche maintenant sur l'amélioration de la réponse à médiation cellulaire, considérée indispensable pour une meilleure protection.

Les vaccins vivants atténués, basés sur leur capacité à imiter une infection naturelle, ont su prouver leur efficacité dans le développement d'immunités spécifiques et fortes contre de nombreux microorganismes, en particulier les pathogènes intracellulaires et chroniques. On a démontré que ces souches atténuées peuvent être utilisées comme vecteurs antigéniques et aider à balancer la réponse vers des fonctions effectrices de l'immunité qui permettent de combattre plus adéquatement ce type d'infections.

Cette étude a eu pour objectif principal la construction d'une souche atténuée de *S. aureus* pour l'utilisation à titre de vaccin vivant contre les infections intramammaires. Cette souche vaccinale atténuée est fondée sur la stabilisation génétique du phénotype *small-colony variant*, à la fois comme base d'atténuation de la virulence et comme facteur permettant l'internalisation temporaire et non destructive dans les cellules de l'hôte. Cette souche a été caractérisée et évaluée dans un modèle d'infection de cellules en culture et dans un modèle *in vivo* de mammite chez la souris, qui ont tous deux pu confirmer sa robuste atténuation et établir une première preuve de son innocuité comme vaccin.

**Mots clés :** *Staphylococcus aureus* ; Mammite bovine ; vaccination ; *small-colony variant* ; vaccin atténué

## REMERCIEMENTS

J'aimerais avant tout remercier mon directeur de recherche, Pr. François Malouin, pour l'opportunité de ce projet mais surtout pour son rôle de mentor, sa grande expertise scientifique et la confiance qu'il accorde en ses étudiants de bien représenter sa recherche.

Merci également à mon co-directeur Dr. Brian G. Talbot, aux membres de mon comité conseil Dr. Ryszard Brzezinski et Dr. Sébastien Roy ainsi qu'à Dr. Céline Ster pour le soutien scientifique.

J'aimerais exprimer toute ma gratitude à mon ami Eric Brouillette, pour son appui, son inspiration et pour la précieuse contribution scientifique à ce projet, tant au niveau expérimental qu'intellectuel.

Également, je tiens à remercier Nataša Obradović pour sa participation à la complétion de ces travaux lors de son mandat de stage, mais également pour son support précieux qui a été tout aussi apprécié.

Ma reconnaissance va aussi à mes amis et autres collègues de travail, pour m'avoir si bien accompagnée et épaulée depuis le début de mes études au baccalauréat. Et à ma famille, Isabelle, Alain et Alex : merci de m'avoir toujours encouragée et soutenue dans la poursuite de mes études et à m'accomplir à travers ce qui me passionne.

Finalement, merci au Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine et la qualité du lait (RCRMBQL) pour l'opportunité de réseautage, la précieuse mise en valeur de notre recherche et, avec les autres contributeurs financiers, pour le soutien des projets de vaccination.

## TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE.....	i
REMERCIEMENTS .....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	vi
LISTE DES FIGURES.....	x
CHAPITRE I .....	11
INTRODUCTION.....	11
1.1 La mammite bovine.....	11
1.2 Les infections intramammaires (IIMs) à <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
1.2.1 Diagnostic.....	13
1.2.2 Efficacité des traitements.....	14
1.2.3 Pathogénèse de <i>Staphylococcus aureus</i> dans l’IIM.....	14
1.3 <i>S. aureus small-colony variant</i> .....	17
1.3.1 Caractéristiques phénotypiques et bases génétiques.....	17
1.3.2 Construction de SCVs génétiquement stables .....	18
1.3.3 Facteurs d’émergence et résistance aux antibiotiques.....	19
1.3.4 Facteurs transcriptionnels de la persistance des SCVs.....	20
1.4 La vaccination contre les IIMs à <i>S. aureus</i> .....	22
1.4.1 Vaccination vs. Antibiothérapie .....	22
1.4.2 Buts spécifiques visés par la vaccination.....	23
1.4.3 Revue des formulations et cibles antigéniques mises à l’essai.....	24
1.4.3.1 Vaccins inactivés et lysats cellulaires .....	25
a) Vaccins inactivés disponibles sur le marché.....	25
b) Autres vaccins inactivés mis à l’essai.....	26
1.4.3.2 Vaccins sous-unitaires et à ADN.....	27
a) Cibles protéiques.....	27
b) Cibles polysaccharidiques .....	29
1.4.3.3 Bactéries atténuées.....	30

1.5 Les vaccins vivants atténués .....	30
1.5.1 Caractéristiques et avantages des vaccins vivants .....	31
1.5.2 Les vaccins vivants pour la stimulation de l'immunité mucoale .....	32
1.5.3 Stratégies d'atténuation et équilibre immunogénicité/réactivité .....	33
1.5.4 Vaccins vivants comme vecteurs antigéniques.....	34
1.5.5 Vaccins vivants atténués contre les IIMs à <i>S. aureus</i> .....	36
1.5.5.1 Importance de l'immunité à médiation cellulaire (IMC) pour la protection .....	36
1.5.5.2 Exemples de souches atténuées de <i>S. aureus</i> pour la vaccination homologue.....	37
1.6 Mise en contexte du projet .....	38
1.6.1 Travaux précédents.....	38
1.6.2 Hypothèse et objectifs de recherche .....	39
CHAPITRE II.....	41
Article 1 .....	41
<i>Characterization of a genetically stable Staphylococcus aureus small-colony variant for use as a live-attenuated vaccine against intramammary infections</i> .....	41
2.1 Avant-propos.....	41
2.2 Contributions des auteurs.....	42
2.3 Résumé de l'article en français .....	43
2.4 TITLE PAGE .....	44
2.5 ABSTRACT .....	45
2.6 INTRODUCTION .....	46
2.7 MATERIAL AND METHODS .....	48
2.8 RESULTS .....	54
2.9 DISCUSSION .....	67
2.10 ACKNOWLEDGEMENTS .....	72
2.11 REFERENCES.....	72
CHAPITRE III.....	79
DISCUSSION GÉNÉRALE .....	79
CHAPITRE IV .....	85
CONCLUSION .....	85
BIBLIOGRAPHIE .....	87



## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
BMEC	<i>Bovine Mammary Epithelial Cells</i>
CCS	Compte de Cellules Somatiques
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i>
Clf	<i>Clumping factor</i>
CNA	<i>Collagen adhesin</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2
CNS	<i>Coagulase Negative Staphylococci</i>
CP	<i>Capsular polysaccharide</i>
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CTL	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>
DO	Densité optique
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbant assay</i>
FgBP	<i>Fibrinogen-binding protein</i>
FnBP	<i>Fibronectin-binding protein</i>
FnBP-A	<i>Fibronectin-binding protein A</i>
FnBP-B	<i>Fibronectin-binding protein B</i>

Hla	<i>Hemolysin-<math>\alpha</math></i>
i.d.	<i>Intra-dermal</i> ou intradermique
IgG	Immunoglobuline G
IgA	Immunoglobuline A
IL	Interleukine
i.ma	<i>Intra-mammary</i> ou intramammaire (voie de vaccination)
IMC	Immunité à médiation cellulaire
IMI	<i>Intramammary Infection</i>
i.mu.	<i>Intra-muscular</i> ou intramusculaire
IIM	Infection Intramammaire
INF- $\gamma$	Interferon gamma
MB	Mammite Bovine
pb	paire de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMN	<i>Polymorphonuclear neutrophil</i>
PNAG	Poly-N-acetylglucosamine
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAAC	<i>Slime associated antigenic complex</i>
SCC	<i>Somatic cell counts</i>
SCV	<i>Small-colony variant</i>

SeC	<i>Staphylococcal enterotoxin C</i>
SI	Système immunitaire
Th-1	Lymphocyte (ou voie) <i>t-helper</i> de type 1
Th-2	Lymphocyte (ou voie) <i>t-helper</i> de type 2
Th-17	Lymphocyte (ou voie) <i>t-helper</i> de type 17
TSST-1	<i>Toxic shock syndrome toxin 1</i>
UFC	Unité Formatrice de Colonie

## LISTE DES TABLEAUX

### II. Article scientifique

1. <i>Strains and plasmids used in this study</i> .....	49
---	----

### III. Discussion générale

1. Antigènes utilisés dans le vaccin sous-unitaire. ....	83
--	----

## LISTE DES FIGURES

### I. Introduction

1. Prévalence des pathogènes responsables de la mammite au Canada .....	13
2. Pathogénèse de <i>S. aureus</i> dans la glande mammaire bovine.....	15
3. Les résultats possibles de l'internalisation de <i>S. aureus</i> dans les cellules de l'hôte.....	20
4. Voies de présentation antigénique et orientation de la réponse immune .....	35

### II. Article scientifique

1. <i>Deletion of hemB in ATCC 29213 and <math>\Delta</math>720 strains of Staphylococcus aureus</i> .....	55
2. <i>Influence of <i>S. aureus</i> <math>\Delta</math>hemB, <math>\Delta</math>720, and <math>\Delta</math>720<math>\Delta</math>hemB mutations on MAC-T cell infectivity</i> .....	57
3. <i>Persistence of <i>S. aureus</i> ATCC29213 (WT) and isogenic mutants within MAC-T cells over time</i> .....	59
4. <i>Viability of MAC-T cells infected by <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (WT) and isogenic mutants</i> .....	60
5. <i>Murine IMIs with the parental (WT) and <math>\Delta</math>hemB<math>\Delta</math>720 (<math>\Delta\Delta</math>) strains</i> .....	62
6. <i>Double mutant (<math>\Delta</math>720<math>\Delta</math>hemB) stimulates neutrophil influx in mammary glands to similar levels compared to WT in the first 24 hours following infection</i> .....	63
7. <i>Visual Inflammation of the large R4 and LA mammary glands 24 h after mouse IMI with <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (WT) and the double mutant <math>\Delta</math>720<math>\Delta</math>hemB (<math>\Delta\Delta</math>)</i> .....	65
8. <i>Neutrophil infiltration goes back to normal levels after clearance of the double mutant <math>\Delta</math>720<math>\Delta</math>hemB</i> .....	66

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

### 1.1 La mammite bovine

La mammite bovine est la maladie la plus fréquente et ayant les plus grandes conséquences économiques pour l'industrie laitière (Bar et al., 2008; Ruegg, 2003). C'est également la raison principale de l'utilisation d'antibiotiques dans les élevages de bovins laitiers (Pol et Ruegg, 2007). Le plus souvent, celle-ci est due à une infection bactérienne. Des mammites causées par des levures (*Candida*), des algues microscopiques, ou suite à un traumatisme du pis ou à des désordres physiologiques existent, mais celles-ci sont beaucoup plus rares. L'infections bactérienne de la glande mammaire peut se manifester en formes cliniques se classant selon la sévérité des symptômes; de la présence de grumeaux dans le lait, à l'enflure et la rougeur de la glande, jusqu'au choc toxique (fièvre, perte d'appétit, faiblesse de la vache et parfois, mort). Elle peut également se manifester dans une absence totale de signes de maladie apparents à l'échelle macroscopique; l'infection sous-clinique.

Le caractère clinique ou non d'une mammite est majoritairement influencé par le genre et l'espèce du pathogène responsable (Rainard et Riollet, 2006). Les bactéries coliformes sont souvent associées à des mammites aigües accompagnées de symptômes cliniques. Ces mammites à coliformes sont la plupart du temps contractées dans l'environnement immédiat de la vache, et causées par des espèces tels qu'*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, et *Citrobacter* spp. (Hogan et Smith, 2003). On parle de mammite environnementale pour décrire ce type d'infection intramammaire (IIM) non contagieuse.

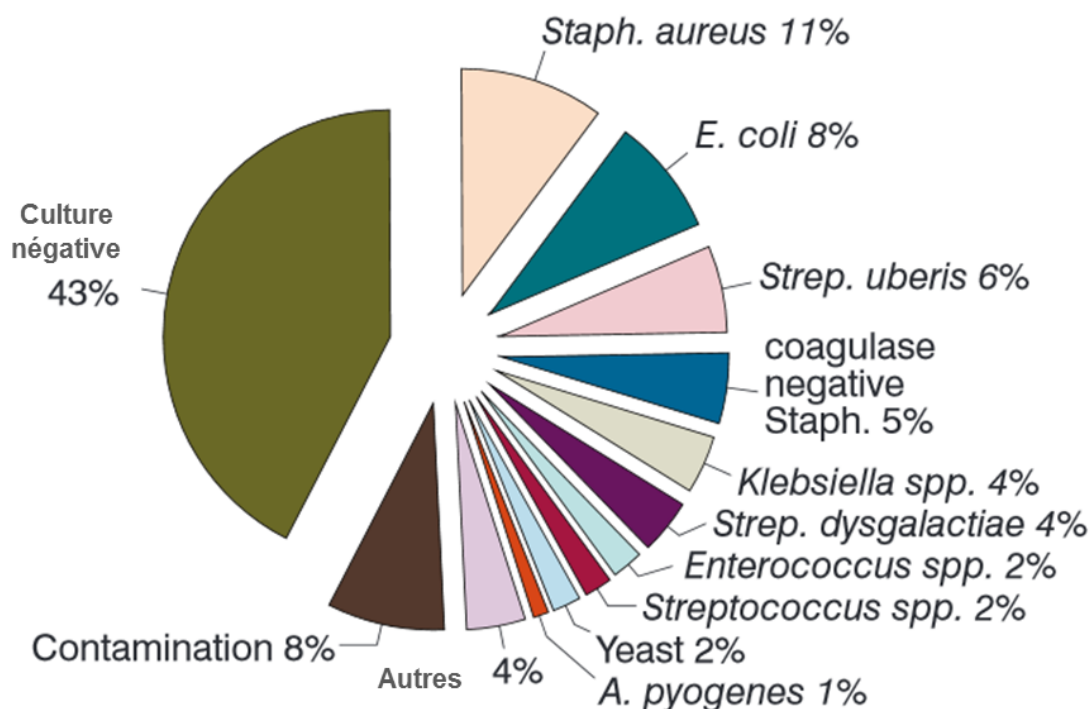
Pourtant, la grande majorité des cas d'IIM dans les troupeaux se présente plutôt sous la forme sous-clinique : cette dernière, autrement impossible à diagnostiquer, est associée à une réduction importante de la production ainsi que de la qualité du lait, par la présence de

microorganismes et par l'augmentation des comptes de cellules somatiques (CCS) qui le rendent impropre à la consommation (*A Practical Look at Contagious Mastitis. Canadian Bovine Mastitis Research Network*: <http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/en/page.php?p=10&tm=i>).

Il a été estimé que la forme sous-clinique représenterait 80 % des pertes monétaires totales engendrées par la maladie pour les producteurs; celle-ci constituerait donc la cause principale du problème économique qu'engendre cette maladie pour l'industrie laitière (Shim et al., 2004; Petrovski et al., 2006). Ces pertes seraient liées notamment à la perte du lait contaminé, la baisse de production des vaches infectées, aux coûts des traitements antibiotiques, aux frais vétérinaires et à la période de retrait des vaches traitées aux antibiotiques (Olde Riekerink et al., 2008; Seegers et al., 2003).

## **1.2 Les infections intramammaires (IIMs) à *Staphylococcus aureus***

Le pathogène contagieux *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus souvent isolée (Figure 1) dans le contexte des infections intramammaires au Canada (Olde Riekerink et al., 2008). Bien que pouvant induire des mammites cliniques, il est majoritairement responsable de mammites sous-cliniques (Sutra et Poutrel, 1994; Leitner et al., 2011). Une étude épidémiologique réalisée dans les fermes laitières au Canada entre 2007-2008 par le réseau Canadien de recherche sur la mammite bovine (RCRMB) a pu révéler que la prévalence de *S. aureus* dans les cas de mammite sous-clinique est de 2,4% en période de lactation et 3% en période de tarissement (Reyher et al., 2011). Dans les mammites contagieuses à *S. aureus*, le lait provenant de vaches infectées est la principale source d'infection. La transmission des organismes à des vaches et des quartiers sains survient surtout pendant la traite, mais peut également avoir lieu à d'autres moments. Cette transmission est ainsi extrêmement liée à la qualité de régie de traite, des procédures de désinfection des trayons et de la propreté de l'équipement de traite utilisé de vaches en vaches.



**Figure 1. Prévalence des pathogènes responsables de la mammité au Canada.** Pourcentage d'échantillons positifs dans 3033 échantillons de lait issus de 106 fermes laitières dans les 10 provinces canadiennes. Tiré de ©Western Dairy Digest *The Mastitis Situation in Canada* selon les travaux de Olde Riekerink *et al.* (2008).

### 1.2.1 Diagnostic

Malheureusement, le caractère sous-clinique de ces mammites complique le diagnostic de terrain; la plupart du temps, elles passent complètement inaperçues. Ainsi, chez les vaches laitières, les mammites à *S. aureus* s'expriment le plus souvent seulement par l'élévation des CCS dans le lait, principalement liée à un afflux des neutrophiles (ou PMNs) dans la glande (Van Oostveldt *et al.*, 2001). Cet important indicateur de la santé du pis est souvent le seul indice disponible pour déceler ces infections, et est seulement remarqué beaucoup plus tard



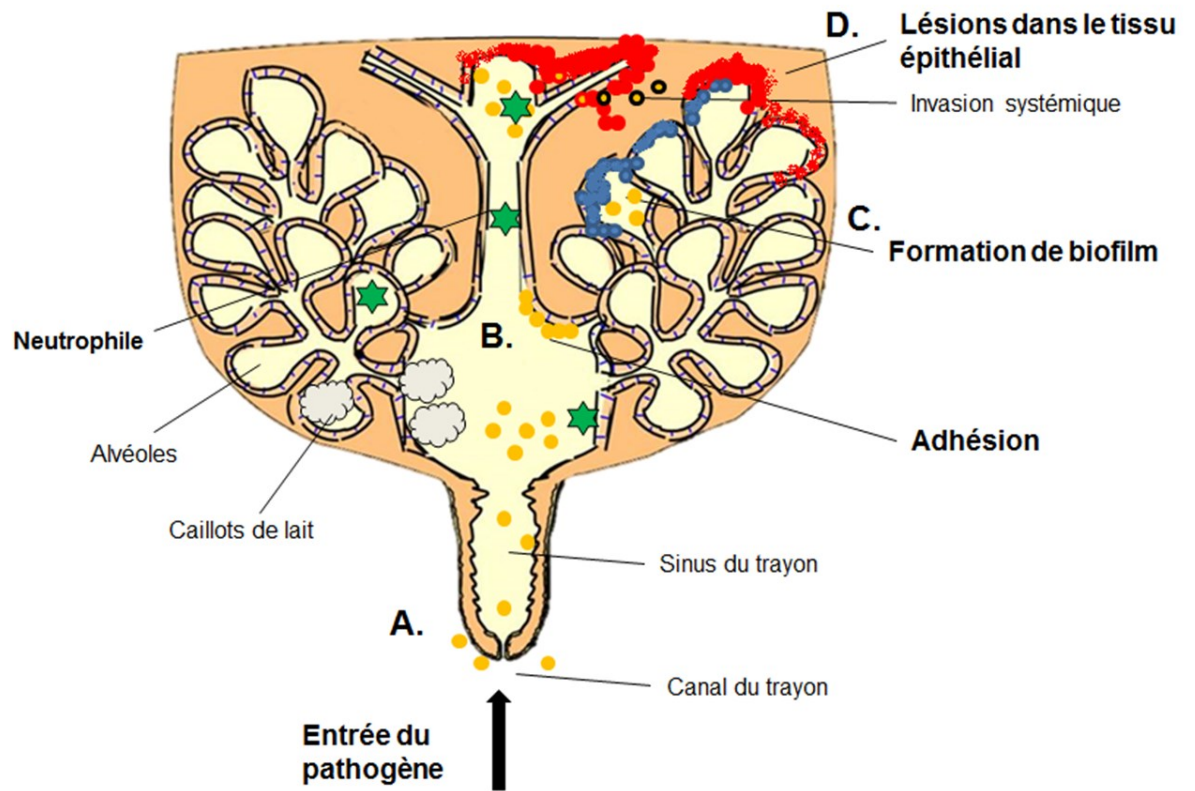
par les producteurs, lorsque plusieurs vaches sont infectées dans un troupeau. Pour l'instant, ce n'est que par l'analyse bactériologique du lait que l'on peut clairement identifier les vaches ou les quartiers sous-cliniquement infectés par *S. aureus*.

### **1.2.2 Efficacité des traitements**

Lors d'antibiothérapies, les taux de guérison associés aux mammites à *S. aureus* sont généralement faibles (Gruet et al., 2001; Brouillette et al., 2004). La persistance du pathogène dans la glande se traduit généralement en chronicité de la maladie avec des animaux voués à faire des mammites à répétition, une persistance qui peut durer toute la vie de l'animal (Sutra et Poutrel, 1994). Le traitement précoce de nouvelles infections peut s'avérer efficace; toutefois, les vaches chroniquement infectées réagissent mal au traitement durant la lactation. Les traitements conventionnels homologués par voie intramammaire permettent rarement d'obtenir un taux de guérison supérieur à 20-40 % (Dinsmore, 2002). De façon générale, traiter les vaches au tarissement peut donner certains résultats contre *S. aureus* (Descôteaux, 2004). Toutefois la plupart du temps, on assiste à une rechute et une poursuite des infections chroniques durant les lactations subséquentes, démontrant que le pathogène est toujours présent.

### **1.2.3 Pathogénèse de *Staphylococcus aureus* dans l'IIM**

En explorant la complexité de la pathogénèse de *S. aureus* lors de l'IIM chez la vache, on remarque que de multiples stratégies impliquées tout au long de sa virulence peuvent expliquer l'extrême difficulté que représente son élimination de la glande. Bien qu'elle ne soit pas encore complètement comprise, cette pathogénèse mise à profit tout au long du processus infectieux permet de mieux comprendre les choix de cibles antigéniques et de stratégies vaccinales pour obtenir une protection. Selon plusieurs auteurs, on peut compter trois phases lors d'infection à *S. aureus* : (i) l'adhésion aux cellules de l'hôte et à la matrice extracellulaire, (ii) l'invasion ou pénétration dans les tissus et (iii), l'évasion du système immunitaire de l'hôte (Middleton, 2008).



**Figure 2. Pathogénèse de *S. aureus* dans la glande mammaire bovine. (Inspiré du texte de Sutra et Poutrel, 1994.)**

Lors de l'IIM, le canal du trayon (Figure 2A) représente la première barrière physique, et la porte d'entrée franchie par *S. aureus* lors de la traite, permettant ainsi la dissémination des bactéries à l'ensemble du tissu mammaire (Sutra et Poutrel, 1994; Kerro Dego et al., 2002). Après cette intrusion, la première étape dans la colonisation de la glande mammaire consiste en l'adhésion des staphylocoques aux cellules de l'hôte et à la matrice extracellulaire (Figure 2B). Cet attachement permet aux bactéries de ne pas être évacuées par le flux du lait. Les *S. aureus* expriment de nombreux facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion, incluant notamment les protéines se liant à la fibronectine (FnBP), au fibrinogène (FgBP) et au collagène (CNA) ainsi que les clumping factor (Clf) A et B, l'acide teichoïque et certains composants de biofilms (Figure 2C) (Middleton et al., 2009; Mitchell et al., 2008). Après cette phase d'adhésion, *S. aureus* synthétise et sécrète de nombreux facteurs permettant l'invasion et la pénétration du tissu mammaire, notamment plusieurs toxines (dont les hémolysines et les leucocidines) et différentes enzymes (protéases, coagulase, lipase, hyaluronidase) (Middleton, 2008; Suriyaphol et al., 2009). Ces lésions dans le tissu (Figure 2D) de la glande mammaire sont les principaux facteurs expliquant la réduction de production de lait, même lorsque l'infection reste inapparente (sous-clinique). Finalement, *S. aureus* produit différents facteurs lui permettant l'évasion du système immunitaire de l'hôte, d'où l'immense difficulté de réussite des antibiothérapies et de la réponse immune. Parmi ceux-ci, on peut compter les toxines superantigéniques, la protéine A, les capsules polysaccharidiques, la production de biofilms et la stratégie de persistance dans les cellules de l'hôte (Middleton, 2008).

### **1.3 *S. aureus* small-colony variant**

Conjointement, d'autres aspects particuliers de la pathogénèse de *S. aureus* sont à considérer en ce qui a trait à sa chronicité. Lors des dernières décennies, une sous-population phénotypique de *S. aureus* spécialement associée à la persistance chez l'hôte a été isolée et caractérisée dans de nombreux cas de maladies chroniques ; les *small-colony variants* (SCVs). Comme l'indique l'appellation, le principal attribut de ces isolats consistait en une croissance plus lente menant à la formation de petites colonies d'environ le dixième de la taille normale. Ce phénotype a aussi pu être observé chez des espèces bactériennes aussi diverses que *S. epidermidis*, *S. capitis*, certains sérovars de *Salmonella*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *V. cholerae*, *N. gonorrhoeae*, *S. marcescens* ou *L. acidophilus*.

#### **1.3.1 Caractéristiques phénotypiques et bases génétiques**

Chez *S. aureus*, les traits phénotypiques communs associés aux SCVs sont la formation de petites colonies non pigmentées et non hémolytiques sur milieu de culture solide. Ces caractéristiques peuvent être expliquées par le profil métabolique particulier des SCVs. On considère que la majorité des SCVs cliniques de *S. aureus* découleraient de mutations précises amenant des déficiences dans la chaîne de transport des électrons, altérant le processus de phosphorylation oxydative.

Brièvement, chez une souche de *S. aureus* au phénotype normal, le NADH et le FADH<sub>2</sub> produits lors du cycle de Krebs sont utilisés pour générer des quantités élevées d'ATP via leur prise en charge par les complexes membranaires de la chaîne de transport au gradient de potentiel réducteur croissant. Le mouvement d'électron de part et d'autre de la membrane est accompagné de l'accumulation de protons (H<sup>+</sup>) à l'extérieur de la membrane bactérienne qui est utilisée ultimement par l'ATP synthase. Le phénotype de ce type de SCV serait ainsi expliqué par des altérations rendant ces complexes inactifs, affectant le métabolisme.

En effet, les SCVs les plus étudiés à ce jour sont incapables de synthétiser le ménadione ou l'hémine, deux molécules oxydables associées aux complexes de la chaîne de transport des

électrons. Des mutations spécifiques dans les voies de synthèse de celles-ci ont été observées chez ces dernières, notamment dans les gènes *menD* et *hemB*, respectivement. Un second type de SCV a également été caractérisé : le thymidine-dépendant. Celui-ci démontre un phénotype en tout point semblable à ceux qui sont déficients dans la chaîne de transport des électrons, mais par contre ne peut pas survivre du tout sans la présence de thymidine. Les bases d'interactions géniques responsables de leur ressemblance phénotypique avec les SCVs déficients de la chaîne de transport sont encore mal comprises (Proctor et al., 2006).

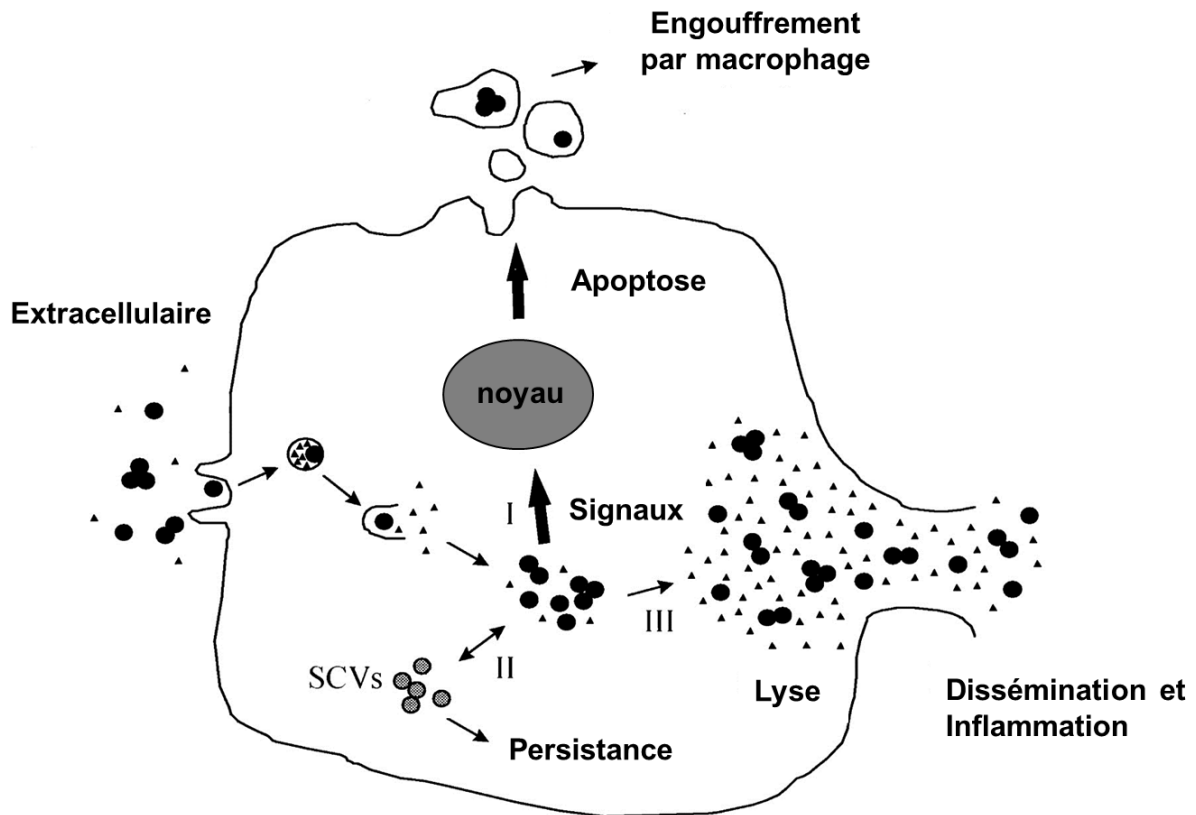
### **1.3.2 Construction de SCVs génétiquement stables**

Les SCVs cliniques sont relativement difficiles à étudier, notamment en raison du phénotype souvent instable, prompt à la réversion au phénotype normal dans les conditions de laboratoire. Afin de mieux les caractériser, des SCVs génétiquement définis notamment via l'interruption du gène *hemB*, ont été obtenus dans différentes études. Cette stratégie avait été utilisée notamment pour tester l'hypothèse que cette déficience promouvait la persistance intracellulaire (Von Eiff et al., 1997) puisque les SCVs avaient démontré être la cause de cas cliniques d'infections récurrentes qui réapparaissaient plusieurs années après le traitement de l'infection initiale.

Chez les SCVs au gène *hemB* inactivé, on observe en effet l'accumulation de NAD(P)H et FADH<sub>2</sub>, un potentiel membranaire réduit et des concentrations d'ATP basses (Senn et al., 2005). Plusieurs gènes impliqués dans la glycolyse et la fermentation sont régulés à la hausse, alors que les enzymes du cycle des acides tricarboniques sont régulés à la baisse, démontrant l'altération dans le métabolisme menant à une production d'énergie moindre (Kohler et al., 2003).

### 1.3.3 Facteurs d'émergence et résistance aux antibiotiques

Chez *S. aureus*, les SCVs sont fréquemment isolés lors d'infections chroniques chez l'humain et les animaux. Les SCVs ont par ailleurs déjà été retrouvés chez le bovin laitier (Atalla et al., 2008). Chez l'humain, les SCVs ont été isolés d'échantillons cliniques de certains cas d'infections particulièrement difficiles à traiter. Parmi ceux-ci, on peut citer des infections des voies respiratoires de patients atteints de fibrose-kystique, infections profondes post-chirurgie, ostéomyélites chroniques ou encore des infections de corps étrangers tels que les prothèses ou implants articulaires (Proctor et al., 2006; Kalinka et al., 2014). On considère ainsi que certains facteurs présents dans ces environnements favoriseraient l'émergence du phénotype, notamment l'utilisation de traitements antibiotiques. Par exemple, le SCV dépendant à la thymidine a été particulièrement souvent isolé de poumons de patients atteints de fibrose kystique traités à long terme au sulphamethoxazole (SMX) (Proctor et al., 2006). Plusieurs études ont déjà fait état de leur résistance alarmante à de nombreux antibiotiques (Gläser et al., 2014; Vaudaux et al., 2011), notamment aux aminoglycosides et certains peptides cationiques qui sont dépendants du potentiel membranaires ( $\Delta\Psi$ ) pour leur mode d'action (Proctor et al., 2006). Également, il a été depuis longtemps observé que le milieu intracellulaire (Figure 3.) contribuait à favoriser l'émergence des SCVs (Vesga et al., 1996).



**Figure 3. Les résultats possibles de l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules de l'hôte.** Dans un environnement extracellulaire, *S. aureus* en phase de colonisation exprime des facteurs d'adhérence favorisant son internalisation, tels que les FnBPs. Une fois internalisé, un mécanisme impliquant possiblement le système Agr permet à *S. aureus* d'échapper à l'endosome. Lorsque celui-ci réside dans le cytoplasme de l'hôte, trois résultats sont envisageables: (i) l'induction de l'apoptose, (ii) l'émergence de SCVs, ou (iii) la lyse de la cellule hôte. Traduit et adapté de Wesson et. al (1998).

### 1.3.4 Facteurs transcriptionnels de la persistance des SCVs

En plus de la résistance à certains antibiotiques liée au métabolisme altéré, on considère que plusieurs facteurs transcriptionnels donnent au phénotype SCV des caractéristiques particulières lui permettant la persistance chez l'hôte. On a souvent cité leur forte capacité de

production de biofilm (Mitchell et al., 2010) et leurs internalisation et survie accrues dans les cellules de l'hôte (Kalinka et al., 2014; Brouillette et al., 2004). L'expression des facteurs de virulence de *S. aureus* est sous le contrôle de régulateurs globaux tel que Agr et le facteur alternatif SigB. Dans le processus de virulence de *S. aureus*, le locus Agr (*Accessory Gene Regulator*) est un des régulateurs de virulence qui permet la transition de la phase de colonisation à la phase d'invasion (Bronner et al., 2004), notamment en contrôlant l'expression des toxines, enzymes et autres facteurs de virulence invasifs. En contrepartie, le facteur de transcription alternatif SigB est impliqué dans la réponse à différents stress (Horsburgh et al., 2002) et favorise plutôt l'expression d'adhésines pour la colonisation (Mitchell et al., 2008).

Chez les SCVs, l'expression des facteurs de virulence est influencée préférentiellement par SigB plutôt que par Agr, qui n'est plus activé à la fin de la phase exponentielle comme dans les souches à phénotype régulier. Il est généralement accepté que la survie prolongée des SCVs (Figure 3.) est attribuable au moins en partie à une expression diminuée d'hémolysine- $\alpha$ , tandis que leur plus grande capacité d'invasion est due à une plus grande expression des FnBPs (Tuscherr et al., 2010; Vaudaux et al., 2002). Fait intéressant, une équipe a récemment démontré que bien que l'expression modifiée des FnBPs et de l'hémolysine- $\alpha$  était en effet attribuable aux influences de SigB et Agr, Agr ne pouvait pas promouvoir l'expression de l'hémolysine- $\alpha$  en absence d'une chaîne de transport fonctionnelle (Pader et al., 2014). La persistance de staphylocoques intracellulaires pourrait ainsi contribuer à l'établissement d'infections chroniques en permettant à la bactérie d'échapper à l'action des antibiothérapies et du système immunitaire humoral (Brouillette et al., 2004; DeLeo et Otto, 2008).



## **1.4 La vaccination contre les IIMs à *S. aureus***

### **1.4.1 Vaccination vs. Antibiothérapie**

Tel que discuté précédemment, les options efficaces pour combattre les IIMs à *Staphylococcus aureus* sont rares pour les acteurs de l'industrie laitière, et pour le moment ne consistent qu'au traitement antibiotique des vaches que lorsque le pathogène est isolé des quartiers, ou que des signes cliniques apparaissent. Cette stratégie est d'une part inefficace, car les vaches présentant une infection déjà bien établie réagissent mal au traitement durant la période de lactation (Canadian Bovine Mastitis Network). En effet, l'antibiothérapie couramment utilisée contre *S. aureus* dépasse rarement 50% de succès (Ster et al., 2013; Dinsmore, 2002), et sa survie dans la glande face aux traitements se traduit généralement en cas de mammites chroniques qui deviennent de plus en plus difficiles à éradiquer à long terme.

D'autre part, cette stratégie ne couvre pas l'ampleur du problème occasionné par les infections sous-cliniques, qui sont invisibles au niveau de l'état général de l'animal. En effet, tel que discuté précédemment, *S. aureus* est majoritairement responsable de mammites sous-cliniques (Sutra et Poutrel, 1994) et donc passe régulièrement sous le radar des producteurs. Le traitement préventif et systématique des vaches est impossible dans le contexte de l'industrie laitière. Contrairement à l'élevage porcin, par exemple, l'utilisation d'antibiotiques pour traiter les bovins laitiers d'élevage est très réglementée et surveillée. Toute utilisation pendant la lactation est soumise à une période de retrait du lait, et ce même si l'injection ne se fait pas au niveau de la glande mammaire. De surcroît, ce retrait équivaut à de nouvelles pertes monétaires substantielles pour l'éleveur.

Cette présence constante et inaperçue au sein du troupeau, couplée aux difficultés d'élimination de la glande à long terme, contribuent à maintenir un réservoir d'infection dans les troupeaux et permet la transmission contagieuse du pathogène de vache en vache lors de la traite (Olde Riekerink et al., 2008). De même, l'utilisation systématique d'antibiotiques est de plus en plus contestée car elle stimule à la longue le développement de résistances, d'où l'importance de trouver de nouvelles stratégies pour combattre les mammites à *S. aureus*.

Ainsi, un vaccin dirigé contre *S. aureus* constituerait un outil de choix pour la prévention et le traitement des IIMs à *S. aureus* : la vaccination permettrait à la fois de réduire l'incidence des nouveaux cas d'IIM, et donc la présence du pathogène dans les troupeaux, et de réduire les manifestations sous-cliniques (baisse de la production et de la qualité du lait) ou cliniques chez des vaches infectées. De plus, le processus d'homologation pour un vaccin est considéré beaucoup plus court et moins coûteux que pour un antibiotique, ce qui laisse supposer qu'un vaccin serait mis sur le marché plus rapidement qu'un antibiotique.

Le développement d'un vaccin visant la prévention et le contrôle des IIMs à *S. aureus* est donc d'un intérêt considérable pour l'industrie laitière, et un sujet d'actualité à la source de plusieurs études publiées lors des dernières années. Malheureusement, la polyvalence du pathogène à exprimer différents facteurs de virulence dans la glande, ses nombreuses méthodes de camouflage du système immunitaire et la variabilité phénotypique des souches pouvant causer la maladie ont mené à peu de succès lors des dernières décennies. En effet, on considère qu'aucune formulation classique n'ait pu démontrer de grande efficacité de protection à ce jour (Middleton et al., 2009; Pereira et al., 2011). Pourtant, l'avancée des technologies immunologiques et du génie génétique et la meilleure compréhension du fonctionnement de l'immunité dans les infections à *S. aureus* semble ouvrir la porte à de nouveaux progrès.

#### **1.4.2 Buts spécifiques visés par la vaccination**

Les buts visés par la vaccination contre la mammite sont multiples et peuvent consister en (i) la diminution de la sévérité des symptômes cliniques, (ii) la réduction des CCS dans le lait ou (iii) en la réduction de l'incidence de nouveaux cas de mammites dans un troupeau. Le type de mammite et le pathogène responsable de celle-ci peut faire varier l'objectif de vaccination. La vaccination contre le pathogène environnemental et non transmissible *E. coli*, par exemple, peut viser la réduction des symptômes cliniques, qui comme nous le savons sont en général plus sérieux et aigus avec les coliformes (Cebra et al., 1996). À titre d'exemple, le vaccin

injectable et commercialisé J5 est efficace pour la réduction des symptômes cliniques des mammites à *E. coli* (Hogan et al., 1995), mais d'une faible efficacité au niveau préventif et protecteur à grande échelle (Wilson et al., 2007).

En contraste, la gravité des infections à *S. aureus* réside principalement dans le fait qu'elles sont à l'origine d'importantes pertes économiques dues à la diminution progressive de la production et de la qualité du lait, plutôt que de l'effet direct de symptômes cliniques ou de mortalité des animaux. Ainsi, sur la plupart des fermes, le but visé par la vaccination contre les mammites à *S. aureus* réside dans la prévention des nouvelles IIMs, puisque la forme clinique de la maladie est très rare, alors que la dissémination contagieuse est commune (Middleton, 2008).

#### **1.4.3 Revue des formulations et cibles antigéniques mises à l'essai**

Parmi les vaccins contre les IIMs à *S. aureus* traditionnellement mis à l'essai, on compte plusieurs types de formulations : des suspensions de bactéries tuées ou complètement lysées, des extraits de parois cellulaires issus de souches de laboratoire ou de terrain sélectionnées. Ces techniques de vaccination existent depuis des décennies, et sont relativement simples et peu coûteuses à produire. L'essor des nouvelles techniques immunologiques et biomoléculaires des dernières années a permis d'utiliser de nouvelles stratégies pour éliciter des réponses beaucoup plus précises et ciblées contre certains composants de *S. aureus*. Comme le démontre la littérature à ce sujet, de nombreuses nouvelles cibles et stratégies de vaccination ont été développées pour l'obtention d'un vaccin protecteur contre les IIMs à *S. aureus*. Parmi ces nouvelles technologies, les vaccins à ADN et sous-unitaires ont pu obtenir de bons résultats. Malheureusement, malgré un certain succès à éliciter des réponses fortes et ciblées, la plupart finissent par être délaissées en raison de leur efficacité de protection limitée lors d'essais à grande échelle chez la vache (Leitner et al., 2011). Cet important aspect de protection difficile à obtenir explique la rareté des nouvelles technologies réussissant à compléter la traversée du processus d'homologation. Les cibles antigéniques, les différents

procédés de vaccination et quelques études représentatives du niveau de protection de ces stratégies seront discutés ici en détail.

#### ***1.4.3.1 Vaccins inactivés et lysats cellulaires***

Le plus simple des vaccins consiste en l'utilisation de microorganismes entiers (atténués ou inactivés) ou de lysats produits à partir de ceux-ci. Les vaccins tués ne sont généralement pas capables d'induire de réponse immune à médiation cellulaire (en particulier la réponse CTL) et de plus nécessitent l'ajout d'un adjuvant afin d'augmenter leur pouvoir protecteur. Ils sont cependant très efficaces pour induire une forte production d'anticorps capables de reconnaître les épitopes de surface du pathogène.

##### **a) Vaccins inactivés disponibles sur le marché**

En premier lieu, il est important de mentionner qu'il existe actuellement deux vaccins inactivés basés sur l'utilisation de bactérines (bactéries complètes tuées) homologués pour la mammite bovine à *S. aureus* qui sont commercialement disponibles, soit : Lysigin™ (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc) aux États-Unis et Startvac® (Hipra, Inc., Espagne) en Europe. Ce mode de vaccination très simple consiste en l'utilisation de microorganismes entiers (inactivés/tués; en général par la chaleur) ou de lysats produits à partir de ces derniers associés ou non à des adjuvants. En médecine vétérinaire, l'utilisation de ce type de vaccins a été abondamment étudiée et le premier vaccin commercialisé contre les mammites à *S. aureus* a été utilisé à partir des années 1970 (Lysigin®, Boehringer Ingelheim). Il est composé de lysats issus de 5 souches de *S. aureus* exprimant les 3 types de capsules polysaccharidiques prédominants lors de mammites bovines (5, 8 et 336). De nombreuses études ont évalué ce vaccin lors de cas cliniques aigus, démontrant la réduction des symptômes cliniques ainsi qu'une augmentation des cas de guérison spontanée (Middleton, 2008). Cependant, aucune différence n'a été observée tant au niveau des CCS individuels dans le lait que dans l'élimination bactérienne de la glande. Au niveau de la réponse élicitée, une quantité plus élevée d'IgGs totaux contre *S. aureus* a également été démontrée dans le groupe vacciné, (Luby et al., 2007), mais le nombre d'anticorps opsonisants présents dans le lait pourrait ne pas être suffisants pour permettre la protection (Middleton et al., 2009). Plus récemment,

l'utilisation de souches productrices de biofilms dans la préparation de vaccins inactivés a permis de réduire de manière intéressante la charge bactérienne des glandes mammaires de génisses infectées expérimentalement (Pérez et al., 2009). Cette réduction serait liée notamment à l'induction d'anticorps spécifiquement dirigés contre certains composés polysaccharidiques présents dans les biofilms, dont la Poly-N-acetylglucosamine (PNAG) et le slime associated antigenic complex (SAAC). L'ensemble de ces travaux ont abouti à la commercialisation d'un 2e vaccin contre les mammites en Europe (StartVac®, Hipra), le seul agréé par l'agence européenne des médicaments. Celui-ci est composé d'une souche de *S. aureus* pouvant exprimer le SAAC et de la souche d' *E. coli* J5, tous deux inactivés et associés à un adjuvant dans une émulsion d'huile. Bien que l'efficacité du vaccin à grande échelle ne soit pas encore établie, une récente étude a pu démontrer un certain effet positif de la vaccination contre les nouvelles mammites à SA et aux staphylocoques à coagulase négative (CNS) sur deux fermes (Schukken et al., 2014). La vaccination a pu permettre une réduction modérée de l'incidence de nouvelles IIMs aux staphylocoques et une réduction plus marquée de la durée totale des IIMs.

#### b) Autres vaccins inactivés mis à l'essai

MASTIVAC ITM est un autre vaccin qui a été récemment mis au point contre les mammites à *S. aureus* et est composé de trois souches de terrain de *S. aureus*. Ce vaccin a pu protéger des souris lors d'un *challenge* avec la souche vaccinale homologue et d'autres souches de *S. aureus* hétérologues, permis une certaine protection de vaches lors d'un *challenge* et a pu démontrer une certaine efficacité dans la réduction des CCS et l'augmentation de la production du lait lors d'une étude à grande échelle (publications décrites par Leitner *et al.*, 2011). Ce vaccin, cependant, est constitué de bactéries entières tuées, et les antigènes protecteurs ne sont pas encore définis.

Les vaccins inactivés ne semblent donc pas encore avoir fait leurs preuves, pour deux raisons principales: 1) leur manque de spécificité antigénique a l'effet de «diluer» la réponse immune; 2) le problème de la différence phénotypique des souches pouvant causer la mammite rend

leur utilisation questionnable. Une autre stratégie visant la conception d'un vaccin contenant des antigènes clés, définis, et à large spectre d'activité serait clairement plus souhaitable. À cet égard, plusieurs tentatives pour développer plutôt des réponses contre des composantes précises de *S. aureus* ont été effectuées via l'utilisation des vaccins sous-unitaires et à ADN.

#### ***1.4.3.2 Vaccins sous-unitaires et à ADN***

L'utilisation de vaccins contenant des organismes pathogènes entiers inactivés ou atténués décrits précédemment réduit le besoin d'identifier les antigènes protecteurs. Cependant, ce type d'immunisation présente l'inconvénient potentiel de diluer ou de dévier la réponse immune protectrice contre des antigènes non-protecteurs. Par conséquent, et dans le cas où l'antigène protecteur est connu, il est souvent plus simple et plus efficace de focaliser la réponse immune contre cet antigène défini (Titball, 2008). Un vaccin sous-unitaire est obtenu soit par purification directe de sous-unités bactériennes à partir de cultures de bactéries cibles, soit par la production d'antigènes recombinants. Ces derniers peuvent être produits par clonage du gène bactérien et exprimés dans un système bactérien ou eucaryote, puis purifiés, ou encore exprimés *in situ* par un vecteur vivant ou via l'intégration d'ADN nu (vaccin ADN) par les cellules de l'organisme hôte vacciné. Comme les vaccins inactivés, les vaccins sous-unitaires nécessitent généralement l'utilisation d'adjuvants ainsi que de multiples injections de rappels afin d'amplifier la réponse, autrement insuffisante.

##### a) Cibles protéiques

#### **Adhésines**

Les principales cibles protéiques qui ont été exploitées pour l'élaboration de vaccins sous-unitaires et à ADN contre la mammite à *S. aureus* sont les adhésines et les toxines. Les adhésines, de par leur implication importante dans la phase de colonisation de *S. aureus* lors de l'IIM, ont souvent été utilisées comme cible antigénique (Middleton, 2008). En plus de la protéine A, qui lie fortement la partie constante des IgGs, les adhésines incluent également le Clf-A et B, les FnBPs A et B, les FgBPs et le CNA. Plusieurs études chez la souris ont

démontré de bonnes réponses humorales spécifiques contre chacune des adhésines (bien décrites dans la revue de Middleton, 2008). Cependant, contrairement à la réponse induite par les FnBP-A et FgBPs *in vivo*, l'immunisation contre le Clf-A et le CNA n'a pas permis de réduire d'une part la charge bactérienne des glandes mammaires et de protéger d'autre part partiellement les souris contre l'infection expérimentale à *S. aureus* (Brouillette et al., 2002; Therrien et al., 2007). De par la variabilité d'expression importante de ces adhésines chez les différentes souches (Zecconi et al., 2006), un équipe a même entrepris d'étudier chez la souris la réponse induite lors de l'expression simultanée de quatre adhésines (FgBP, FnBP-A, Clf-A, CNA) : malheureusement, la réponse principalement humorale n'a pu être en mesure de protéger efficacement la glande lors d'un *challenge* (Castagliuolo et al., 2006).

### **Toxines**

L'obtention d'anticorps neutralisants contre les diverses toxines produites par *S. aureus* est une autre approche vaccinale intéressante. Chez l'homme, les toxines ont été la cible de nombreux travaux suivis de résultats d'immunisation prometteurs contre les pneumonies à *S. aureus*, entre autres (Spaulding et al., 2014). Même si la nature d'anticorps efficacement protecteurs contre les nouvelles infections à *S. aureus* est toujours inconnue, on sait que ceux qui sont dirigés contre les toxines sont susceptibles de diminuer la sévérité de maladies aiguës. Selon plusieurs études, cette approche pourrait être plus réaliste contre un pathogène si bien adapté à la colonisation de son hôte (Fowler and Proctor, 2014). De manière générale, les vaccins à base de toxoïdes (toxines modifiées pour être inactives) qui ont été mis à l'essai dans le cadre de mammites à *S. aureus* ont visé principalement trois toxines : l'hémolysine- $\alpha$  (Hla) (Han and Park, 2000), l'entérotoxine-C (SeC) (Cui et al., 2010; Chang et al., 2008) et la TSST-1 (Cui et al., 2005; Hu et al., 2003). Malheureusement, malgré le développement de réponses humorales fortes et soutenues, aucune de ces études n'a encore pu obtenir de résultats de protection réellement significatifs chez la vache, comme il a été déjà commenté par Middleton (2008). L'étude de Cui *et al.* de 2010 a pu montrer une diminution significative des CCS des vaches vaccinées par rapport aux groupes n'ayant reçu que l'adjuvant, mais le peu d'animaux utilisés et le manque d'information sur la charge bactérienne subsistante au *challenge* ne permettent pas de tirer de conclusions claires sur son potentiel protecteur.

## b) Cibles polysaccharidiques

Les polysaccharides produits par *S. aureus*, principalement les composantes de la capsule, représentent un facteur de virulence important, en facilitant l'adhésion de *S. aureus* aux tissus mammaires et en se soustrayant à l'action du système immunitaire (Sutra and Poutrel, 1994). Pas moins de 12 sérotypes polysaccharidiques ont été décrits dans la littérature : 11 polysaccharidiques capsulaires, et un polysaccharide de surface, 336 (autrefois considéré comme capsulaire). De manière générale, les polysaccharides sont connus pour être faiblement immunogènes et indépendants des lymphocytes T. Afin d'augmenter leur immunogénicité, il est habituel d'utiliser des adjuvants et de les conjuguer à une protéine transporteuse afin d'induire une réponse croisée. Par exemple, on a pu démontrer que la conjugaison d'un polysaccharide capsulaire CP5 avec l'albumine sérique humaine permettait l'induction d'une réponse humorale spécifique et durable. Cependant, les animaux vaccinés avec une souche complète inactivée exprimant le CP5 ont présenté un titre en anticorps spécifiques supérieur à ceux observés dans le groupe du vaccin conjugué (Tollersrud et al., 2001). Dans le même ordre d'idée, il a été récemment démontré que l'utilisation d'un vaccin complet constitué de souches productrices de biofilms (principalement constitué de PNAG) conférait une réponse humorale contre le PNAG supérieure à l'injection du polysaccharide purifié, ainsi qu'une protection supérieure contre l'infection expérimentale de brebis par une souche productrice de biofilms (Pérez et al., 2009). Cela semble démontrer que les bactéries vivantes possèdent un potentiel immunogène difficile à imiter avec des composantes isolées, même avec un adjuvant. Finalement, on peut noter que le vaccin StaphVAX® (Nabi Biopharmaceuticals) constitue une des stratégies vaccinales en voie d'être commercialisée contre les infections humaines à SA. Sa formulation consiste en l'association de deux polysaccharides capsulaires (CP5 et CP8) conjugués à une exotoxine A mutée. Elle a été démontrée comme étant sûre et immunogène, bien que l'immunisation de patients hémodialysés n'ait pas permis de mettre en évidence une réduction significative des bactériémies à *S. aureus* par rapport aux patients contrôles (Fattom et al., 2004). On a suggéré que la survie intracellulaire de *S. aureus* pourrait être impliquée dans l'absence de protection observée lors d'immunisation contre ces polysaccharides capsulaires (DeLeo and Otto, 2008).



### **1.4.3.3 Bactéries atténuées**

Au cours des dernières décennies, quelques équipes ont mis au point des vaccins à base de bactéries vivantes atténuées contre *S. aureus* dans le contexte de la mammite bovine. Dès les années 80, Watson a décrit une souche atténuée de *S. aureus* utilisée pour vacciner des génisses (Watson, 1984). Ce type de vaccination présente l'avantage de mimer une infection naturelle et d'inclure l'ensemble des éléments clés nécessaires à l'induction d'une réponse immune adaptative, en agissant de façon intrinsèque comme adjuvant. Différentes techniques, physico-chimiques ou génétiques, permettent d'atténuer la virulence de souches virulentes tout en conservant le pouvoir immunogène. La prochaine section de ce document nous permettra de faire un survol des différents éléments à prendre en considération pour le développement d'un tel vaccin, des plus récents essais effectués dans le contexte de la mammite bovine et des perspectives d'utilisation de *S. aureus* pour la vaccination contre les IIMs à la lumière des nouvelles technologies du génie génétique.

## **1.5 Les vaccins vivants atténués**

Les vaccins vivants ont joué un rôle critique dans les débuts de la vaccinologie. En effet, la première expérience connue de vaccination fut l'inoculation en 1796 d'un jeune garçon par Edward Jenner avec des pustules de vache infectée par le virus de la vaccine (variole de la vache, *smallpox*), réputé pour causer des symptômes bénins chez l'homme, afin de le protéger contre celui de la variole, mortelle (De Gregorio et Rappuoli, 2014). Les nouvelles techniques immunologiques et biomoléculaires des dernières décennies ont permis un intérêt renouvelé et un immense essor de la recherche sur les vaccins vivants. On se penchera ici sur différents aspects liés au développement de vaccins vivants efficaces et sur leurs nombreuses applications, en mettant l'accent sur les vaccins à base de pathogènes atténués et de possibles applications dans la recherche de protection contre *S. aureus*.

### 1.5.1 Caractéristiques et avantages des vaccins vivants

Les vaccins vivants atténués sont encore de nos jours parmi les technologies de vaccination les plus utilisées. Les vaccins atténués sont constitués de souches bactériennes ou virales, qui sont affaiblies par des mutations stables leur permettant de coloniser l'hôte cible de façon transitoire. Cette colonisation et multiplication transitoire déclenche une réponse immunitaire, sans provoquer les symptômes de l'infection associés à l'agent pathogène de type sauvage. Il existe un certain nombre d'avantages des vaccins vivants par rapport aux formulations tuées ou aux vaccins sous-unitaires: (i) ils imitent une infection naturelle, par conséquent peuvent provoquer des réponses immunitaires qui sont spécifiques, localisées, efficaces et de longue durée (Kollaritsch et al., 2000; Detmer et Glenting, 2006), (ii) ils peuvent prévenir l'infection par le pathogène, et non seulement les symptômes de la maladie (Frey, 2007), et (iii) en comparaison aux vaccins sous-unitaires hautement purifiés, ils sont relativement peu coûteux à produire et à administrer. De plus, on peut les utiliser comme vecteurs vivants antigéniques *in situ*, pour exprimer des protéines hétérologues ou modifiées via des systèmes d'expression plasmidiques ou chromosomiques. Ce type de vaccination présente en outre l'avantage non négligeable d'agir de façon intrinsèque comme un adjuvant naturel, de par leur stimulation des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) (Becker et al., 2008; Griffiths and Khader, 2014).

Bien qu'efficace, la technologie peut aussi poser des problèmes de sécurité liés au risque bien présent de réversion à un organisme virulent et la potentialité de provoquer la maladie chez des individus immunodéprimés (Zeman et al., 1993). Heureusement, au cours des 20 dernières années, les vaccins vivants ont regagné de l'intérêt en raison de notre compréhension immunologique accrue, de la disponibilité des séquences génomiques et des techniques moléculaires avancées, amenant ainsi la possibilité de vaccins vivants plus sûrs. Cela ouvre également la voie pour le développement de nouvelles applications aux vecteurs vivants bactériens qui sont liées à leur capacité de véhiculer des molécules aussi diverses que des protéines conjuguées à des haptènes polysaccharides, des ADNs eucaryotes, et des antigènes anti-tumoraux (Galen and Curtiss, 2014).

### **1.5.2 Les vaccins vivants pour la stimulation de l'immunité mucoale**

Un autre avantage non-négligeable des vaccins vivants par rapport aux autres formulations réside dans leur voie d'administration et du type de réponse immune particulier que celle-ci permet d'éliciter. En effet, plusieurs vaccins vivants peuvent être administrés par voie orale, ou même nasale, offrant tout d'abord un meilleur profil de sécurité et une meilleure acceptation sociale que l'injection avec une seringue et une aiguille, et permettant de surcroit de stimuler la réponse immunitaire mucoale en plus de la réponse systémique.

L'immunité mucoale constitue une composante primordiale de la première ligne de défense d'un organisme, puisque la majorité des pathogènes entrent, causent des symptômes et sont reconnus via les tissus des muqueuses (Dwivedy and Aich, 2011; Dietrich et al., 2003). Cela est le cas comme nous l'avons vu pour *S. aureus* dans la glande mammaire. La reconnaissance des pathogènes est généralement initiée dans des sites inductifs tels que les plaques de Peyer (PP) dans le tissu lymphoïde gastro-intestinal (GALT) et dans des sites équivalents dans le tissu des muqueuses nasales (NALT) et les autres muqueuses des glandes périphériques.

Il est établi que les composantes mucoales jouent aussi un rôle central dans la régulation du SI distal des sites inductifs (McDermott and Huffnagle, 2014) et dans l'établissement d'une protection efficace et durable contre les pathogènes (Holmgren and Czerkinsky, 2005), en raison de son action à la fois localisée, spécialisée et polyvalente. Les vaccins d'administration mucoale peuvent activer d'un même front chaque bras effecteur du SI. Ils peuvent induire la production d'IgAs sécrétoires qui empêchent l'attachement et l'invasion et neutralisent les entérotoxines au site de colonisation, et des IgGs sériques qui contrôlent les pathogènes invasifs et leur dissémination systémique. Ils peuvent également promouvoir l'IMC contre les bactéries intracellulaires et les virus ainsi que des réponses de cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (Pasetti et al., 2011). Dans le contexte de la mammite, l'immunité mucoale prend une importance particulière car la glande mammaire fait partie des glandes exocrines prises en charge par celle-ci. L'infiltration de cellules immunitaires de la périphérie dans le lait pour combattre les infections est permise par la présence de chimiokines sécrétées par un niveau basal de cellules de «surveillance» dans le lait (Bharathan et Mullarky, 2011). L'IgG1 est

l'isotype d'immunoglobuline principalement produit aux muqueuses chez les ruminants (contrairement à l'IgA chez l'homme ou le porc), et est transmis dans le lait pour protéger les petits de façon passive jusqu'au sevrage (Salmon, 1999).

### **1.5.3 Stratégies d'atténuation et équilibre immunogénicité/réactivité**

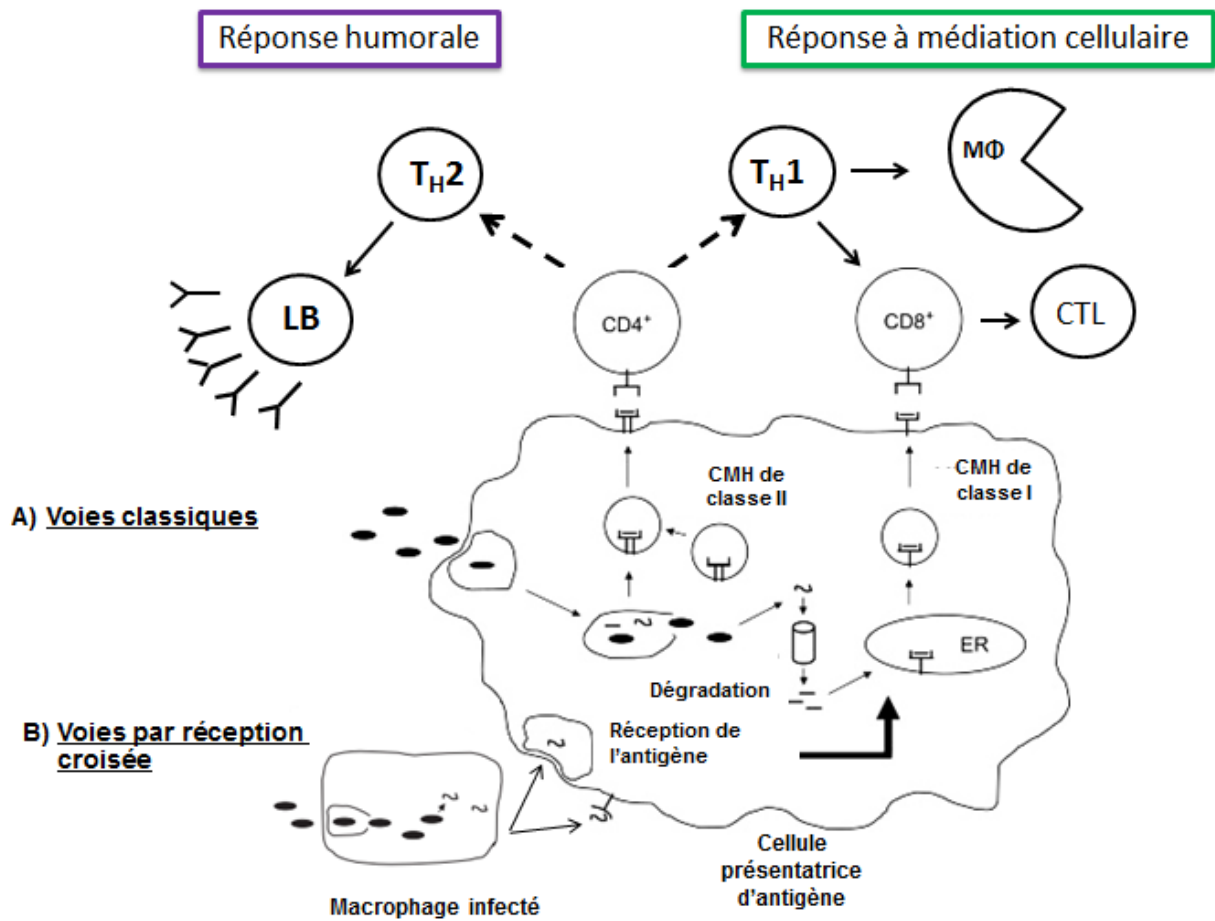
Un point crucial et particulièrement ardu dans le développement d'un vaccin vivant atténué efficace et sécuritaire réside dans l'application des technologies de génie génétique en prenant un soin particulier à trouver le bon équilibre entre l'atténuation et la réponse immunitaire. L'atténuation doit évidemment être suffisante pour que le vaccin soit sécuritaire, mais une légère sur-atténuation, parfois seulement par l'ajout de l'expression hétérologue d'antigènes, peut facilement rendre le vaccin inepte (Wang et al., 2013). Sans un examen soucieux des conséquences de l'atténuation sur le fitness métabolique de la souche et sa résistance au stress de l'hôte, on peut se retrouver avec des candidats présentant d'excellentes caractéristiques de sécurité, mais qui ont perdu soit la capacité de coloniser efficacement les sites d'induction immunologiques, soit celle d'exprimer l'antigène hétérologue, et par conséquent ne parviennent pas à induire une immunité protectrice (Gunn et al., 2010; Galen and Curtiss, 2014).

Traditionnellement, les vaccins vivants atténués ont été développés par le passage des agents pathogènes dans des conditions *in vitro* jusqu'à ce qu'ils perdent leur virulence chez l'homme. Cette approche empirique a été employée dans le cas de la souche vaccinale de *M. bovis* BCG. On considère maintenant que des stratégies d'atténuation dirigées, employant plusieurs inactivations affectant à la fois les facteurs de virulence et le métabolisme sont à préconiser (Galen *et al.*, 2014). Les délétions complètes de gènes, comparativement aux mutagénèses de sites uniques, sont considérées plus sûres en raison de l'impossibilité de réversion, bien que l'acquisition de gènes de virulence fonctionnels complets soit théoriquement possible via les bactéries de l'environnement (Frey, 2007).

#### 1.5.4 Vaccins vivants comme vecteurs antigéniques

De nombreux pathogènes intracellulaires, tels que *Listeria monocytogenes*, ont pu non seulement être utilisés pour leur qualité de vaccin vivant atténués, mais également pour leur capacité d'échapper au phagolysosome lors de la phagocytose et ainsi de se retrouver dans le cytoplasme des cellules de l'hôte infecté (Bruhn et al., 2007). En effet, cette qualité permet la prise en charge des antigènes produits par la bactérie à la fois par le CMH de classe I et le CMH de classe II, puisque les antigènes sont produits directement dans le cytoplasme.

Comme le montre la Figure 4, les voies «classiques» (A) de présentation sont sollicitées lorsque les cellules présentatrices d'antigène (CPA) sont directement infectées par le pathogène intracellulaire (Figure 4A). Les antigènes des bactéries dégradées dans le phagolysosome sont acheminés via la voie du CMH-II, alors que ceux des bactéries échappées dans le cytoplasme sont pris en charge par le CMH-I. Un autre type d'admission des antigènes, la réception croisée (Figure 4B), permet également de solliciter les deux voies, mais via une autre cellule infectée par le pathogène intracellulaire (dans la figure, un macrophage). Les antigènes se retrouvent ainsi excrétés dans des vacuoles ou sous forme libre pour être reçus par la CPA et pris en charge par les deux types de CMH (Bruhn et al., 2007). Ainsi, les vecteurs antigéniques intracellulaires permettent de stimuler à la fois des fonctions effectrices de l'immunité humorale (la production d'anticorps par les lymphocytes B) et de la médiation cellulaire, comme l'activation des lymphocytes T pour orchestrer la réponse immune (lymphocytes Th1 et Th2) ou pour tuer les cellules infectées (CTL).



**Figure 4. Voies de présentation antigénique et orientation de la réponse immunitaire.** Le CMH I est utilisé pour la présentation aux cellules T CD8<sup>+</sup> et le CMH II pour la présentation aux cellules CD4<sup>+</sup>. On peut observer sur la figure que la voie Th1 favorisera la réponse cytotoxique (activation des CTL et de la phagocytose) alors que la voie Th2 stimulera fortement la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B. (LB: lymphocyte B; CTL: lymphocyte T cytotoxique; MΦ: macrophage) (Adapté de Bruhn *et al.*, 2007).

## **1.5.5 Vaccins vivants atténués contre les IIMs à *S. aureus***

### ***1.5.5.1 Importance de l'immunité à médiation cellulaire (IMC) pour la protection***

#### **Chez l'humain**

De façon générale, il est actuellement suggéré qu'un vaccin permettant le développement d'une immunité plus équilibrée, avec une forte composante de l'immunité à médiation cellulaire (IMC), soit nécessaire dans le cas de pathogènes responsables d'infections chroniques (Kovacs-Nolan et al., 2009). Dans le cas de l'homme, il est suggéré que puisque *S. aureus* fait partie de la flore normale de la peau et du nez, il est difficile de développer une immunité protectrice contre un pathogène qui a évolué depuis des milliers d'années pour contrecarrer le SI humain (Fowler and Proctor, 2014). En s'appuyant sur l'analyse d'essais cliniques de plusieurs vaccins, du niveau de protection obtenus avec ceux-ci, et de l'étude des effets des maladies génétiques de l'immunité sur le dénouement des infections à *S. aureus*, ces auteurs ont pu mettre en évidence l'importance de la réponse immune médiée par les lymphocytes, notamment de type Th-1 et Th-17, dans l'immunité contre *S. aureus*. La lignée de lymphocytes Th-17, plus récemment caractérisée, est maintenant considérée comme un acteur important dans la mobilisation de neutrophiles et la modulation de l'inflammation antigène-spécifique et innée (Weaver et al., 2006). Tel que discuté précédemment, *S. aureus* a la capacité de survivre dans les cellules de l'hôte : cela complique énormément le développement d'une immunité protectrice, et pourrait donc être une piste d'explication de l'inefficacité d'une réponse basée sur des anticorps. Ainsi, on se penche actuellement sur de nouveaux moyens de stimuler spécifiquement la voie Th-1 et Th-17 dans le développement de vaccins contre *S. aureus*.

#### **Chez les bovins**

Également chez la vache laitière, on considère qu'une réponse plus équilibrée permettant l'induction de la voie Th1, caractérisée par l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL), l'adhésion des macrophages et PMNs, la diapédèse et l'opsonisation, pourrait être plus efficace pour protéger la glande mammaire contre un pathogène chronique tel que *S. aureus*

(Gaudreau et al., 2007; Osogne et al., 2002). La voie Th-17 est également mise de l'avant : on a pu récemment montrer qu'elle pouvait être induite directement dans la glande mammaire, en caractérisant des réponses inflammatoires antigènes spécifiques Th-1 et Th-17 suite à l'immunisation i.m.a de vaches avec une protéine sensibilisante (Rainard et al., 2013). L'utilisation d'un vaccin vivant à base d'une souche atténuée de *S. aureus* pourrait ainsi être une approche intéressante pour obtenir ce type de réponse plus équilibrée vers l'IMC.

#### ***1.5.5.2 Exemples de souches atténuées de *S. aureus* pour la vaccination homologuée***

Peu d'études ont fait état de tentatives d'utilisation de *S. aureus* comme vaccin vivant chez l'humain. Tel que brièvement discuté précédemment dans ce document, quelques équipes ont mis au point des vaccins atténués contre *S. aureus* pour la mammite bovine depuis la première caractérisation d'une souche atténuée par Watson (1984). Récemment, un groupe a pu mettre au point un vaccin atténué par mutagenèse chimique. La souche atténuée RC122, issue de la souche pathogène RC108, a été mise à l'essai dans un *challenge* de 8 vaches par Pellegrino et al., en 2008. Après immunisation de vaches vaccinées à l'aide de cette souche RC122, une augmentation significative de la réponse immunitaire humorale spécifique a été observée par rapport au groupe d'animaux non immunisés, à la fois dans le lait et le sang. Cependant, après l'infection expérimentale à l'aide de la souche virulente RC108, la comparaison des comptes bactériens et des CCS moyens dans le lait n'a pu révéler de différence significative entre les vaches vaccinées et contrôles (Pellegrino et al., 2008). L'étude fut reprise en 2010 avec de nouvelles conditions expérimentales, notamment en réduisant le nombre d'UFCs de *S. aureus* du *challenge* de  $10^3$  à  $2.5 \times 10^2$  (Pellegrino et al., 2010). Une légère réduction de la charge bactérienne a pu être obtenue dans le groupe vacciné, mais encore une fois, avec peu d'animaux (5 vaccinés, 4 contrôles). Malheureusement, l'administration sous-cutanée du vaccin pourrait ne pas être appropriée au développement d'une immunité protectrice, puisque le principal paramètre amélioré par le vaccin fut une plus grande réponse IgG du groupe vacciné. Pourtant, une certaine diminution des symptômes cliniques a effectivement pu être observée (Pellegrino et al., 2010). Par ailleurs, le même groupe a pu obtenir une autre souche



de *S. aureus* atténuée par mutagenèse du gène *aroA*, la rendant auxotrophe pour les acides aminés aromatiques. L'immunisation intramammaire de souris par ce mutant a permis d'induire une réponse mixte T-auxiliaire Th1 et Th2, et de réduire significativement les comptes bactériens de souris infectées expérimentalement par *S. aureus* (Buzzola et al., 2006).

Ainsi, bien que certaines tentatives aient été effectuées pour développer un vaccin vivant contre les IIMs à *S. aureus*, aucune étude n'a encore fait la description de souches de *S. aureus* utilisées comme vecteur antigénique. Pourtant, des bactéries commensales ont déjà été utilisées pour délivrer des antigènes de *S. aureus*. Dans une étude d'Asensi et al. (2013), une séquence de gènes codant pour une SEB de *S. aureus* recombinante (*rseB*), dépourvue d'activité superantigénique, a été clonée et exprimée dans le cytoplasme ou sous une forme sécrétée par *L. lactis*. L'immunisation par voie orale avec les souches recombinantes de *L. lactis* a pu induire dans les deux cas une réponse immunitaire protectrice dans un modèle murin d'infection à *S. aureus* lors d'un *challenge* intrapéritonéal avec une souche productrice de SEB. Il serait ainsi intéressant d'utiliser à la fois une souche atténuée de *S. aureus* de façon homologue et hétérologue, en l'employant à la fois à titre de vaccin atténué et vecteur antigénique, pour concentrer la réponse contre des antigènes protecteurs.

## **1.6 Mise en contexte du projet**

### **1.6.1 Travaux précédents**

Comme l'ensemble des souches responsables de mammites bovines à *S. aureus* sont phénotypiquement très différentes, il semble qu'un antigène commun, idéal et protecteur contre de multiples souches de *S. aureus* n'ait pas encore été découvert. De plus, les facteurs de virulence (biofilms, survie intracellulaire, toxines superantigéniques) qui permettent au pathogène d'échapper au système immunitaire et aux traitements antibiotiques compliquent la potentialité d'efficacité des vaccins. Troisièmement, la (les) cibles des vaccins actuellement

développés seraient très souvent inadéquates (Middleton, 2008) : composantes présentes *in vitro*, mais pas nécessairement *in vivo* pendant que le pathogène cause la maladie.

Puisque l'environnement *in vivo* module l'expression des gènes de *S. aureus* lors de l'infection (Allard et al., 2006), l'équipe du Pr. Malouin a précédemment pu mettre en évidence 36 gènes de *S. aureus* exprimés de façon importante et soutenue chez plusieurs vaches et par différentes souches au cours d'IIMs expérimentales (Allard et al., 2013). L'équipe a entre autre démontré pour la première fois l'importance *in vivo* du gène surexprimé SACOL0720 (*vraG*) dans la virulence de *S. aureus*, via l'atténuation importante du mutant de délétion  $\Delta 720$  lors d'une IIM expérimentale. *VraG* avait déjà été décrit pour son rôle dans la résistance à certains peptides cationiques antimicrobiens (CAMPs) de l'hôte (Falord et al., 2012) et la résistance intermédiaire à la vancomycine (Meehl et al., 2007).

Celui-ci, avec 5 autres gènes surexprimés *in vivo*, ont récemment été testés sous forme de vaccin protéique sous-unitaire pour leur capacité de protection chez la vache laitière (Ster et al., 2014) (en préparation). Le vaccin sous-unitaire a pu induire une forte réponse contre les six antigènes chez les vaches vaccinées, à différentes intensités selon l'antigène. Les vaches vaccinées ont également montré un CCS significativement inférieur comparativement aux vaches du groupe témoin suite au *challenge* avec *S. aureus* (Ster et al., 2014).

### **1.6.2 Hypothèse et objectifs de recherche**

Afin d'améliorer l'efficacité et la rentabilité du vaccin, et permettre d'augmenter la réponse immune à médiation cellulaire contre ces antigènes, ce projet avait comme objectif principal l'élaboration d'une souche atténuée de *S. aureus* pour une future utilisation à titre de vecteur vivant d'antigènes. À cette fin, la souche devrait être capable d'internalisation transitoire dans les cellules, afin de pouvoir stimuler l'IMC, et être à la fois suffisamment atténuée pour ne survivre que quelques temps suite à son inoculation.

L'hypothèse générale du projet suggère que le phénotype SCV de *S. aureus* peut être utilisé comme squelette de base d'une souche atténuée, via une stabilisation du phénotype par la

délétion complète du gène *hemB*. L'hypothèse suggère également que cette délétion pourrait avoir un effet d'atténuation à la fois directe sur le métabolisme, via la croissance lente, et indirecte sur la virulence. Puisque le phénotype SCV est caractérisé par une inhibition ou expression moindre des facteurs de virulence invasifs ( $\alpha$ -hémolysine, coagulase, etc.) par rapport au phénotype régulier, cela constituerait une atténuation multiple de la virulence d'un seul coup. Une inactivation du gène SACOL0720 permettrait d'obtenir une atténuation supplémentaire *in vivo* via la sensibilité accrue aux CAMPS.

Également, le phénotype SCV permettrait d'obtenir une internalisation accrue dans les cellules de l'hôte, afin de stimuler la voie de présentation antigénique du CMH-I. Dans le modèle d'IIM murine utilisé au laboratoire de Dr. Malouin, les SCVs ont démontré une plus grande capacité de survie intracellulaire, mais une plus faible capacité à générer une infection invasive destructive de la glande (Brouillette et al., 2004). Ainsi, le vaccin vivant SCV aurait la capacité d'entrer et de se multiplier pendant une courte période dans les cellules, et ainsi de délivrer des antigènes clés de façon intracellulaire.

Par conséquent, l'obtention d'un double mutant de phénotype SCV génétiquement stable et inactivé dans SACOL0720 ( $\Delta 720\Delta hemB$ ) fut le premier objectif spécifique de cette étude. Enfin, pour établir la preuve de concept qu'une telle souche peut effectivement être utilisée pour la vaccination, la caractérisation et l'évaluation de son atténuation dans des modèles de culture cellulaire et *in vivo* chez la souris pour confirmer son innocuité est l'approche qui a été sélectionnée dans le cadre de ce projet.

## CHAPITRE II

### ARTICLE 1

#### CHARACTERIZATION OF A GENETICALLY STABLE STAPHYLOCOCCUS AUREUS SMALL-COLONY VARIANT FOR USE AS A LIVE-ATTENUATED VACCINE AGAINST INTRAMAMMARY INFECTIONS

##### 2.1 Avant-propos

L'article présenté ici documente les résultats d'une étude effectuée dans le contexte de recherche de protection contre les infections intramammaires contre SA. Puisque l'impact économique de ce pathogène est particulièrement alarmant pour l'industrie laitière et que les modes de vaccination classiquement mis à l'essai n'ont toujours pas pu montrer d'efficacité, le besoin est criant pour établir de nouvelles stratégies de protection. Ainsi, cette étude s'insère bien dans une situation actuelle et d'intérêt.

D'une façon plus générale qui va bien au-delà du contexte de la mammite bovine, l'utilisation du phénotype SCV comme base d'atténuation d'une souche dans un contexte de vaccination est une approche originale qui n'a jamais été étudiée, à notre connaissance. Cet article relate ainsi des résultats intéressants qui mettent en valeur les qualités des SCVs pouvant être exploitées pour l'atténuation, mais également pour ses capacités intracellulaires. De ce fait, l'article expose les premières preuves de concept d'utilisation d'une souche SCV à titre de vaccin vivant atténué, mais ouvre également des perspectives futures d'emploi de celui-ci pour délivrer des antigènes ciblés à titre de vecteur. Puisque la chronicité de *S. aureus* est la base d'un problème clinique global dans de multiples cas d'infections chez l'humain, cette étude est aussi d'intérêt en vaccinologie humaine.

## 2.2 Contributions des auteurs

**Julie Côté-Gravel (1<sup>er</sup> auteur) :** Est la personne qui a participé activement à la planification expérimentale du projet et qui fut responsable de générer la majorité des résultats : les clonages pour la création des mutants, la génération du double mutant et le suivi du développement du mutant simple *hemB*, la mise au point et tous les résultats des essais d'infection en culture cellulaire, le suivi du déroulement des expériences *in vivo*, les dosages de l'activité inflammatoire des souris et des analyses statistiques. C'est l'auteure qui a rédigé la première version complète du manuscrit et a finalisé les versions subséquentes.

**Eric Brouillette (2<sup>e</sup> auteur) :** A grandement contribué à la planification expérimentale du projet, est l'auteur principalement responsable du modèle d'infection expérimentale des souris et a contribué à générer les résultats évaluant la charge bactérienne. Participation dans la révision du manuscrit.

**Nataša Obradović (3<sup>e</sup> auteur) :** A participé à la génération du mutant simple *hemB* et à sa caractérisation *in vitro*.

**Céline Ster (4<sup>e</sup> auteur) :** Planification expérimentale du projet.

**Brian G. Talbot (5<sup>e</sup> auteur) :** Planification expérimentale du projet et travail de révision du manuscrit.

**François Malouin (6<sup>e</sup> auteur) :** Principal investigateur du projet, chercheur responsable et révision du manuscrit.

### 2.3 Résumé de l'article en français

Le pathogène *Staphylococcus aureus* est une cause majeure de la mammite bovine et est responsable d'infections intramammaires (IIMs) qui sont difficiles à traiter par antibiothérapie. De plus, aucune formulation de vaccin n'a démontré d'efficacité de protection élevée à ce jour, possiblement en raison du développement de réponses immunitaires inadéquates et de la capacité de *S. aureus* à persister dans les tissus et de façon intracellulaire chez l'hôte. Les *small-colony variants* (SCVs) de *S. aureus* sont facilement internalisés dans les cellules et persistent sans générer d'infections invasives. En tirant profit des aspects phénotypiques particuliers des SCVs, nous avons construit une souche atténuée de *S. aureus* par la suppression génétiquement stable du gène *hemb* ( $\Delta hemb$ ). De plus, une atténuation supplémentaire a pu être obtenue par l'inactivation du gène SACOL0720 ( $\Delta 720$ ), dont l'importance dans la virulence pendant l'IIM chez le bovin a précédemment été démontrée. Dans un modèle d'invasion de cellules épithéliales mammaires bovines (MAC-T), le double mutant ( $\Delta 720\Delta hemb$ ) a présenté une destruction cellulaire et une internalisation significativement plus faible par rapport à celles observées avec les mutants simples  $\Delta hemb$  et  $\Delta 720$ , respectivement. L'évaluation de la sécurité de la souche par l'inoculation intramammaire du double mutant dans un modèle de mammite murin a également démontré une forte atténuation avec une charge bactérienne fortement réduite (différence de 5 log<sub>10</sub> UFC / g de glande par rapport au type sauvage), conduisant ultimement à des glandes exemptes de comptes bactériens détectables. À titre comparatif, la souche parentale a provoqué des infections invasives aiguës, en maintenant des comptes bactériens élevés et en entraînant la mort des souris dès 48 h post-infection. En outre, il est intéressant de noter que bien que l'infiltration des neutrophiles, évaluée par la mesure de l'activité myéloperoxydase (MPO) dans les glandes, a démontré être similaire à 24 h d'infection pour les souches mutantes et parentale, l'inflammation visuelle et la destruction tissulaire induite par cette dernière était nettement plus prononcée. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent qu'une souche vaccinale de *S. aureus* à la fois suffisamment atténuée *in vivo* et ayant certaines capacités intracellulaires peut être obtenue par la stabilisation génétique du phénotype SCV.

## 2.4 TITLE PAGE

Characterization of a genetically stable *Staphylococcus aureus* small-colony variant for use as a live-attenuated vaccine against intramammary infections

J. Côté-Gravel, E. Brouillette, N. Obradović, C. Ster, B. G. Talbot and F. Malouin\*

Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM), Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada, J1K 2R1<sup>1</sup>

Running title: *S. aureus* SCV mastitis attenuated vaccine

Keywords: *hemB*, *Staphylococcus aureus*, small-colony variant, mastitis, vaccine, attenuated

\*Corresponding author. Mailing address: Université de Sherbrooke, Département de biologie, Faculté des sciences, 2500 boul. Université, Sherbrooke, QC, Canada, J1K2R1. Phone: 819-821-8000 ext. 61202. Fax: 819-821-8049. E-mail: Francois.Malouin@USherbrooke.ca

## 2.5 ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is a leading cause of bovine mastitis, and produces intramammary infections (IMIs) that are particularly difficult to treat with antibiotics. Moreover, no vaccine formulation has shown high protective efficacy to date, possibly because of the development of an inadequate immune response and the ability of *S. aureus* to persist within host cells. *S. aureus* small colony variants (SCVs) are easily internalized in host cells and persist without generating invasive infections. Taking advantage of the particular phenotypic aspects of SCVs, we have first customized an attenuated strain of *S. aureus* through a stable deletion of the *hemB* gene ( $\Delta hemB$ ). Further attenuation was achieved by inactivation of gene SACOL0720 ( $\Delta 720$ ), which has previously been shown to be important for virulence during bovine IMI. In MAC-T bovine mammary epithelial cells, the double mutant ( $\Delta 720\Delta hemB$ ) showed significantly lower internalization and cell destruction compared to that seen with  $\Delta hemB$  and  $\Delta 720$ , respectively. Safety evaluation by intramammary inoculation of the double mutant in a murine mastitis model also showed a strong attenuation with a greatly reduced bacterial burden (5-log<sub>10</sub> difference in CFU/g of gland compared to wild type *S. aureus*), ultimately leading to complete bacterial clearance. In comparison, the parental strain provoked a severe invasive infection, maintaining high viable counts resulting in death of the mice starting at 48 h post infection. Interestingly, neutrophil infiltration in mammary glands, as judged by measurement of myeloperoxidase (MPO) activity, was similar at 24 h of infection for the parent and double mutant strains although visual inflammation and tissue destruction by the parental strain was far more pronounced. Taken together, these results suggest that an attenuated and safe *S. aureus* vaccine strain having some intracellular capabilities can be obtained by genetic stabilization of the SCV phenotype without impeding immune cell recruitment.



## 2.6 INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* is a major human and animal pathogen that can cause high morbidity, severe infections, as well as difficult-to-treat chronic forms of diseases. Among factors that can explain the failure of antibiotherapy and the tendency to cause chronic infections, many have noted the pathogen's multifaceted characteristics of virulence, predominantly its abilities to impair or elude host immune responses by toxin secretion (20), formation of biofilms (40) and survival in non-phagocytic host cells which may shield the pathogen from the action of antimicrobials (2, 11, 38). Furthermore, incidences of *S. aureus* infections are becoming more worrisome with the emergence of multiple antibiotic resistant strains. There is an urgent need to find potent new strategies to control this pathogen.

In the case of bovine mastitis, a major problem for the dairy industry, *S. aureus* is one of the most frequently isolated contagious pathogens in clinical infections (55, 67) and is the etiologic agent responsible of most subclinical infections (35). These infections tend to be of real concern as they often stay unnoticed by producers, are highly transmissible during milking, and frequently result in chronic infection that can persist for the life of the animal (60) thus generating tissue damage and rapidly leading to a decrease in milk production and quality (64).

The development of vaccines for the prevention and control of *S. aureus* intramammary infections (IMIs) has been extensively investigated although no formulation has demonstrated protective efficacy to date. This is probably because of inadequate vaccine targets (41, 42), high diversity among strains capable of provoking mastitis (13, 29, 41) or the failure to elicit an appropriate immune response (6, 19, 21, 51). It is increasingly understood that immunity solely based on vaccine-induced antibodies may be important but is however insufficient for inducing protection against *S. aureus* (41, 42). It appears that cell mediated immunity (CMI) based on Th1 and Th17 type responses may be necessary to complete the protection (21, 37, 51, 58).

In a previous study, we used DNA microarray transcriptional analysis to uncover *S. aureus* genes that were highly expressed by several strains in an experimentally induced bovine IMI (1). One gene (*guaA*) was shown to be a good target for a new drug therapy (59), and other genes were further investigated as vaccine candidates. Gene SACOL0720, among other *in vivo* highly expressed genes, was shown as likely to be induced by the milk environment. The importance of this gene in *S. aureus* virulence was demonstrated by the significant attenuation of growth of the inactivation mutant  $\Delta 720$  in bovine IMI (1). We also showed the ability of antigens derived from SACOL0720 and other *in vivo*-expressed genes to induce a strong immune response against *S. aureus*, and evaluated the protection induced by this subunit vaccine by a challenge against experimentally induced IMI in dairy cows (to be published). The use of attenuated live bacteria to immunize and to deliver these modified antigens represents an interesting approach to improve immune responses (24). Live attenuated organisms that mimic natural infection stimulate the immune system in a powerful manner, eliciting broad and robust immune responses that produce both serum and mucosal antibodies, and effector and memory T cells which act synergistically to protect against disease (16, 30, 48).

It is now recognized that *S. aureus* small colony variants (SCVs) might add important contributions to chronic infections and therapy failures, and have a possible role in immune survival. This may be attributed to their particular phenotype adapted for long-term persistence in tissues via a distinct virulence factors expression profile (43) and survival in host cells (38, 56). Intracellular bacteria are then largely protected against antimicrobial treatments and host immune system. Since it has been shown that SCVs have an improved ability of internalization in cells (11, 44, 61) and colonize host without generating invasive infections or tissue destruction (3, 4, 52), we hypothesized that these features could be interesting to develop genetically attenuated *S. aureus* strains. The SCV phenotype would act as both an attenuation in metabolism (dependence on fermentation) and virulence, while conferring some intracellular abilities at the same time. Thus, these SCV-based attenuated strains could be used as live vaccines or antigen delivery vectors to improve cell mediated immunity and protection against mastitis.

In this study, we stabilized the SCV phenotype via *hemB* complete deletion thus impairing the possibility of reversion to an invasive phenotype (62). In addition, further attenuation was brought about by inactivation of gene SACOL0720, which has been previously shown to be important for *S. aureus* in cationic peptide resistance (17, 27, 39) and *in vivo* during IMI (1). Hence, this attenuated double mutant strain should be usable for immunization and protection against IMIs. We then evaluated the persistence of the attenuated strain in a bovine mammary epithelial cell invasion model and verified its attenuation and safety in a murine IMI model.

## 2.7 MATERIAL AND METHODS

### **Bacterial strains and growth conditions.**

Strains used in this study are listed in Table 1. *S. aureus* ATCC 29213 and its isogenic mutant  $\Delta 720$  were previously described (Allard *et al.* 2013). Except otherwise stated, *S. aureus* strains were grown in tryptic soy broth (TSB) and agar (TSA) (BD, ON, Canada), and *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  were grown in LB and LBA medium (BD). Whenever required, ampicillin (100 $\mu$ g/ml) (Sigma, Oakville, Ontario, Canada), chloramphenicol (20  $\mu$ g/ml) (ICN Biomedicals, Irvine, CA), and erythromycin (10  $\mu$ g/ml) (Sigma) were added to agar plates.

### **Cell culture conditions**

An established bovine mammary epithelial cell (BMEC) line, MAC-T (Huynh *et al.*, 1991), was used as a cell culture model of infection. The MAC-T cells were routinely cultured and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), supplemented with 5 $\mu$ g/ml insulin (Roche Diagnostics Inc., Laval, Canada) and 1 $\mu$ g/ml hydrocortisone (Sigma), and incubated at 37°C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. Cell culture reagents were purchased from Wisent (St-Bruno, QC, Canada).

**Table 1. Strains and plasmids used in this study**

Strain or plasmid	Relevant details	Source or Reference
Strains		
<i>S. aureus</i> RN4220	Derivative of 8325-4, acceptor of foreign DNA, r-	Kreiswirth <i>et al.</i> (1983)
ATCC 29213	Wild Type, SACOL0720 ( <i>vraG</i> ) positive, normal phenotype	ATCC29213
$\Delta 720$	SACOL0720 ( <i>vraG</i> ) transposon insertion isogenic mutant of ATCC29213	Allard <i>et al.</i> (2013)
$\Delta hemB$	<i>hemB::Em<sup>r</sup></i> ; isogenic mutant of ATCC29213, SCV phenotype	This study
$\Delta 720\Delta hemB$	<i>hemB::Em<sup>r</sup></i> ; isogenic mutant of $\Delta 720$ , SCV phenotype	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	supE44 DlacU169 ( $\Phi 80$ lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Invitrogen
Plasmids		
pBT2	Shuttle vector, temperature-sensitive, Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	Brükner (1997)
pBT-E	pBT2 derivative, inserted <i>ErmA</i> cassette	This study
pBT-E <i>hemB</i>	pBT2 derivative, for <i>hemB</i> deletion; Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Em <sup>r</sup>	This study

## **DNA manipulations**

Recommendations from the manufacturers of kits were followed for genomic DNA isolation (Sigma), plasmid DNA isolation (Qiagen, ON, Canada), extraction of DNA fragments from agarose gels (Qiagen) and purification of PCR products and of digested DNA fragments (Qiagen). An additional treatment of 1h with lysostaphin (Sigma) at 200 µg/ml was used to achieve efficient lysis of *S. aureus* cells in genomic and plasmid DNA isolations. The oligonucleotides (IDT® Integrated DNA Technologies; Coraville, Iowa, USA) used as primers for cloning and plasmid construction are listed in Table 1. Primers were designed to add restriction sites upstream and downstream of the amplified products. PCRs were performed using the Taq DNA Polymerase (NEB, Pickering, ON, Canada) for routine PCR or the Q5 high fidelity DNA Polymerase (NEB) for cloning, and cycling times and temperatures were optimized for each primer pair. Plasmid constructs were generated using *E. coli* DH5α (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), restriction enzymes (NEB), and the T4 DNA ligase (NEB). Plasmid constructs were validated by restriction digestion patterns and DNA sequencing before electroporation in *S. aureus* RN4220 (32) and in final host strains. Plasmids used in this study are listed in Table 1.

## **Generation of pBTE: *hemB* and insertional deletion of *hemB***

Isogenic *hemB* mutants of the ATCC 29213 and Δ720 strains were constructed, in which the *hemB* gene was deleted and replaced by the insertion of an *emrA* cassette by homologous recombination. The temperature-sensitive pBT2-*hemB:emrA* (pBT-E:*hemB*) was used in a strategy previously described (45), with some modifications. Briefly, the pBT-E plasmid was constructed by the insertion of an *ermA* cassette between *Xba*I and *Sal*II sites of temperature-sensitive shuttle vector pBT2 (12). The flanking regions of gene *hemB* (26) DNA fragments were amplified from *S. aureus* ATCC 29213 and were cloned on both sides of the *ermA* cassette into the plasmid pBT-E. The plasmid was then transferred for propagation into *S. aureus* RN4220 (res-). After bacterial lysis with lysostaphin (200 µg/ml for 1 h at room temperature), plasmid DNA was isolated and used to transform ATCC 29213 and Δ720 by electroporation. For plasmid integration and mutant generation, bacteria were first grown

overnight at 30°C with 10 µg/ml of erythromycin and a 1 µg/ml hemin supplementation (Sigma-Aldrich, ON, Canada). Bacteria were then diluted 1:1000 and grown overnight at 42°C with 2.5 µg/ml of erythromycin and 1 µg/ml hemin. This step was repeated twice. Finally, bacteria were diluted 1:1000 and grown overnight at 42°C without antibiotics. Revertants with the inactivated *hemB* gene were selected as resistant to erythromycin and sensitive to chloramphenicol, together with a SCV phenotype that can be reversed by a 5 µg/ml hemin supplementation on agar plates. The deletion of *hemB* in the ATCC 29213 and  $\Delta 720$  strains was confirmed by PCR.

#### **Hemin supplementation in broth culture.**

To evaluate the capacity of hemin to restore optimal growth kinetics of *S. aureus*  $\Delta hemB$  and the double mutant  $\Delta 720\Delta hemB$ , overnight bacterial cultures were diluted to an  $A_{600\text{ nm}}$  of approximately 0.1 in culture tubes containing fresh BHI supplemented with hemin (Sigma) added at various concentrations. The  $A_{600\text{ nm}}$  of cultures was monitored at different points in time during the incubation period at 35°C (225 rpm).

#### ***S. aureus* infection of bovine mammary epithelial cells (BMECs).**

MAC-T BMECs were used for the characterization of intracellular infectivity and persistence of ATCC 29213 (WT) and its isogenic mutants. Forty-eight hours before infection,  $1 \times 10^5$ /ml MAC-T cells were seeded on treated 24-well plates (Corning) to obtain 30 % confluence. Monolayers were grown to confluence under 10% CO<sub>2</sub> at 37°C. Six hours prior to infection, monolayers were washed with DMEM and incubated with invasion medium (IM) (growth medium without antibiotics containing 1% heat-inactivated FBS). Overnight bacterial cultures were diluted 1:20 in fresh TSB and grown to mid-logarithmic growth phase, then washed with PBS and diluted in IM to a multiplicity of infection of 10. Invasion was achieved by incubating monolayers with bacteria for 3 h. Monolayers were then washed with DMEM and incubated with IM containing 20 µg/ml lysostaphin to kill extracellular bacteria. The use of lysostaphin to kill extracellular normal and SCV *S. aureus* was previously validated in cell

invasion assays (46, 61). The treatment was allowed for 30 min to determine CFUs at 3h of infection, or for an additional 12 or 24 h. Then, following extensive washing with Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), monolayers were detached with trypsinization and lysed with 0.05% Triton X-100 and PBS was added to obtain a final 1X concentration. The lysate was serially diluted and plated on TSA for CFUs determination.

#### **BMECs viability and metabolic activity assay.**

To determine the cytotoxic damage inflicted by *S. aureus* ATCC 29213 (WT) and its isogenic mutants on MAC-T cells, the MTT cell metabolic activity assay that measures the reduction of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) into an insoluble formazan product in viable cells, was performed. The assay followed the method of Kubica *et al.* (33) with some modifications. Briefly, *S. aureus* infection of cells was achieved as described in the persistence assay, but instead of lysis after 12 h or 24 h, cells were incubated with 100 µl of MTT reagent (5 mg/ml) (Sigma) in DPBS for 2 h at 37 °C. Following this, an acidic solvent solution of 16 % SDS and 40 % PMF, pH 4.7, was added to lyse the cells and solubilize the crystals of formazan overnight. The samples were read using an Epoch microplate reader (Biotek Instruments Inc.) at a wavelength of 570 nm. All assays were performed in triplicate, and control wells with uninfected cells (high viability control) or lysed WT infected cells (bacteria background control; treated with 0,05 % triton X-100 for 10 min before MTT addition) were included to each plate. The level of metabolic activity was calculated using the following formula:

$(\text{absorbance of the sample} - \text{background control}) / \text{high control} \times 100.$

### **Virulence in the mouse mastitis model.**

The mouse mastitis model of infection is based on that previously described (10, 11). Briefly, one hour following removal of 12-14 day-old offspring, lactating CD-1 mice (Charles River Laboratories) were anesthetized with ketamine and xylazine at 87 and 13 mg/kg of body weight, respectively, and mammary glands were inoculated under a binocular. Mammary ducts were exposed by a small cut at the near ends of teats and a 100  $\mu$ l-bacterial suspension containing  $10^2$  CFUs in endotoxin-free phosphate-buffered saline (PBS, Sigma) was injected through the teat canal using a 32-gauge blunt needle. Two glands (fourth on the right [R4] and fourth on the left [L4] from head to tail) were inoculated for each animal. Mammary glands were aseptically harvested at the indicated times, weighed and visually evaluated for inflammation. Bacterial burden was evaluated after mechanical tissue homogenization in PBS, serial dilutions, and plating on agar for CFU determination. In a second experiment, homogenized glands were conserved for protein extraction for myeloperoxidase (MPO) activity enzymatic assays.

### **Mammary gland protein extraction.**

Total protein extraction from mammary glands was performed by an optimized method previously described (54), with some modifications. Mammary tissues were homogenized in a buffer containing a final concentration of potassium phosphate of 50 mM, pH 6.0, and hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) 50 mM (Sigma). The samples were then sonicated, freeze-thawed in liquid nitrogen, and centrifuged at 2000 g for 15 min at 4°C. Finally, the fat layer was removed by aspiration, and supernatants were saved for a final centrifugation of 15 min at 15 000 g, to discard every cellular debris. Supernatants were distributed in aliquots and kept at -80 ° C until use for the enzymatic assays or protein concentration determination as measured by the bicinchoninic acid method (BCA) Protein Assay Kit (Thermo-Scientific).



### **MPO activity assay.**

Neutrophil recruitment in mammary tissues was measured by quantification of MPO enzyme activity by the *o*-dianisidine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> method, modified for microplates (8). In a 96-well microplate, 10  $\mu$ l of tissue extraction supernatants were incubated with a solution of *o*-dianisidine hydrochloride (0.167 mg/mL) (Sigma) and 0.0005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) in 50 mM CTAB phosphate buffer 50 mM, pH 6.0. The MPO activity was measured kinetically with intervals of 15 s over a period of 5 min in an Epoch microplate reader at 460 nm. A Unit of MPO was considered as the amount of enzyme that degrades 1  $\mu$ mol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min at 25°C, assuming an absorption coefficient of 11.3 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 460 nm for *o*-dianisidine (68). Results were expressed as units of MPO per g of gland.

### **Statistical analysis.**

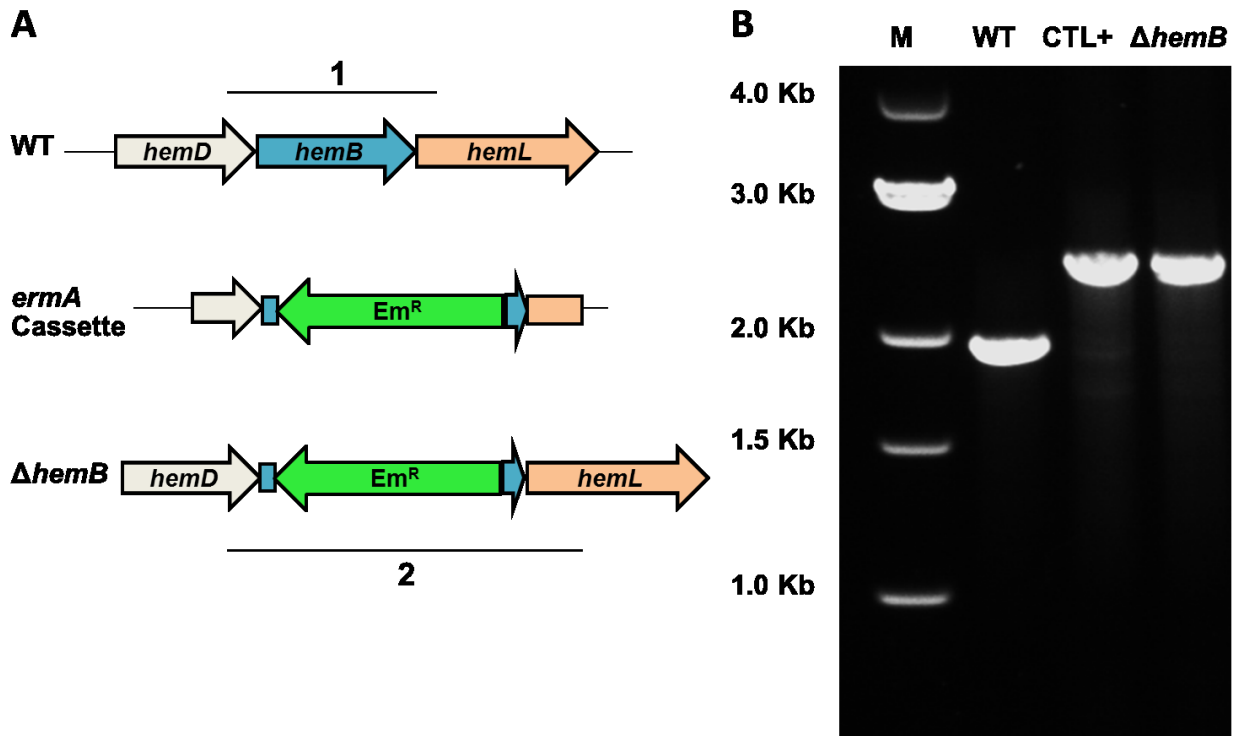
Statistical analyses were carried out with the GraphPad Prism software (v.6.02). Intracellular bacterial CFUs and bacterial CFUs/g of gland (IMI in mice) were transformed in base 10 logarithm values before being used for statistical analyses. Statistical tests used for the analysis of each experiment and significance are specified in the figure legends.

## **2.8 RESULTS**

### **Validation of the SCV phenotype**

To create an attenuated strain through genetically stable SCVs, homologous recombination was used to generate *hemB* mutants in wild-type and  $\Delta$ 720 *S. aureus*, as shown in Fig. 1A. The *hemB* deletion was confirmed by PCR (Fig. 1B).

The gene *hemB* codes for  $\delta$ -aminolevulinate dehydrase, an essential enzyme in porphyrin biosynthesis converting  $\delta$ -aminolevulinic acid to porphobilinogen (26). Lacking this enzyme, the *hemB* mutant does not synthesize heme resulting in a defective electron transport system and ATP synthase activity. The *hemB* mutant thus produces much less energy and



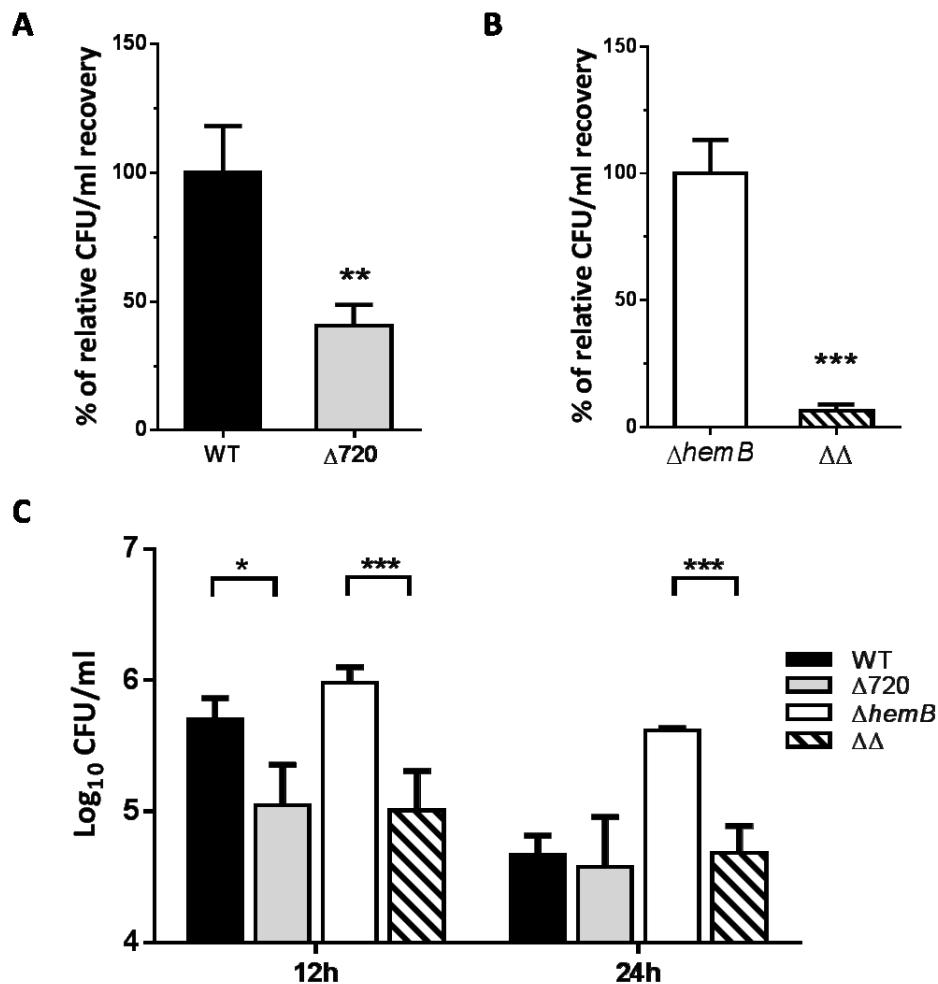
**FIG. 1.** Deletion of *hemB* in ATCC 29213 and  $\Delta$ 720 strains of *Staphylococcus aureus*. (A) The *hemB* gene in the wild-type (WT) strain ATCC 29213 and its isogenic mutant  $\Delta$ 720 was deleted by homologous recombination and replacement with an *ermA* cassette to create the mutant strains  $\Delta$ *hemB* and  $\Delta$ 720 $\Delta$ *hemB*, respectively. Thick lines and numbers denote the PCR-amplified regions depicted in B for parental (1) and *hemB* deleted (2) strains. (B) PCR products of the WT strain and its isogenic  $\Delta$ *hemB* mutant (similar results were obtained with  $\Delta$ 720 and  $\Delta$ 720 $\Delta$ *hemB* strains).

secondary metabolism is impaired. This phenotypically translates into a slow growth. *In vitro* characterization of mutants confirmed the expected small-colony phenotype of SCVs. After 48 h of incubation at 37°C on TSA, colonies of *S. aureus*  $\Delta hemB$  and  $\Delta 720\Delta hemB$  were approximately 0.5 mm in diameter and appeared non-pigmented, whereas colonies of the parent WT and  $\Delta 720$  strains were 5 mm or greater in diameter with a bright yellow pigmentation. The lack of pigmentation in SCVs was previously documented (52). Growth of the *S. aureus*  $\Delta hemB$  mutants reached a plateau at a lower bacterial density in broth culture compared to WT *S. aureus*, but the addition of hemin (1  $\mu\text{g/ml}$ ) in TSB restored the capacity of *S. aureus*  $\Delta hemB$  to reach a maximal bacterial density equivalent to that of the parent strain (data not shown). Similar results were obtained for the  $\Delta 720\Delta hemB$  double mutant compared to its isogenic strain  $\Delta 720$ . WT and  $\Delta 720$  showed no difference in growth in broth cultures using TSB or milk as cultivation medium, as shown in a previous study (1).

These results show validation of the SCV phenotypes in *hemB* mutants and demonstrate that chemical complementation by supplemental hemin restores the WT phenotype to the full extent.

#### **A mutation in gene SACOL0720 impairs *S. aureus* internalization in BMECs.**

We compared the infectivity of the WT,  $\Delta 720$ ,  $\Delta hemB$  and  $\Delta 720\Delta hemB$  strains in infection and persistence assays using MAC-T cells. By comparing the three mutant strains to their isogenic WT parent, distinct effects of mutations in gene *hemB* and SACOL0720 were observed. A short 3-h incubation of bacteria with cell monolayers followed by the addition of lysostaphin to eliminate extracellular bacteria demonstrated good levels of internalization into MAC-T cells for both WT and  $\Delta hemB$  strains, based on the recovery of intracellular CFUs. On the other hand, the single  $\Delta 720$  mutant showed significantly less ( $P \leq 0.01$ ) internalization compared to its parental WT strain (Fig. 2A). The reduction in internalization seen in  $\Delta 720$  was even more pronounced when comparing the double mutant  $\Delta 720\Delta hemB$  to  $\Delta hemB$ , with a



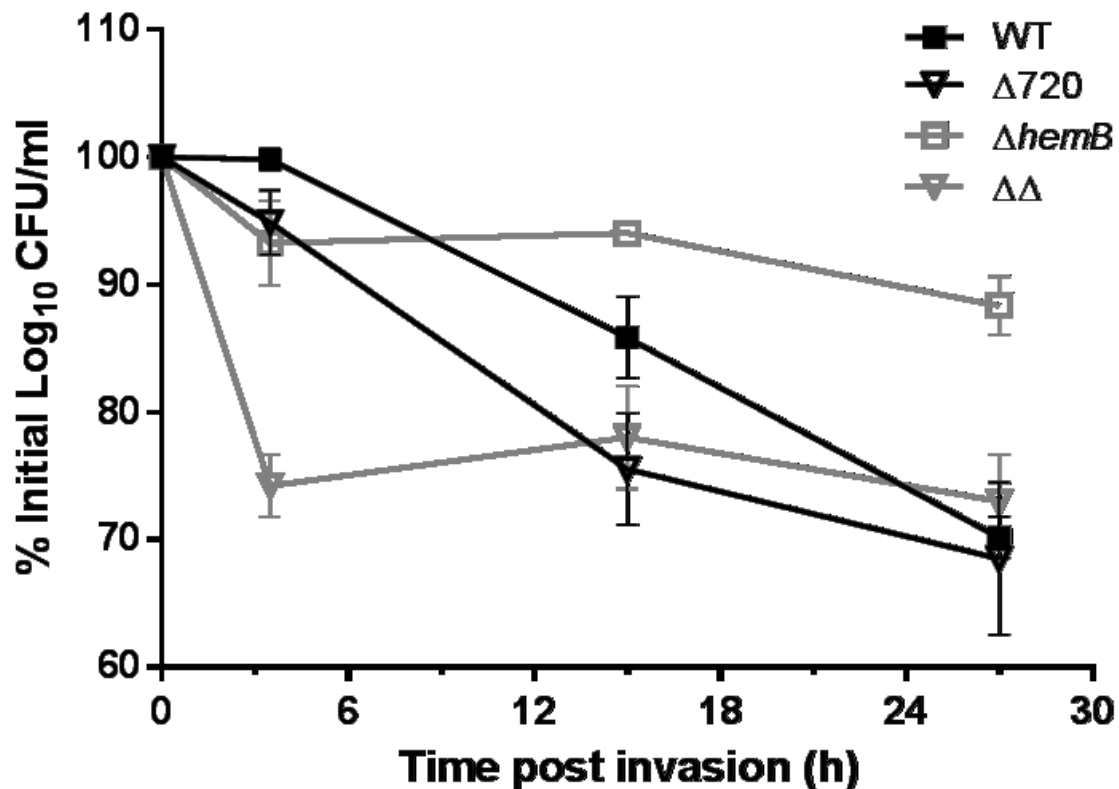
**FIG. 2.** Influence of *S. aureus*  $\Delta hemB$ ,  $\Delta 720$ , and  $\Delta 720\Delta hemB$  mutations on MAC-T cell infectivity. MAC-T cells were infected with each of the four strains for 3h, then were incubated with lysostaphin an additional 30 min ( $t=3h$ ), 12h or 24h and lysed for measurement of intracellular bacteria (CFU). (A) Relative recovery of the initial inoculum found within cells at  $t=3h$  for  $\Delta 720$ , and (B) for  $\Delta 720\Delta hemB$  mutants. Results are normalized according to that obtained for ATCC 29213 (WT) or  $\Delta hemB$ , respectively, and are expressed as means with SD (\*\*,  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0.001$ ; unpaired t test). (C) Means and SD of intracellular CFUs for WT and mutants at 12h (left) and 24h (right). A two-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test was used (\*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ). All values indicate the mean of three independent experiments, each performed in triplicate.

10-fold reduction of inoculum recovery in this 3-h internalization assay ( $P \leq 0.001$ , Fig. 2B). This initial reduction of internalized bacterial load was still apparent 12 and 24 h post invasion (PI) for the double mutant strain  $\Delta 720\Delta hemB$  (Fig. 2C), as illustrated by the 1-log<sub>10</sub> reduction of CFU/ml at both time points compared to that observed for  $\Delta hemB$  ( $P \leq 0.001$ ). The difference in initial intracellular bacterial loads between the single  $\Delta 720$  mutant and WT strains (Fig. 2A) gradually vanished with longer incubation times (Fig. 2C), as both strains did not persist well in MAC-T cells (Fig. 3). On the contrary, intracellular CFUs recovered for the single  $\Delta hemB$  strain were significantly higher compared to those recovered for the three other strains at 24 h PI (Fig. 2C,  $P \leq 0.001$  against all). Overall and as expected for the SCV phenotype, the  $\Delta hemB$  strain showed a better intracellular persistence than any other strain over time (Fig. 3).

These results suggest that the  $\Delta 720$  mutation mainly reduces the internalization into MAC-T cells. These results further demonstrate that the  $\Delta 720\Delta hemB$  mutant is still capable of internalization and persistence into BMECs but at a much lower degree than that seen with the single  $\Delta hemB$  mutant.

### **$\Delta 720\Delta hemB$ and $\Delta hemB$ SCVs cause low BMEC disruption**

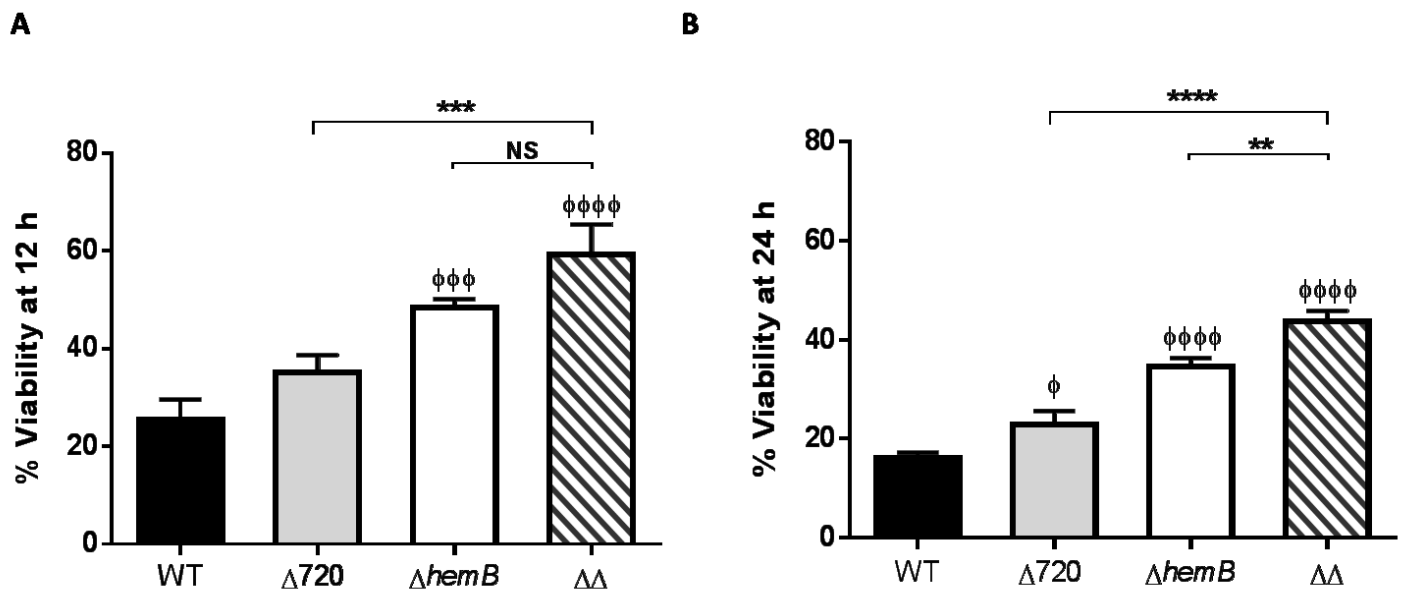
As reported above, SCV strains showed a greater persistence over time in MAC-T cells, as illustrated by their sustained viability at 12 and 24 h PI in comparison with WT and  $\Delta 720$  strains (Fig. 2C and 3). Percent of inoculum recovered from cells stayed nearly the same from 0 to 24 h after lysostaphin addition, both for the double and single  $hemB$  mutants, with a slight increase at 12 h indicating intracellular growth (Fig. 3). Both strains started to decrease at a slow rate after this time of infection. However, the apparent reduction of intracellular CFUs for the WT and  $\Delta 720$  strains was concomitant with the visual observation of increasing damage to cell monolayers over time, in comparison to that observed with strains of the SCV phenotypes. This prompted us to evaluate MAC-T cell viability following infection by each of the four strains studied. MAC-T cell viability was measured using the MTT method in the same conditions as for the determination of intracellular bacterial counts.



**FIG. 3.** Persistence of *S. aureus* ATCC 29213 (WT) and isogenic mutants within MAC-T cells over time. MAC-T cells were infected with each of the four strains for 3h, then were incubated with lysostaphin an additional 30 min, 12h or 24h and lysed for measurement of intracellular bacteria (CFU). Intracellular bacterial CFUs are expressed as the percentage of the initial inoculum after being transformed in base 10 logarithmic values (Log<sub>10</sub> CFU/ml). Values indicate the mean of three independent triplicate experiments with standard deviations.

As expected, both SCV strains caused significantly less MAC-T killing in this assay in contrast to the WT and Δ720 strains: when compared to ΔhemB, the WT strain nearly reduced by half the viability of cells at 12 h (Fig. 4A: WT: 25.37 %; ΔhemB: 48.38%). This difference was still apparent at 24 h (Fig. 4B: 16.25 vs. 34.55 %, respectively), even if the bacterial load was 10 times higher for the ΔhemB mutant (Fig. 2C). The MAC-T cells were more damaged by ΔhemB than by the double mutant Δ720ΔhemB but the difference was only significant at 24

h ( $P \leq 0.01$ ). When compared directly to the WT strain, the double mutant sustained epithelial cells viability 2.3 times more at 12 h (Fig. 4A) and 2.7 times more at 24 h (Fig. 4B) (12 and 24 h:  $P \leq 0.0001$ ). Therefore, the greater intracellular persistence of both SCV strains compared to the WT and  $\Delta 720$  strains over time (Fig. 3) was likely to be attributed to a lower toxicity of the SCVs to MAC-T cells (Fig. 4).



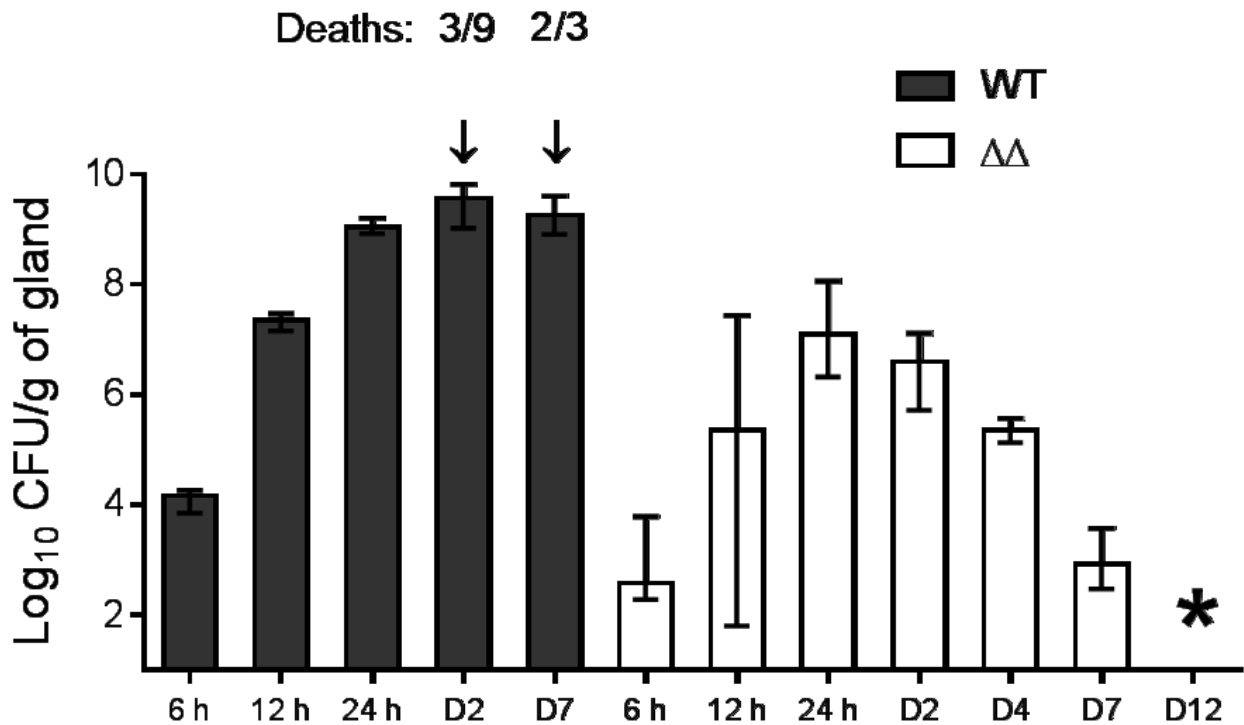
**FIG. 4.** Viability of MAC-T cells infected by *S. aureus* ATCC 29213 (WT) and isogenic mutants. MAC-T cells were infected with each of the four strains for 3h, then were incubated with lysostaphin for 12 h (A) or 24 h (B). MTT viability assays were then performed as described in materials and methods. The results are reported as percent viability relative to uninfected cells and are expressed as the mean with SD of three independent experiments done in triplicate. Statistical significance with ( $\Phi$ ) symbol are compared to the WT (Two-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test: \* or  $\Phi$ :  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ;  $\Phi\Phi\Phi\Phi$ :  $P \leq 0.0001$ ).

Taken together, results from the BMEC infection assays provided evidence of an additive effect of both  $\Delta hemB$  and  $\Delta 720$  mutations for the attenuation of the WT strain; the SACOL720 mutation mainly lowering the intracellular bacterial load and the *hemB* mutation creating the SCV phenotype that increases MAC-T cells viability.

### **$\Delta 720\Delta hemB$ double mutant is strongly attenuated in a mouse IMI model and is efficiently cleared from mammary glands**

To attest the attenuation of  $\Delta 720\Delta hemB$  in an *in vivo* model of infection, the virulence of the double mutant was evaluated and compared to the WT strain in a murine IMI model. For both strains, the exponential phase of infection took place mainly within the first 12 h post-infection, while the maximal bacterial burden was reached at 24 h for the double mutant and 48 h (day 2 [D2]) for the WT strain (Fig. 5). At 24 h, the double mutant showed a reduction of 1.9 log<sub>10</sub> in mean CFU/g of gland compared to WT ( $P \leq 0.05$ ). Also after 24 h, the mutant bacterial burden showed a constant decline until complete bacterial clearance was reached at day 12 (shown by the asterisk on Fig. 5). In contrast, the parental strain provoked severe invasive infections compared to the mutant, killing 3 of 9 remaining mice at day 2 and 2 of 3 mice at day 7 (Fig. 5; arrows) before glands could be harvested for those groups. Mice surviving the WT infection maintained high viable counts (9 log<sub>10</sub> CFU/g of gland) at day 7, an approximate 5 log<sub>10</sub> difference in bacterial burden compared to the double mutant. These results clearly demonstrate a markedly reduced capacity of strain  $\Delta 720\Delta hemB$  to multiply and survive in the mammary gland.

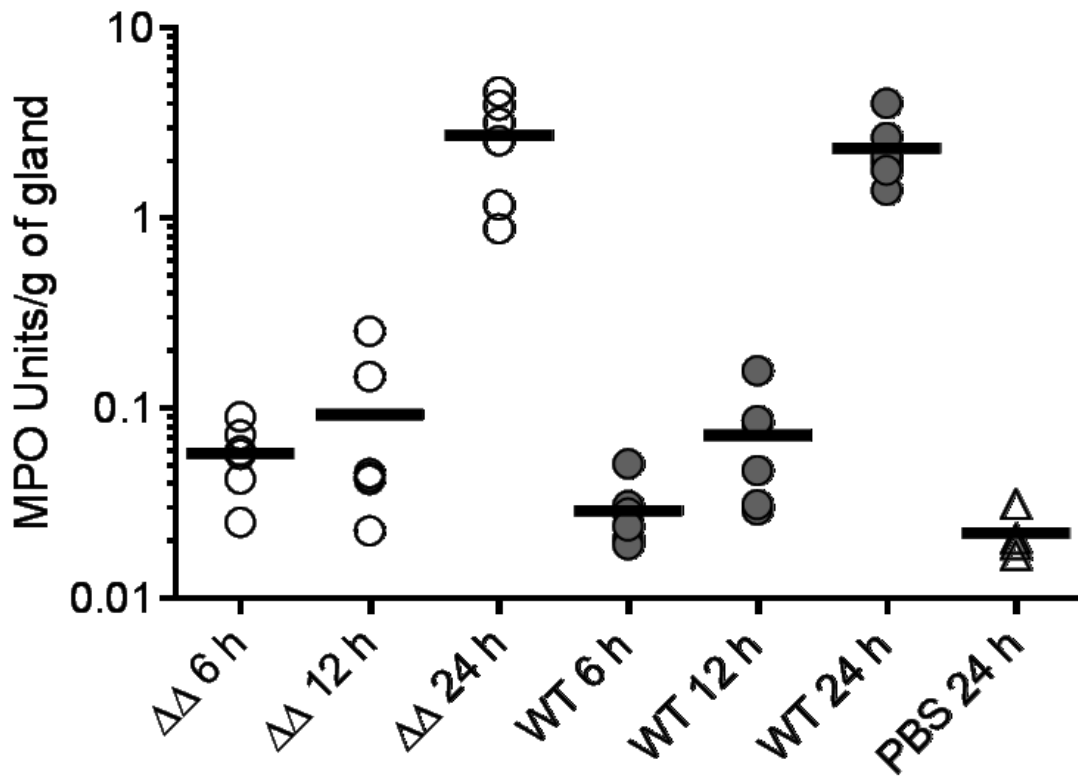




**FIG. 5.** Murine IMIs with the parental (WT) and  $\Delta hemB\Delta 720$  ( $\Delta\Delta$ ) strains. Mice were infected as previously described and glands harvested at the indicated hour (h) or day (D) after infection. Each column represents the median value of bacterial CFU counts for a group of glands, and ranges are indicated by bars. A minimum of six glands/group were used except for the WT strain at D7 (2 glands: only one mouse survived). Mortality of mice at specific time points is indicated by arrows. The asterisk indicates the clearance of  $\Delta hemB\Delta 720$  from glands (below the detection limit of 10 CFU/gland).

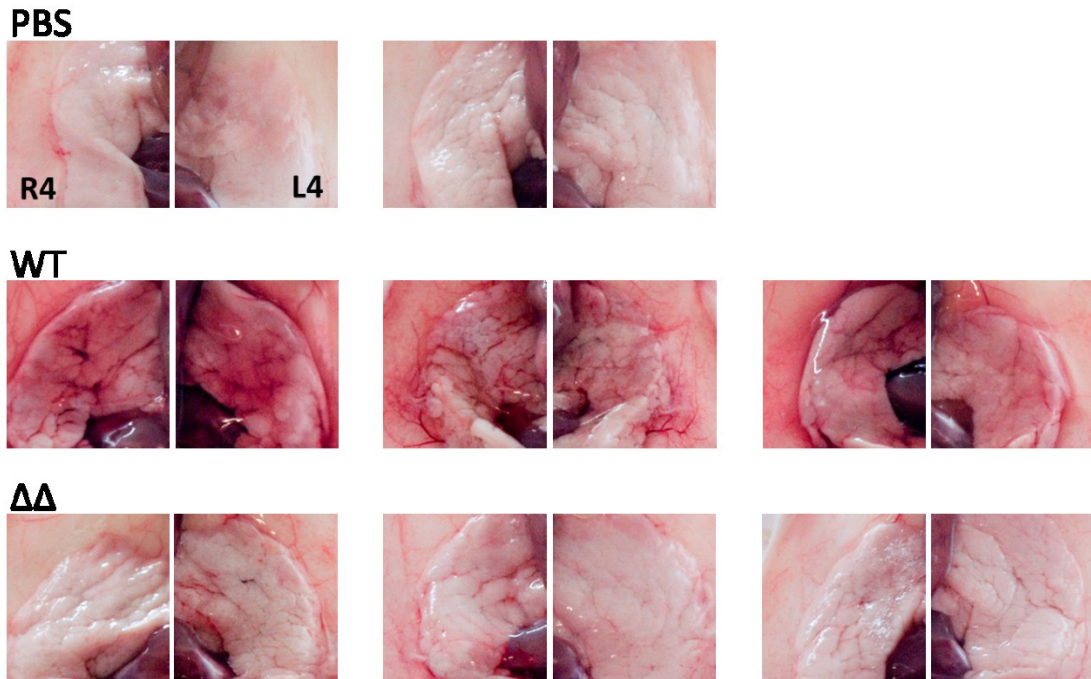
#### **Inflammatory response to $\Delta 720\Delta hemB$ and WT strains following IMI**

To monitor the inflammatory response of the mice to infections with WT and mutant strains, neutrophil infiltration in glands was evaluated by the MPO enzymatic activity of total protein extracts of gland homogenates. MPO activity in biological samples has previously been strongly correlated with absolute number of neutrophils (65), and is thus a suitable marker for the inflammatory response.



**FIG. 6.** Double mutant ( $\Delta 720\Delta hemB$ ) stimulates neutrophil influx in mammary glands to similar levels compared to WT in the first 24 hours following infection. Mice were infected as described in materials and methods, and a control group (PBS) of mice received a sterile PBS injection. Glands were harvested at indicated times, homogenized and kinetically assayed for MPO activity as described in materials and methods. Each dot represents MPO Units for one gland, which is shown as raw values adjusted by gram of gland. Means are represented by thick lines.

During the first hours after infection, neutrophil recruitment followed similar profiles for the double mutant and WT infected glands (Fig. 6), with exponential intensification of apparent neutrophil infiltration from 12 h to 24 h post infection coinciding with bacterial growth albeit with a certain delay. We previously showed that the absolute numbers of polymorphonuclear cells in relation to the bacterial load in mammary glands does not always peak at the same time (9). No significant difference in MPO activity could be observed at 6, 12 and 24 h between glands infected by mutant and WT strains (Fig.6). This equivalence in apparent neutrophil infiltration did not however correlate with the visual observation of inflammation at 24 h, at which point the WT infection generated extensive redness of infected glands in comparison to the double mutant (photographs of Fig. 7). On the contrary, mutant infected glands were not visually altered on the macroscopic level compared to PBS controls. The disparity between visual assessment of inflammation and neutrophil infiltration results could be attributed to the differences in bacterial loads (Fig. 5) and the cytotoxic activity of the WT strain (Fig. 4), and could be coherent with the highly invasive and disseminative capacity of the strain via toxins and enzymes expression. Hence, these results indicate that neutrophil recruitment in the glands infected by the mutant strain was equivalent to that seen with the WT strain and that this was sufficient to allow a subsequent decline and clearance of the mutant bacterial loads.

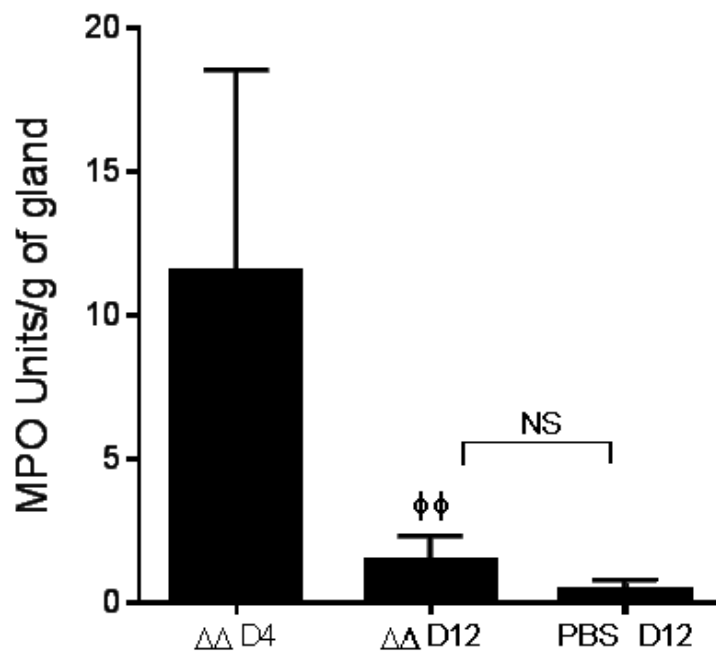


**FIG. 7.** Visual inflammation of the large R4 and L4 mammary glands 24 h after mouse IMI with *S. aureus* ATCC 29213 (WT) and the double mutant  $\Delta 720\Delta hemB$  ( $\Delta\Delta$ ). Mice were infected as described in materials and methods, and control group (PBS) mice received a sterile PBS injection. Pictures show glands that were harvested after 24 h. In each panel, the R4 (left) and L4 (right) glands are shown.

**The inflammatory response of  $\Delta 720\Delta hemB$  infected glands goes back to normal levels with bacterial clearance**

Lastly, to confirm strain safety, keeping in mind the possible use of the double mutant as an attenuated live vaccine, and to assess that this inflammatory response was not consequent to an inadmissible reactogenic strain, we continued monitoring of MPO activity in  $\Delta 720\Delta hemB$  infected glands 4 and 12 days after infection. The level of activity was then compared to levels obtained with PBS injected mice. As illustrated in Fig. 8, the apparent neutrophil presence in mutant infected glands was still high 4 days after infection, with MPO activity ranging from 8 to 21 Units/g of gland. Besides, gland involution, the process by which the lactating gland

returns to a morphologically near pre-pregnant state, is ordinarily associated with neutrophilic recruitment that allows phagocytosis of apoptotic cells during the remodelling of tissue (Stein, 2007). In the days following infection in this model, mouse glands are already in that normal state of modification, as indicated by their rapid shrinking. However, the MPO levels in mutant infected glands went through a substantial decline between day 4 and 12, ( $P \leq 0.01$ ). MPO levels were then considered to be back to a normal level at day 12 showing no significant difference from that obtained with the PBS-injected mice.



**FIG. 8.** Neutrophil infiltration goes back to normal levels after clearance of the double mutant  $\Delta 720\Delta hemB$ . Mice were infected as described in materials and methods, and a control group (PBS) of mice received a sterile PBS injection. Glands were harvested at the indicated times, homogenized and kinetically assayed for MPO activity as described in materials and methods. Columns represent means of MPO Units of a group of 6 glands (4 for the PBS control) adjusted by gram of gland, and error bars illustrate standard deviation. Statistical significance between the Day 4 and 12 groups post infection is shown by ( $\Phi$ ) symbol. One-Way ANOVA and Tukey's multiple comparison tests were used ( $\Phi\Phi$ : $P \leq 0.01$ ; NS: No significant difference between groups).

## 2.9 DISCUSSION

The ability of *Staphylococcus aureus* to express multiple virulence factors permitting host colonization, tissue destruction, immune evasion, intracellular persistence and biofilm production makes it a very difficult pathogen to combat. Vaccines designed to prevent *S. aureus* infection in bovine mastitis have been studied for many years, but have so far been unsuccessful, possibly due to the diversity of strains recovered from IMIs, the complexity of pathogenesis, and the lack of protective antigens or suitable vaccine delivery vehicles (35, 41, 42).

Our previous approach has been to identify genes that are highly expressed by multiple *S. aureus* strains *in vivo* and are thus more likely to have an importance in virulence. These genes should be good targets as vaccination agents or in drug development. In a previous study, we used DNA microarray transcriptional analysis to uncover *S. aureus* genes that were highly expressed by several strains in an experimentally induced bovine IMI (1). The *S. aureus* operon *vraFG* (SACOL0718-720) was among several genes overexpressed by *S. aureus* in the mammary gland environment (1).

The operon *vraFG* codes for an ABC transporter-like system with a probable role in antibiotic resistance (15, 34, 39) and in resistance to cationic antimicrobial peptides (CAMPs) such as indolicidin isolated from bovine neutrophils (17, 36), human cathelicidin LL-37 (31) or Class I bacteriocins nisin A and nukacin ISK-1 (28). It is noteworthy that *vraFG* was shown not only to be under the regulation of the two-component regulatory system *graRS*, but also to play an essential role in sensing the presence of CAMPs and signaling through *graS* to activate *graR*-dependent transcription which includes its own transcript (17). Moreover, *vraFG* does not act as a detoxification module as previously believed (39) as it cannot confer resistance when produced on its own (17). It was also reported that the expression of two key determinants, *mprF* and *dlt*, needed for modification of the bacterial net surface charge, are dependent on *graXRS-vraFG* and are the direct effectors responsible for making overall surface charge less

negative (39). When this system is altered, an increased susceptibility to cationic peptides is observed (66).

Our previous studies revealed that gene SACOL0720 was up-regulated in both fresh milk *in vitro* and in milk recovered from infected cows. But of greater significance, this gene was shown to be a key factor in *S. aureus* virulence in cows since a  $\Delta 720$  mutant was greatly attenuated in an experimental bovine IMI (1). Consequently, we used the mutation in SACOL0720 to further attenuate an SCV-based live vaccine. In order to attest the effect of both genes, we compared single *hemB* and  $\Delta 720$  mutants to the double mutant and WT strains on their ability to infect BMEC in culture and in an IMI model in mice.

This study is the first one, to our knowledge, to consider the use of SCVs as the foundation of a non-virulent, attenuated live vaccine for the intracellular delivery of *S. aureus* key antigens. Live attenuated strains of *S. aureus* have been of great interest for a long time and have been studied for immunization of cows since the 80s (63). Some teams have managed to use attenuation by chemical mutagenesis (49, 50) to elicit high specific humoral response in cows, but unfortunately this caused only weak reduction in shedding of bacteria and no difference in reduction of SCC in milk when vaccinated groups were challenged. Also, the genetic basis for the attenuation of this strain was unknown which can be a real concern considering necessity to obtain a stable and safe vaccine. In a similar study in mice, transposon mutagenesis was used to generate an aromatic amino acid auxotrophic *aroA* mutant of *S. aureus* and to obtain interesting results in the mouse IMI model (14). Both Th1 and Th2 responses were elicited and a certain degree of protection was observed against homologous and heterologous *S. aureus*. The mutant was also demonstrated safe in leukopenic mice in a model of nasal colonization (5) but immunogenicity in cows is unknown.

Intramammary infection of dairy cows with *S. aureus* SCVs, in this case with a naturally occurring clinical isolate and a genetically stable *hemB* mutant, has previously been compared to their normal phenotype homologous strains for their pathogenicity and immune response stimulation profile in dairy cows (4), but only on a virulence comparison basis.

Our study shows that genetic stabilization of the SCV phenotype, together with inactivation of an important effector of cationic compound susceptibility, was able to generate an attenuated *S. aureus* strain which exhibited low, transient internalization in epithelial cells. Since SCVs are expected to show a high capacity for invasion/persistence (56), the reduction in initial bacterial load post-invasion might be a favorable outcome of the supplementary attenuation of the SCV phenotype by gene SACOL0720 disruption. Indeed, an inappropriately high invasion rate might not be suited for a strain intended to be used as an attenuated vaccine vector, even if low temporary internalization is anticipated to help the stimulation of cell-mediated immunity.

The expected susceptibility of  $\Delta 720$  and especially of the double mutant  $\Delta 720\Delta hemB$  to extracellular positively charged antimicrobials, excreted by epithelial cells in supernatant of cultured cells, might have affected the growth of those mutants prior to internalization, since gene SACOL0720 (*vraG*) is needed to allow the modification of cell wall and membrane net charge. A possible explanation for the greater susceptibility of the double mutant is that the greater effect of *vraG* disruption seen with the SCV phenotype is an additive effect of both mutations.

It is possible that the destabilization of the cell wall residues modification system of the *graXRS-vraFG* regulon via  $\Delta 720$  mutation might be more pronounced in SCVs because of their inexistent membrane potential which is required for the activity of detoxification modules (23).

On the other hand, another possibility is that direct induction of the *graXRS-vraFG* regulon is initiated in response to the specific metabolic state of the SCV phenotype. The greater susceptibility in cultured cells and in mice *in vivo* would then be a consequence of the inability to express a gene that might be required to support the metabolic deficiency of SCVs. In other words, *graXRS-vraFG* might be key regulators of the stress response in the SCV expression profile.

The well-known alternative transcription factor sigma B (*SigB*) is known to affect the expression of several genes encoding virulence factors and stress-response systems specific to SCVs (43). This regulator is permanently active in *hemB* mutants (57) and was shown to play



a role in virulence by increasing biofilm production and the intracellular persistence of SCVs (43). Since *SigB* is recognized as an important regulator of bacterial environmental stress responses (25), it is possible that *vraG* acts as an effector of the SCVs specific response via *SigB* or another mechanism linked to SCV metabolic deficiency such as *PhoU*. *PhoU* is a global negative regulator that regulates genes involved in central carbon metabolism and cytochrome expression that provides strong links to the electron transport type of SCVs (53). In *S. aureus*, *phoU* has been found to be important for resistance to cationic antimicrobial peptides (47) and has been shown to regulate *dlt*. Also, *graSR* TCS was shown to control stress response and cell wall metabolism signal transduction pathways (18). Therefore, *graXRS-vraFG* may be another important regulator of the stress response that helps SCVs or normal phenotypes to resist hostile host environments and allow full virulence, as seen in experimental IMI (1). Consequently, the overexpression of SACOL0720 in cows and milk could be explained by the presence of host defense factors in milk that trigger these resistance mechanisms in *S. aureus* during infection. Interactions between the two regulators and specific factors responsible for the over-attenuation of the double  $\Delta 720\Delta hemB$  mutant will be important aspects to investigate in future studies.

Besides intracellular internalization changes, both SCV strains caused significantly less bovine mammary epithelial cell disruption in contrast to the wild-type and  $\Delta 720$  strains as anticipated. The reduction of expression of dissemination virulence factors, such as hemolysin- $\alpha$  (46) or other toxins, is probably the cause for the decrease in the cytotoxicity of SCVs, thus permitting longer survival within cells. Nevertheless, the precise mechanisms by which invasive *S. aureus* strains do (and SCVs do not) kill epithelial cells are not completely understood, and could be attributed to both induction of apoptotic pathways and/or pore-forming related lysis (52, 56).

One of the prominent results of this study hinges on the high attenuation of virulence that was attained with the double mutant in mouse IMI. Since the parental strain was able to generate highly invasive infections and considerable mortality in this model, the 5-log<sub>10</sub> difference of CFU/g of glands followed by the total bacterial clearance from the glands by the double mutant was regarded as a highly significant alteration of virulence. As seen previously with

the lower MAC-T internalization, the overall susceptibility to extracellular milieu both in cell culture conditions and in mice might be exacerbated with the double mutant. The double mutant strain also showed an ability to stimulate a neutrophil recruitment in the gland that was sufficient to allow progressive decline of bacterial loads. Most importantly, this inflammatory response was not associated with tissue destruction (unlike the wild-type) and was efficiently lowered to normal levels after bacterial clearance.

This proinflammatory response is the first indicator of the potential immunogenicity of the strain that will have to be assessed in future studies. An over-attenuated vaccine, with poor metabolic fitness and survival in glands, might not have been able to survive and provoke strong immune cell recruitment at the infection site. These preliminary results showing its ability to stimulate the immune system are therefore the first suggestions of the potential capacity of  $\Delta 720\Delta hemB$  to generate adaptive immunity.

These interesting results in mice reveal promising perspectives for the use of the double mutant strain for development of a protective vaccine against *S. aureus* IMIs. However, other immunization routes, such as subcutaneous injections, or another mucosal route like intranasal inoculation, could be used instead of IMI to stimulate immunity, and should be evaluated in mice. In this regard, it had previously been demonstrated that intramammary but not intraperitoneal application of live attenuated *S. aureus* can stimulate murine mucosal responses against challenge with homologous virulent strain (22). Even if the  $\Delta 720\Delta hemB$  mutant is to be used for key antigen delivery as a live vector, immunogenicity and protection of the strain should be further examined, since it might already help stimulate cell mediated immunity on its own, with its ability to mimic natural infection. However, expression of key antigens of *S. aureus* by this vector might help the triggering of a more specific, concentrated response to important virulence factors that is more likely to offer real protection.

## 2.10 ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Natural Science and Engineering Research Council of Canada, Alberta Milk, Dairy Farmers of New Brunswick, Nova Scotia, Ontario and Prince Edward Island, Novalait Inc., Dairy Farmers of Canada, Canadian Dairy Network, AAFC, PHAC, Technology PEI Inc., Université de Montréal and University of Prince Edward Island through the Canadian Bovine Mastitis Research Network. This research was also supported by NSERC discovery grants to F. Malouin and B. Talbot.

## 2.11 REFERENCES

1. **Allard, M., C. Ster, C. L. Jacob, D. Scholl, M. S. Diarra, P. Lacasse, and F. Malouin.** 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**:761–70.
2. **Atalla, H., C. Gyles, and B. Mallard.** 2010. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (S. aureus SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol. Elsevier B.V.* **143**:319–28.
3. **Atalla, H., C. Gyles, and B. Mallard.** 2011. *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs) and their role in disease. *Anim. Health Res. Rev.* **12**:33–45.
4. **Atalla, H., C. Gyles, B. Wilkie, K. Leslie, and B. Mallard.** 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**:326–34.
5. **Barbagelata, M. S., L. Alvarez, M. Gordiola, L. Tuchscher, C. von Eiff, K. Becker, D. Sordelli, and F. Buzzola.** 2011. Auxotrophic mutant of *Staphylococcus aureus* interferes with nasal colonization by the wild type. *Microbes Infect.* **13**:1081–90.
6. **Bharathan, M., and I. K. Mullarky.** 2011. Targeting mucosal immunity in the battle to develop a mastitis vaccine. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **16**:409–19.

7. **Bischoff, M., P. Dunman, J. Kormanec, E. Murphy, W. Mounts, S. Projan, D. Macapagal, and B. Berger-ba.** 2004. Microarray-Based Analysis of the *Staphylococcus aureus*  $\sigma$  B Regulon. *J. Bacteriol.* **186**:4085–4099.
8. **Bradley RD Rothstein, G, P. P. C.** 1982. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* **60**:618–622.
9. **Brouillette, E., G. Grondin, B. G. Talbot, and F. Malouin.** 2005. Inflammatory cell infiltration as an indicator of *Staphylococcus aureus* infection and therapeutic efficacy in experimental mouse mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **104**:163–9.
10. **Brouillette, E., and F. Malouin.** 2005. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes Infect.* **7**:560–8.
11. **Brouillette, E., A. Martinez, B. J. Boyll, N. E. Allen, and F. Malouin.** 2004. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **41**:35–41.
12. **Brückner, R.** 1997. Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**:1–8.
13. **Buzzola, F. R., L. P. Alvarez, L. P. N. Tuchscher, M. S. Barbagelata, S. M. Lattar, L. Calvino, and D. O. Sordelli.** 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infect. Immun.* **75**:886–91.
14. **Buzzola, F. R., M. S. Barbagelata, R. L. Caccuri, and D. O. Sordelli.** 2006. Attenuation and persistence of and ability to induce protective immunity to a *Staphylococcus aureus aroA* mutant in mice. *Infect. Immun.* **74**:3498–506.
15. **Cui, L., J. Lian, and H. Neoh.** 2005. DNA microarray-based identification of genes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. agents* **49**:3404–3413.
16. **Detmer, A., and J. Glenting.** 2006. Live bacterial vaccines—a review and identification of potential hazards. *Microb. Cell Fact.* **12**:1–12.
17. **Falord, M., G. Karimova, A. Hiron, and T. Msadek.** 2012. GraXSR proteins interact with the VraFG ABC transporter to form a five-component system required for cationic antimicrobial peptide sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:1047–58.

18. **Falord, M., U. Mäder, A. Hiron, M. Débarbouillé, and T. Msadek.** 2011. Investigation of the *Staphylococcus aureus* GraSR Regulon Reveals Novel Links to Virulence, Stress Response and Cell Wall Signal Transduction Pathways. *PLoS One* **6**:e21323.
19. **Ferens, W. A., and G. A. Bohach.** 2000. Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: superantigens and internalization by host cells. *J. Lab. Clin. Med.* **135**:225–30.
20. **Foster, T. J.** 2009. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. *Vet. Dermatol.* **20**:456–70.
21. **Fowler, V. G., and R. A. Proctor.** 2014. Where does a *Staphylococcus aureus* vaccine stand? *Clin. Microbiol. Infect.* **20 Suppl 5**:66–75.
22. **García, V., M. Gómez, M. Iglesias, N. Sanjuan, M. Gherardi, M. C. Cerquetti, and D. Sordelli.** 1996. Intramammary immunization with live-attenuated *Staphylococcus aureus*: microbiological and immunological studies in a mouse mastitis model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **14**:45–51.
23. **Gaupp, R., N. Ledala, and G. A. Somerville.** 2012. Staphylococcal response to oxidative stress. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**:33.
24. **Griffiths, K. L., and S. A. Khader.** 2014. Novel vaccine approaches for protection against intracellular pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* Elsevier Ltd **28**:58–63.
25. **Horsburgh, M. J., J. L. Aish, I. J. White, J. K. Lithgow, S. J. Foster, and L. Shaw.** 2002.  $\sigma$ B Modulates Virulence Determinant Expression and Stress Resistance: Characterization of a Functional *rsbU* Strain Derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J. Bacteriol.* **184**:5457–5467.
26. **Kafala, B., and A. Sasarman.** 1997. Isolation of the *Staphylococcus aureus* *hemCDBL* gene cluster coding for early steps in heme biosynthesis. *Gene* **199**:231–9.
27. **Kawada-Matsuo, M., and Y. Yoshida.** 2011. Role of two-component systems in the resistance of *Staphylococcus aureus* to antibacterial agents. *Virulence* **2**:427–430.
28. **Kawada-Matsuo, M., Y. Yoshida, T. Zendo, J. Nagao, Y. Oogai, Y. Nakamura, K. Sonomoto, N. Nakamura, and H. Komatsuzawa.** 2013. Three distinct two-component systems are involved in resistance to the class I bacteriocins, Nukacin ISK-1 and nisin A, in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **8**:e69455.

29. **Kerro-Dego, O., T. Prysliak, A. A. Potter, and J. Perez-Casal.** 2006. DNA-protein immunization against the GapB and GapC proteins of a mastitis isolate of *Staphylococcus aureus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **113**:125–38.
30. **Kollaritsch, H., S. J. Cryz, A. B. Lang, C. Herzog, J. U. Que, and G. Wiedermann.** 2000. Local and systemic immune responses to combined *Vibrio cholerae* CVD103-HgR and *Salmonella typhi* ty21a live oral vaccines after primary immunization and reimmunization. *Vaccine* **18**:3031–9.
31. **Kraus, D., S. Herbert, S. A. Kristian, A. Khosravi, V. Nizet, F. Götz, and A. Peschel.** 2008. The GraRS regulatory system controls *Staphylococcus aureus* susceptibility to antimicrobial host defenses. *BMC Microbiol.* **8**:85.
32. **Kreiswirth, B. N., S. Löfdahl, M. J. Betley, M. O'Reilly, P. M. Schlievert, M. S. Bergdoll, and R. P. Novick.** 1983. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* **305**:709–12.
33. **Kubica, M., K. Guzik, J. Koziel, M. Zarebski, W. Richter, B. Gajkowska, A. Golda, A. Maciag-Gudowska, K. Brix, L. Shaw, T. Foster, and J. Potempa.** 2008. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One* **3**:e1409.
34. **Kuroda, M., K. Kuwahara-Arai, and K. Hiramatsu.** 2000. Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**:485–90.
35. **Leitner, G., O. Krifucks, M. D. Kiran, and N. Balaban.** 2011. Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol. Elsevier B.V.* **142**:25–35.
36. **Li, M., D. J. Cha, Y. Lai, A. E. Villaruz, D. E. Sturdevant, and M. Otto.** 2007. The antimicrobial peptide-sensing system aps of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **66**:1136–47.
37. **Lin, L., A. S. Ibrahim, X. Xu, J. M. Farber, V. Avanesian, B. Baquir, Y. Fu, S. W. French, J. E. Edwards, and B. Spellberg.** 2009. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathog.* **5**:e1000703.
38. **Löffler, B., L. Tuchscher, S. Niemann, and G. Peters.** 2013. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. *Int. J. Med. Microbiol. Elsevier GmbH.*

39. **Meehl, M., S. Herbert, F. Götz, and A. Cheung.** 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**:2679–89.
40. **Merino, N., A. Toledo-Arana, M. Vergara-Irigaray, J. Valle, C. Solano, E. Calvo, J. A. Lopez, T. J. Foster, J. R. Penadés, and I. Lasa.** 2009. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **191**:832–43.
41. **Middleton, J. R.** 2008. *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development for humans and dairy cattle. *Expert Rev. Vaccines* **7**:1–11.
42. **Middleton, J. R., C. D. Luby, and D. S. Adams.** 2009. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data. *Vet. Microbiol.* **134**:192–8.
43. **Mitchell, G., A. Fugère, K. Pépin Gaudreau, E. Brouillette, E. H. Frost, A. M. Cantin, and F. Malouin.** 2013. SigB is a dominant regulator of virulence in *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *PLoS One* **8**:e65018.
44. **Mitchell, G., G. Grondin, G. Bilodeau, A. M. Cantin, and F. Malouin.** 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- $\kappa$ B. *Infect. Immun.* **79**:3541–51.
45. **Mitchell, G., C.-A. Lamontagne, E. Brouillette, G. Grondin, B. G. Talbot, M. Grandbois, and F. Malouin.** 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**:1540–55.
46. **Moisan, H., E. Brouillette, and C. Jacob.** 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.
47. **Overton, I. M., S. Graham, K. A. Gould, J. Hinds, C. H. Botting, S. Shirran, G. J. Barton, and P. J. Coote.** 2011. Global network analysis of drug tolerance, mode of action and virulence in methicillin-resistant *S. aureus*. *BMC Syst. Biol. BioMed Central Ltd* **5**:68.
48. **Pasetti, M. F., J. K. Simon, M. B. Sztein, and M. M. Levine.** 2011. Immunology of gut mucosal vaccines. *Immunol. Rev.* **239**:125–48.

49. **Pellegrino, M., J. Giraud, C. Raspanti, R. Nagel, L. Odierno, V. Primo, and C. Bogni.** 2008. Experimental trial in heifers vaccinated with *Staphylococcus aureus* avirulent mutant against bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **127**:186–90.
50. **Pellegrino, M., J. Giraud, C. Raspanti, L. Odierno, and C. Bogni.** 2010. Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. *Vaccine* **28**:4523–8.
51. **Proctor, R. A.** 2012. Challenges for a universal *Staphylococcus aureus* vaccine. *Clin. Infect. Dis.* **54**:1179–86.
52. **Proctor, R. A., C. von Eiff, B. C. Kahl, K. Becker, P. McNamara, M. Herrmann, and G. Peters.** 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:295–305.
53. **Proctor, R. A., A. Kriegeskorte, B. C. Kahl, K. Becker, B. Löffler, and G. Peters.** 2014. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**:1–8.
54. **Pulli, B., M. Ali, R. Forghani, S. Schob, K. L. C. Hsieh, G. Wojtkiewicz, J. J. Linnoila, and J. W. Chen.** 2013. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. *PLoS One* **8**:e67976.
55. **Reyher, K. K., S. Dufour, H. W. Barkema, L. Des Côteaux, T. J. Devries, I. R. Dohoo, G. P. Keefe, J.-P. Roy, and D. T. Scholl.** 2011. The National Cohort of Dairy Farms: a data collection platform for mastitis research in Canada. *J. Dairy Sci. Elsevier* **94**:1616–26.
56. **Sendi, P., and R. A. Proctor.** 2009. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol.* **17**:54–8.
57. **Senn, M. M., M. Bischoff, C. Von Eiff, B. Berger-bächi, and B. Berger-ba.** 2005.  $\sigma$  B Activity in a *Staphylococcus aureus hemB* Mutant. *J. Bacteriol.* **187**:7397–7406.
58. **Spellberg, B., and R. Daum.** 2012. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Semin. Immunopathol.* **34**:335–48.
59. **Ster, C., M. Allard, S. Boulanger, M. Lamontagne Boulet, J. Mulhbacher, D. a Lafontaine, E. Marsault, P. Lacasse, and F. Malouin.** 2013. Experimental treatment of *Staphylococcus aureus* bovine intramammary infection using a guanine riboswitch ligand analog. *J. Dairy Sci. Elsevier* **96**:1000–8.



60. **Sutra, L., and B. Poutrel.** 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **40**:79–89.
61. **Tuchscherr, L., V. Heitmann, M. Hussain, D. Viemann, J. Roth, C. von Eiff, G. Peters, K. Becker, and B. Löffler.** 2010. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J. Infect. Dis.* **202**:1031–40.
62. **Tuchscherr, L., E. Medina, M. Hussain, W. Völker, V. Heitmann, S. Niemann, D. Holzinger, J. Roth, R. a Proctor, K. Becker, G. Peters, and B. Löffler.** 2011. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol. Med.* **3**:129–41.
63. **Watson, D. L.** 1984. Evaluation of attenuated, live staphylococcal mastitis vaccine in lactating heifers. *J. Dairy Sci.* **67**:2608–13.
64. **Whist, A. C., O. Osterås, and L. Sølverød.** 2009. Association between isolation of *Staphylococcus aureus* one week after calving and milk yield, somatic cell count, clinical mastitis, and culling through the remaining lactation. *J. Dairy Res.* **76**:24–35.
65. **Xia, Y., and J. L. Zweier.** 1997. Measurement of Myeloperoxidase in Leukocyte-Containing Tissues. *Anal. Biochem.* **245**:93–96.
66. **Yang, S.-J., A. S. Bayer, N. N. Mishra, M. Meehl, N. Ledala, M. R. Yeaman, Y. Q. Xiong, and A. L. Cheung.** 2012. The *Staphylococcus aureus* Two-Component Regulatory System, GraRS, Senses and Confers Resistance to Selected Cationic Antimicrobial Peptides. *Infect. Immun.* **80**:74–81.
67. **Zecconi, A., R. Piccinini, and L. K. Fox.** 2003. Epidemiologic study of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* during a control program in nine commercial dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **223**:684–8.
68. **Zhang, C., J. Yang, and L. K. Jennings.** 2004. Non – Leukocyte-Derived Reactive Oxygen Species. *Diabetes* **53**:2950–2959.

## CHAPITRE III

### DISCUSSION GENERALE

Cette étude s'inscrit dans un effort élargi de recherche de stratégies efficaces pour combattre le pathogène chronique *Staphylococcus aureus*. Dans le contexte bien particulier des infections intramammaires chez le bovin, un vaccin protecteur prendrait toute son importance alors que l'utilisation d'antibiotiques est plus ou moins adaptée au type d'infection que provoque *S. aureus*, soit des mammites sous-cliniques très contagieuses qui restent trop longtemps imperceptibles. Les producteurs laitiers doivent également utiliser l'antibiothérapie avec parcimonie pendant la période de lactation, car aucun lait de vache sous traitement ne peut être commercialisé. De plus, l'antibiothérapie couramment utilisés dépasse rarement 50% de succès contre *S. aureus* et s'avère particulièrement inefficace pendant la période lactante.

Bien que de nombreux essais et formules de vaccination aient été développés contre les IIMs causées par *S. aureus*, un seul vaccin récent (Startvac®, Hipra) a été commercialisé et homologué pour cet usage en Europe. Vu la mise en marché récente de ce vaccin, peu d'information n'est encore disponible sur son efficacité réelle. Selon une très récente étude, un certain effet positif de la vaccination contre les nouvelles mammites à *S. aureus* et aux staphylocoques à coagulase négative (CNS) sur deux fermes (Schukken et al., 2014) aurait été observé. La vaccination aurait pu permettre une réduction modérée de l'incidence de nouvelles IIMs aux staphylocoques et une réduction plus marquée de la durée totale des IIMs. Ce vaccin est composé d'une souche de *S. aureus* pouvant produire le *slime associated antigenic complex* (SAAC) (une souche constituant une minorité parmi celles pouvant causer la maladie) et d'une souche de *E. coli* (J5), toutes deux tuées. Ce vaccin inactivé n'est donc possiblement pas efficace pour obtenir une réponse immunitaire balancée (bactéries tuées) ni permettre de réponse ciblée vers des antigènes protecteurs (souches non représentatives de la population réelle sur le terrain). Cela pourrait expliquer le manque d'effet protecteur et de résultats convaincants obtenus contre les souches de terrain lors de cette étude. On peut donc

sérieusement mettre en doute la validité de ces premiers résultats pour justifier l'utilisation systématique de ce vaccin par les producteurs.

Ainsi, dans la perspective de développer un mode de vaccination susceptible de conférer une protection via l'activation d'une immunité à médiation cellulaire (IMC) plus équilibrée, ce projet a pu remplir son principal objectif qui était la conception d'une souche atténuée de SA pour la vaccination contre les IIMs. L'hypothèse étant que l'on peut utiliser le phénotype SCV comme base principale d'atténuation, cette étude a pu effectivement faire la démonstration qu'une souche atténuée à capacité intracellulaire pouvait être obtenue à partir de SCVs génétiquement stables. Par l'utilisation d'une souche vaccinale se voulant une imitation la plus fidèle possible du pathogène lorsqu'il établit des infections chroniques et persistantes, il est cohérent de penser que l'on puisse augmenter les chances d'éliciter le type de réponse nécessaire pour une meilleure protection.

Pourtant, certains aspects importants des SCVs devaient être pris en compte. Malgré leur tendance à causer des infections non-invasives, les SCVs sont associés à un potentiel de virulence bien présent, et une persistance plus accrue (Kalinka et al., 2014; Proctor et al., 2006; Mitchell et al., 2013; Atalla et al., 2010). Ceci peut être principalement attribué à leur capacité rapide de réversion au phénotype normal, leur permettant ainsi de se disséminer et causer des infections invasives lorsque les conditions le permettent. Il est important de bien saisir que ce problème n'est pas constitué d'un évènement unique de réversion à éviter : il est maintenant bien établi que la réversion fait partie intégrante du processus dynamique et normal des infections de *S. aureus* (Tuchscher et al., 2011; Proctor et al., 2014). La réversion est une stratégie permettant à *S. aureus* de mener deux modes de «vie» en même temps chez son hôte, offrant au pathogène la possibilité de maintenir à la fois des populations invasives pour la dissémination et d'un même front des populations SCV résistant aux antibiothérapies et assauts du système immunitaire.

En obtenant des SCVs stables par délétion complète du gène *hemB*, on permettait de dégager le risque de réversion. Les expériences de caractérisation de la souche atténuée de ce projet

tout comme plusieurs études citées dans la littérature (Moisan et al., 2006; Senn et al., 2005; Atalla et al., 2009) ont effectivement pu démontrer que cette mutation était stable *in vitro et in vivo*. Également, en plus de démontrer que la mutation dans le gène *hemB* conférant le phénotype SCV était à la fois utile pour permettre la survie intracellulaire et une destruction moindre des cellules épithéliales en culture, cette étude a pu faire la démonstration qu'une inactivation de SACOL0720 (*vraG*) réduisait les charges bactériennes internalisées. Ainsi, ces résultats ont pu renforcer la démonstration que cette souche était utilisable à titre de vaccin, car elle n'aurait pas de tendance à sur-envahir les cellules.

Également, la preuve de concept de l'utilisation d'une telle souche a grandement été renforcée à la lumière des résultats obtenus chez la souris. La nette atténuation du double mutant par rapport à sa souche isogénique parente a pu être confirmée à la fois visuellement dans les premières heures suivant l'infection et à plus long terme par des comptes bactériens significativement plus bas. L'élimination complète de la souche via le recrutement efficace de cellules immunitaires de la réponse innée a pu faire à la fois la démonstration de son innocuité chez la souris et révéler de premiers indices quant à sa possible immunogénicité. L'équilibre délicat entre atténuation et immunogénicité est en effet l'un des défis les plus grands du développement de vaccins atténués efficaces (Galen et Curtiss, 2014).

Dans l'optique d'augmenter la protection contre les IIMs, les antigènes ciblés autant que le mode de vaccination (illustré par la présente étude) faisaient partie de la stratégie globale de développement de vaccin du laboratoire Malouin. L'importance de l'association cohérente de ces deux aspects est bien illustrée dans l'exemple de Startvac® utilisé un peu plus haut. Dans un même ordre d'idée, un problème supplémentaire mis en évidence dans les prémisses conceptuelles de ce vaccin nouvellement homologué est que la majorité des souches responsables des mammites bovines à *S. aureus* ne sont pas capables de produire le SAAC. Hors, on a souvent soulevé que le choix d'une cible adéquate, présente *in vivo* lors de l'IIM et chez plusieurs souches (Middleton, 2008) est une condition essentielle qui devrait être prise en compte avant même de décider du type de vaccination et de la voie d'administration.

Tel que brièvement évoqué antérieurement dans ce document, l'équipe du Pr. Malouin a utilisé cette stratégie en mettant en évidence 36 gènes de *S. aureus* exprimés de façon importante et soutenue chez plusieurs vaches et par différentes souches au cours d'IIMs expérimentales (Allard et al., 2013), donc réellement utilisés pendant la virulence de *S. aureus*. Cette analyse transcriptomique s'inscrivait dans la perspective de trouver des cibles adéquates pour combattre *S. aureus*, notamment par la vaccination. On a même pu mettre en évidence l'importance dans la virulence de deux de ces gènes, dont SACOL0720 lors d'une IIM expérimentale avec le mutant de délétion  $\Delta 720$ , qui fut nettement atténué chez la vache (Allard et al., 2013) et a démontré son importance dans l'infection de cellules en culture et chez la souris dans la présente étude.

Ceux-ci, avec quatre autres gènes surexprimés *in vivo*, ont récemment été testés sous forme de vaccin protéique sous-unitaire (Tableau 1) pour leur capacité de protection chez la vache laitière (Ster et al., 2014). Le vaccin a pu induire une forte réponse contre les six antigènes chez les vaches vaccinées, à différentes intensités selon l'antigène. Les vaches vaccinées ont également montré un CCS significativement inférieur comparativement aux vaches du groupe témoin suite au *challenge*. La prochaine étape du vaccin sous-unitaire réside dans l'essai de vaccination à grande échelle d'un troupeau pour déterminer l'efficacité de protection de nouvelles infections naturelles du vaccin.

En parallèle, dans la perspective d'exploiter d'autres modes de vaccination pour protéger contre ces antigènes clés, la souche vivante développée dans le cadre de la présente étude pourra être utilisée à titre de vecteur vivant pouvant les surexprimer *in situ* lors de sa colonisation transitoire de l'hôte. À ce jour, plusieurs souches de bactéries atténuées comme *Salmonella enterica* Typhi (Shata et al., 2000; Roland et Brennenman, 2013) et non pathogènes comme les bactéries lactiques (Asensi et al., 2013) ont été développés en tant que vaccins atténués homologues ou vecteurs antigéniques vivants, et offrent la possibilité intéressante d'exploiter la livraison intracellulaire ou encore l'administration mucoale pour développer des réponses plus complètes, susceptibles de conférer une immunité protectrice contre les pathogènes intracellulaires ou chroniques.

**Tableau 1.** Antigènes utilisés dans le vaccin sous-unitaire.

Antigène <sup>a</sup>	Fonction	Localisation <sup>b</sup>	Taille (a.a.)	Partie utilisée (a.a.)
SACOL0029	HMG-CoA synthase	cytoplasmique	55	1-55
SACOL0442	possible entérotoxine	extracellulaire	203	44-203
<b>SACOL0720</b>	ABC transporteur-like ( <i>vraG</i> )	membranaire	629	309-455
SACOL1867	Sérine protéase ( <i>spIC</i> )	extracellulaire	239	40-239
SACOL1912	G-6-P isomerase ( <i>csb33</i> )	extracellulaire	199	1-199
SACOL2385	famille des HSP20	inconnue	142	1-142

<sup>a</sup>Noms issus des ORF du génome de *S. aureus* COL

<sup>b</sup>Localisation prédite: <http://www.psорт.org/psортb/>

Maintenant que l'innocuité de la souche chez la souris a pu être démontrée, de prochains travaux seront mis en route pour construire par clonage des vecteurs de surexpression de ces antigènes clés afin de transformer la souche atténuée en vecteur antigénique. Des constructions permettant la surexpression de certains des antigènes issus du vaccin sous-unitaire, sous contrôle d'un promoteur constitutif et adaptés pour l'expression chez les Gram positifs sont déjà en cours de développement. Le vaccin final pourra ainsi être composé d'un mélange constitué de souches atténuées  $\Delta 720\Delta hemB$  transformées par un vecteur permettant la surexpression d'un antigène par souche. La réponse induite par ces vaccins vivants sera comparée à celle induite par la souche atténuée seule ou les antigènes sous forme sous-unitaire, ainsi que par la souche atténuée tuée.

Plusieurs voies d'administration du vaccin pourront être mises à l'essai, notamment en raison de la période de lactation courte chez la souris. En effet, puisque plusieurs immunisations seront nécessaires (une première, suivie d'un rappel à au moins une semaine d'intervalle), il pourrait être envisagé de faire la première immunisation par une injection intramusculaire

(i.mu), puis une seconde intramammaire (i.ma). À cet égard, l'équipe de Buzzola ayant mis à l'essai la souche atténuée *aroA* (2006) précédemment décrite ont utilisé deux injections i.ma, la première une semaine avant la mise bas, et la seconde une semaine après la première. Cette double injection i.ma pourrait être envisagée pour étudier la réponse élicitée par le vaccin, mais sera difficile si un *challenge* avec une souche virulente de SA est utilisé par la suite pour vérifier le niveau de protection. L'équipe de Buzzola a effectué un challenge intramammaire 14 jours après la seconde immunisation, alors que la glande de souris est déjà en processus d'involution (Stein et al., 2007). Nous avons pu observer cet aspect dans la présente étude alors que les glandes maintenues jusqu'à 12 jours post-infection subissaient une involution et étaient nettement plus petites que lors du jour suivant l'infection (un passage de l'ordre de 1,22 g de glande à 0,26 g pour les souris contrôles injectées au PBS). L'utilisation d'un *challenge* suivant le modèle d'IIM murin à cette période est donc questionnable.

Cette étude, en plus d'atteindre son objectif principal qui était de démontrer qu'une souche atténuée de *S. aureus* basée sur un SCV stable est exploitable pour la vaccination, ouvre la porte à la prochaine étape du projet de développement d'un vaccin protecteur contre les IIMs à *S. aureus* : l'utilisation de cette souche atténuée comme vecteur vivant d'antigènes modifiés. Au-delà de cette réalisation offrant de multiples perspectives d'essais de formulations du vaccin vivant chez la souris, nous pourrons en outre procéder à l'étude approfondie des interactions entre le système de régulation *graXRS-vraFG* et le phénotype SCV mises en évidence lors de ce projet.

## CHAPITRE IV

### CONCLUSION

Cette étude a ainsi contribué aux premières étapes de développement d'une nouvelle forme de vaccination qui permettra d'atténuer l'impact sérieux dans l'industrie qu'ont les infections intramammaires de *Staphylococcus aureus* chez le bovin laitier. Puisque la chronicité et la persistance du pathogène ont démontré être les causes principales de la problématique de la mammite à l'instar de plusieurs autres contextes d'infection, ce nouveau mode de vaccination se devait de prendre en compte les plus récentes connaissances sur les stratégies utilisées par *S. aureus* pour persister chez l'hôte mammifère. Le maintien de sous-populations SCVs utilisées dans un processus global d'infection par *S. aureus* est l'une de ces stratégies maintenant mieux comprises qui pouvaient être exploitées pour le combattre.

Ce projet a pu effectivement faire la démonstration que l'on peut tirer avantage des caractéristiques particulières du phénotype SCV de *S. aureus* et les utiliser comme base de construction d'un vaccin vivant atténué par génie génétique. Par l'utilisation d'une souche se voulant une imitation la plus fidèle possible du pathogène dans son contexte d'infection persistante, les chances de stimuler le type de réponse adapté pour le combattre se voient augmentées.

L'utilisation de cette souche atténuée pour délivrer des composantes antigéniques importantes dans la virulence du pathogène pour l'obtention d'une réponse à la fois forte, soutenue et ciblée est la prochaine étape qui permettra de confirmer la preuve de concept d'un tel mode de vaccination contre *S. aureus*. Puisque ce type de vaccination a pu faire ses preuves contre d'autres pathogènes à intracellulaire, il va sans dire que cela constituerait une nouvelle corde à notre arc de combat contre la chronicité de *S. aureus*. Une caractérisation approfondie des réponses humorale et cellulaire induites par cette livraison antigénique ciblée permettra aussi de tester et sélectionner la voie d'administration du vaccin la plus adéquate pour la protection efficace contre les infections intramammaires.



Cette étude a également pu mettre en relief certaines interactions intéressantes entre le phénotype SCV et le système à deux composantes *graXRS*, un système de régulation important pour l'adaptation au stress antimicrobien présent lors du séjour de *S. aureus* dans le milieu singulier que constitue la glande mammaire. Ces interactions se sont trouvées responsables d'un effet additif ou synergique qui a entraîné la forte atténuation de la souche vaccinale *in vitro* et chez la souris. Il est maintenant évident que l'aspect multifactoriel de la virulence de *S. aureus* repose principalement sur sa polyvalence d'expression de facteurs, si bien régulée, et sur une adaptation presque parfaite à son hôte. Par la compréhension toujours un peu plus précise du fonctionnement de sa pathogénèse et des modulations transcriptionnelles importantes dont il fait preuve en passant d'un environnement à l'autre, il est manifeste que nous approchons pas à pas de l'objectif de mieux contrôler ce pathogène si élitif et problématique.

Chez les animaux comme chez l'humain, l'approfondissement des connaissances actuelles sur l'immunité induite par *S. aureus* lors des infections chroniques sera probablement un facteur clé permettant les prochains progrès en vaccination. L'étude des interactions entre cette réponse de l'hôte et les stratégies utilisées par le pathogène pour échapper à celle-ci pourront certainement bientôt nous aiguiller sur les bases nécessaires du développement d'une immunité protectrice.

## BIBLIOGRAPHIE

- Allard, M., Moisan, H., Brouillette, É., Gervais, A. L., Jacques, M., Lacasse, P., Diarra, M. S., and 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., and 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, 761–70
- Asensi, G. F., de Sales, N. F. F., Dutra, F. F., Feijó, D. F., Bozza, M. T., Ulrich, R. G., Miyoshi, A., de Moraes, K., Azevedo, V. A. D. C., Silva, J. T., et al. (2013). Oral immunization with *Lactococcus lactis* secreting attenuated recombinant staphylococcal enterotoxin B induces a protective immune response in a murine model. *Microb. Cell Fact.* 12, 32. doi:10.1186/1475-2859-12-32.
- Atalla, H., Gyles, C., Jacob, C. L., Moisan, H., Malouin, F., and Mallard, B. (2008). Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. *Foodborne Pathog. Dis.* 5, 785–99.
- Atalla, H., Gyles, C., and Mallard, B. (2010). Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 143, 319–28.
- Atalla, H., Gyles, C., Wilkie, B., Leslie, K., and 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, 326–34
- Bar, D., Tauer, L. W., Bennett, G., González, R. N., Hertl, J. a, Schukken, Y. H., Schulte, H. F., Welcome, F. L., and Gröhn, Y. T. (2008). The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming. *J. Dairy Sci.* 91, 2205–14.
- Becker, P., Noerder, M., and Guzmán, C. (2008). Genetic immunization: bacteria as DNA vaccine delivery vehicles. *Hum. Vaccin.* 4(3), 189–202.
- Bharathan, M., and Mullarky, I. K. (2011). Targeting mucosal immunity in the battle to develop a mastitis vaccine. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16, 409–19.

- Bronner, S., Monteil, H., and Prévost, G. (2004). Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 183–200
- Brouillette, E., Lacasse, P., Shkreta, L., Bélanger, J., Grondin, G., Diarra, M. S., Fournier, S., and Talbot, B. G. (2002). DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 20, 2348–57.
- Brouillette, E., Martinez, A., Boyll, B. J., Allen, N. E., and Malouin, F. (2004). Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41, 35–41.
- Bruhn, K. W., Craft, N., and Miller, J. F. (2007). *Listeria* as a vaccine vector. *Microbes Infect.* 9, 1226–1235.
- Buzzola, F. R., Barbagelata, M. S., Caccuri, R. L., and 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, 3498–506. doi:10.1128/IAI.01507-05.
- Castagliuolo, I., Piccinini, R., Beggiao, E., Palù, G., Mengoli, C., Ditadi, F., Vicenzoni, G., and Zecconi, A. (2006). Mucosal genetic immunization against four adhesins protects against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Vaccine* 24, 4393–402.
- Cebra, C. K., Garry, F. B., and Dinsmore, R. P. (1996). Naturally occurring acute coliform mastitis in Holstein cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 10, 252–7.
- Chang, B. S., Moon, J. S., Kang, H.-M., Kim, Y.-I., Lee, H.-K., Kim, J.-D., Lee, B.-S., Koo, H. C., and 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, 2081–91.
- Cui, J.-C., Hu, D.-L., Lin, Y.-C., Qian, A.-D., and Nakane, A. (2005). Immunization with glutathione S-transferase and mutant toxic shock syndrome toxin 1 fusion protein protects against *Staphylococcus aureus* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45, 45–51.
- Cui, J.-C., Zhang, B.-J., Lin, Y.-C., Wang, Q.-K., Qian, A.-D., Nakane, A., Hu, D.-L., and 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.
- DeLeo, F. R., and Otto, M. (2008). An antidote for *Staphylococcus aureus* pneumonia? *J. Exp. Med.* 205, 271–4.

- Descôteaux, L. (2004). La mammitte clinique : stratégies d 'intervention. Symposium sur les bovins laitiers 2004, Saint-Hyacinthe, QC
- Detmer, A., and Glenting, J. (2006). Live bacterial vaccines—a review and identification of potential hazards. *Microb. Cell Fact.* 12, 1–12.
- Dietrich, G., Griot-Wenk, M., Metcalfe, I. C., Lang, A. B., and Viret, J.-F. (2003). Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine* 21, 678–83.
- Dinsmore, R. P. (2002). Biosecurity for mammary diseases in dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 18, 115–31.
- Dwivedy, A., and Aich, P. (2011). Importance of innate mucosal immunity and the promises it holds. *Int. J. Gen. Med.* 4, 299–311.
- Von Eiff, C., Heilmann, C., Proctor, R. A., Woltz, C., Peters, G., and Go, F. (1997). A Site-Directed *Staphylococcus aureus hemB* Mutant Is a Small-Colony Variant Which Persists Intracellularly. *J. Bacteriol.* 179, 4706–4712.
- Falord, M., Karimova, G., Hiron, A., and Msadek, T. (2012). GraXSR proteins interact with the VraFG ABC transporter to form a five-component system required for cationic antimicrobial peptide sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1047–58.
- Fattom, A. I., Horwith, G., Fuller, S., Propst, M., and Naso, R. (2004). Development of StaphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials. *Vaccine* 22, 880–7.
- Fowler, V. G., and Proctor, R. a (2014). Where does a *Staphylococcus aureus* vaccine stand? *Clin. Microbiol. Infect.* 20 Suppl 5, 66–75.
- Frey, J. (2007). Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine* 25, 5598–605.
- Galen, J. E., and Curtiss, R. (2014). The delicate balance in genetically engineering live vaccines. *Vaccine* 32, 4376–4385.
- Gaudreau, M.-C., Lacasse, P., and Talbot, B. G. (2007). Protective immune responses to a multi-gene DNA vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 25, 814–24
- Gläser, R., Becker, K., von Eiff, C., Meyer-Hoffert, U., and Harder, J. (2014). Decreased Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants toward Human Antimicrobial Peptides. *J. Invest. Dermatol.* 134, 2347–50

- De Gregorio, E., and Rappuoli, R. (2014). From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 505–14.
- Griffiths, K. L., and Khader, S. a (2014). Novel vaccine approaches for protection against intracellular pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* 28, 58–63
- Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., and Kaltsatos, V. (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50, 245–59.
- Gunn, B. M., Wanda, S.-Y., Burshell, D., Wang, C., and Curtiss, R. (2010). Construction of recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine vector strains for safety in newborn and infant mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 354–62.
- Han, H. R., and Park, H. M. (2000). Effects of adjuvants on the immune response of staphylococcal alpha toxin and capsular polysaccharide (CPS) in rabbit. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 237–41.
- Hogan, J. S., Weiss, W. P., Smith, K. L., Todhunter, D. a, Schoenberger, P. S., and Sordillo, L. M. (1995). Effects of an *Escherichia coli* J5 vaccine on mild clinical coliform mastitis. *J. Dairy Sci.* 78, 285–90
- Hogan, J., and Smith, K. L. (2003). Coliform mastitis. *Vet. Res.* 34, 507–519.
- Holmgren, J., and Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med. Suppl.* 11, S45–53.
- Horsburgh, M. J., Aish, J. L., White, I. J., Lithgow, J. K., Foster, S. J., and Shaw, L. (2002).  $\sigma$  B Modulates Virulence Determinant Expression and Stress Resistance : Characterization of a Functional rsbU Strain Derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J. Bacteriol.* 184, 5457–5467
- Hu, D.-L., Omoe, K., Sasaki, S., Sashinami, H., Sakuraba, H., Yokomizo, Y., Shinagawa, K., and Nakane, A. (2003). Vaccination with nontoxic mutant toxic shock syndrome toxin 1 protects against *Staphylococcus aureus* infection. *J. Infect. Dis.* 188, 743–52.
- Kalinka, J., Hachmeister, M., Geraci, J., Sordelli, D., Hansen, U., Niemann, S., Oetermann, S., Peters, G., Löffler, B., and 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.*
- Kerro Dego, O., van Dijk, J. E., and Nederbragt, H. (2002). Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet. Q.* 24, 181–98.

- Kohler, C., Eiff, C. Von, Peters, G., Richard, A., Hecker, M., Engelmann, S., and Proctor, R. A. (2003). Physiological Characterization of a Heme-Deficient Mutant of *Staphylococcus aureus* by a Proteomic Approach. *J. Bacteriol.* 185, 6928–6937.
- Kollaritsch, H., Cryz, S. J., Lang, a B., Herzog, C., Que, J. U., and Wiedermann, G. (2000). Local and systemic immune responses to combined *Vibrio cholerae* CVD103-HgR and *Salmonella typhi* ty21a live oral vaccines after primary immunization and reimmunization. *Vaccine* 18, 3031–9.
- Kovacs-Nolan, J., Mapletoft, J. W., Latimer, L., Babiuk, L. a, and Hurk, S. V. D. L. Den (2009). CpG oligonucleotide, host defense peptide and polyphosphazene act synergistically, inducing long-lasting, balanced immune responses in cattle. *Vaccine* 27, 2048–54.
- Leitner, G., Krifucks, O., Kiran, M. D., and Balaban, N. (2011). Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 142, 25–35.
- Luby, C. D., Middleton, J. R., Ma, J., Rinehart, C. L., Bucklin, S., Kohler, C., and Tyler, J. W. (2007). Characterization of the antibody isotype response in serum and milk of heifers vaccinated with a *Staphylococcus aureus* bacterin (Lysigin). *J. Dairy Res.* 74, 239–46.
- McDermott, A. J., and Huffnagle, G. B. (2014). The microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology* 142, 24–31
- Meehl, M., Herbert, S., Götz, F., and 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, 2679–89
- Middleton, J. R. (2008). *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development for humans and dairy cattle. *Expert Rev. Vaccines* 7, 1–11.
- Middleton, J. R., Luby, C. D., and Adams, D. S. (2009). Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data. *Vet. Microbiol.* 134, 192–8.
- Mitchell, G., Fugère, A., Pépin Gaudreau, K., Brouillette, E., Frost, E. H., Cantin, A. M., and Malouin, F. (2013). SigB is a dominant regulator of virulence in *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *PLoS One* 8, e65018.
- Mitchell, G., Lamontagne, C.-A., Brouillette, E., Grondin, G., Talbot, B. G., Grandbois, M., and 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, 1540–55.

- Mitchell, G., Séguin, D. L., Asselin, A., Déziel, E., Cantin, A. M., Frost, E. H., Michaud, S., and Malouin, F. (2010). *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. 1–15.
- Mitchell, G., Séguin, D. L., Asselin, A., Déziel, E., Cantin, A. M., Frost, E. H., Michaud, S., and Malouin, F. (2010). *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)
- Moisan, H., Brouillette, E., and Jacob, C. (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.
- Olde Riekerink, R. G. M., Barkema, H. W., Kelton, D. F., and Scholl, D. T. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 91, 1366–77
- Van Oostveldt, K., Vangroenweghe, F., Dosogne, H., and Burvenich, C. (2001). Short note Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows. *Vet. Res.* 32, 617–622.
- Osogne, H. D., Angroenweghe, F. V., and Urvenich, C. B. (2002). Review article Potential mechanism of action of J5 vaccine in protection against severe bovine coliform mastitis. *Vet. Res.* 33, 1–12.
- Pader, V., James, E. H., Painter, K. L., Wigneshweraraj, S., and Edwards, A. M. (2014). The Agr quorum-sensing system regulates fibronectin-binding but not hemolysis in the absence of a functional electron transport chain. *Infect. Immun.*, Ahead of print IAI.02254–14–. doi:10.1128/IAI.02254-14.
- Pasetti, M. F., Simon, J. K., Sztejn, M. B., and Levine, M. M. (2011). Immunology of gut mucosal vaccines. *Immunol. Rev.* 239, 125–48
- Pellegrino, M., Giraud, J., Raspanti, C., Nagel, R., Odierno, L., Primo, V., and Bogni, C. (2008). Experimental trial in heifers vaccinated with *Staphylococcus aureus* avirulent mutant against bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 127, 186–90.
- Pellegrino, M., Giraud, J., Raspanti, C., Odierno, L., and Bogni, C. (2010). Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. *Vaccine* 28, 4523–8
- Pereira, U. P., Oliveira, D. G. S., Mesquita, L. R., Costa, G. M., and Pereira, L. J. (2011). Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: a systematic review. *Vet. Microbiol.* 148, 117–24

- Pérez, M. M., Prenafeta, a, Valle, J., Penadés, J., Rota, C., Solano, C., Marco, J., Grilló, M. J., Lasa, I., Irache, J. M., et al. (2009). Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl beta-1,6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. *Vaccine* 27, 2379–86
- Petrovski, K. R., Trajcev, M., and Buneski, G. (2006). A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 77, 52–60.
- Pol, M., and Ruegg, P. L. (2007). Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *J. Dairy Sci.* 90, 249–61.
- Proctor, R. a, von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., and Peters, G. (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 295–305.
- Proctor, R. a., Kriegeskorte, A., Kahl, B. C., Becker, K., Löffler, B., and Peters, G. (2014). *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 1–8
- Rainard, P., Cunha, P., Bougarn, S., Fromageau, A., Rossignol, C., Gilbert, F. B., and Berthon, P. (2013). T helper 17-associated cytokines are produced during antigen-specific inflammation in the mammary gland. *PLoS One* 8, e63471
- Rainard, P. R., and Riollet, C. R. (2006). Review article Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37, 369–400
- Reyher, K. K., Dufour, S., Barkema, H. W., Des Côteaux, L., Devries, T. J., Dohoo, I. R., Keefe, G. P., Roy, J.-P., and Scholl, D. T. (2011). The National Cohort of Dairy Farms-a data collection platform for mastitis research in Canada. *J. Dairy Sci.* 94, 1616–26
- Roland, K. L., and Brenneman, K. E. (2013). *Salmonella* as a vaccine delivery vehicle. *Expert Rev. Vaccines* 12, 1033–1045
- Ruegg, P. L. (2003). Investigation of mastitis problems on farms. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19, 47–73
- Salmon, H. (1999). The mammary gland and neonate mucosal immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 143–55.
- Schukken, Y. H., Bronzo, V., Locatelli, C., Pollera, C., Rota, N., Casula, a, Testa, F., Scaccabarozzi, L., March, R., Zalduendo, D., et al. (2014). Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *J. Dairy Sci.* 97, 5250–64



- Seegers, H., Fourichon, C., and Beaudeau, F. (2003). Review article Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *vet* 34, 475–491
- Senn, M. M., Bischoff, M., Eiff, C. Von, Berger-bächi, B., and Berger-ba, B. (2005).  $\sigma$  B Activity in a *Staphylococcus aureus hemB* Mutant. *J. Bacteriol.* 187, 7397–7406.
- Shata, M. T., Stevceva, L., Agwale, S., Lewis, G. K., and Hone, D. M. (2000). Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. *Mol. Med. Today* 6, 66–71.
- Shim, E. H., Shanks, R. D., and Morin, D. E. (2004). Milk loss and treatment costs associated with two treatment protocols for clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 2702–8..
- Spaulding, A. R., Salgado-Pabón, W., Merriman, J. a, Stach, C. S., Ji, Y., Gillman, A. N., Peterson, M. L., and Schlievert, P. M. (2014). Vaccination against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J. Infect. Dis.* 209, 1955–62
- Stein, T., Salomonis, N., and Gusterson, B. a (2007). Mammary gland involution as a multi-step process. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 12, 25–35
- Ster, C., Allard, M., Boulanger, S., Lamontagne Boulet, M., Mulhbacher, J., Lafontaine, D. a, Marsault, E., Lacasse, P., and Malouin, F. (2013). Experimental treatment of *Staphylococcus aureus* bovine intramammary infection using a guanine riboswitch ligand analog. *J. Dairy Sci.* 96, 1000–8
- Ster, C., Allard, M., Côté-Gravel, J., Boulanger, S., Scholl, D., Diarra, M. S., Potter, A., Talbot, B. G., Lacasse, P., and Malouin, F. (2014). Vaccination and Challenge against *Staphylococcus aureus* in Dairy Cows using Antigens That Are Expressed During Bovine Intramammary Infection. *Vet. Microbiol.*
- Suriyaphol, G., Sarikaputi, M., and Suriyaphol, P. (2009). Differential responses of cells from human skin keratinocyte and bovine mammary epithelium to attack by pore-forming *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 491–502.
- Sutra, L., and Poutrel, B. (1994). Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 40, 79–89.
- Therrien, R., Lacasse, P., Grondin, G., and Talbot, B. G. (2007). Lack of protection of mice against *Staphylococcus aureus* despite a significant immune response to immunization with a DNA vaccine encoding collagen-binding protein. *Vaccine* 25, 5053–61.
- Titball, R. W. (2008). Vaccines against intracellular bacterial pathogens. *Drug Discov. Today* 13, 596–600

- Tollersrud, T., Zernichow, L., Andersen, S. R., Kenny, K., and Lund, a (2001). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugate and whole cell vaccines stimulate antibody responses in cattle. *Vaccine* 19, 3896–903.
- Tuscherr, L., Heitmann, V., Hussain, M., Viemann, D., Roth, J., von Eiff, C., Peters, G., Becker, K., and Löffler, B. (2010). *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J. Infect. Dis.* 202, 1031–40.
- Tuscherr, L., Medina, E., Hussain, M., Völker, W., Heitmann, V., Niemann, S., Holzinger, D., Roth, J., Proctor, R. a, Becker, K., et al. (2011). *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol. Med.* 3, 129–41
- Vaudaux, P., Francois, P., Bisognano, C., Kelley, W. L., Lew, D. P., Schrenzel, J., Proctor, R. A., Mcnamara, P. J., and Peters, G. (2002). Increased Expression of Clumping Factor and Fibronectin-Binding Proteins by hemB Mutants of *Staphylococcus aureus* Expressing Small Colony Variant Phenotypes. *Infect. Immun.* 70, 5428–5437.
- Vaudaux, P., Huggler, E., Rhys-Williams, W., Love, W. G., and Lew, D. P. (2011). Extracellular and intracellular bactericidal activities of XF-70 against small-colony variant hemB mutants of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 37, 576–9
- Vesga, O., Groeschel, M. C., Otten, M. F., Brar, D. W., Vann, J. M., and Proctor, R. A. (1996). *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J. Infect. Dis.* 173, 739–42.
- Wang, J. Y., Harley, R. H., and Galen, J. E. (2013). Novel methods for expression of foreign antigens in live vector vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 9, 1558–64
- Watson, D. L. (1984). Evaluation of attenuated, live staphylococcal mastitis vaccine in lactating heifers. *J. Dairy Sci.* 67, 2608–13
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M., and Murphy, K. M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24, 677–88
- Wesson, C. A., Liou, L. E., Todd, K. M., Bohach, A., Trumble, W. R., Bayles, K. W., and Bohach, G. A. (1998). *Staphylococcus aureus* Agr and Sar Global Regulators Influence Internalization and Induction of Apoptosis *Infect. Immun.* 66, 5238–5243.
- Wilson, D. J., Mallard, B. a, Burton, J. L., Schukken, Y. H., and Gröhn, Y. T. (2007). Milk and serum J5-specific antibody responses, milk production change, and clinical effects following intramammary *Escherichia coli* challenge for J5 vaccine and control cows. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 693–9.

- Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Daprà, V., and Piccinini, R. (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb. Pathog.* 40, 177–83
- Zeman, D., Neiger, R., Nietfield, J., Miskimins, D., Libal, M., Johnson, D., Janke, B., Gates, C., and Forbes, K. (1993). Systemic *Pasteurella haemolytica* infection as a rare sequel to avirulent live *Pasteurella haemolytica* vaccination in cattle. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 5, 555–9.

