



PRÉDICTION DES SYMPTÔMES ET DE LA DURÉE  
D'INFECTION DE LA MAMMITE BOVINE CAUSÉE PAR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Par

Sébastien Pichette-Jolette

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, 7 Juin 2017

*7 Juin 2017*

*Le Jury a accepté le mémoire de Monsieur Sébastien Pichette Jolette dans sa version finale.*

*Membres du Jury*

*Professeur François Malouin*

*Directeur de recherche*

*Département de biologie*

*Professeur Jean-Philippe Roy*

*Codirecteur de recherche*

*Université de Montréal*

*Faculté de médecine Vétérinaire*

*Département de sciences cliniques*

*Professeure Carole Beaulieu*

*Présidente rapporteur*

*Département de Biologie*

*Professeur Sébastien Roy*

*Évaluateur interne*

*Département de Biologie*

## SOMMAIRE

La mammite bovine est une inflammation de la glande mammaire causée par un traumatisme ou par une infection. Au Canada, l'agent pathogène le plus souvent retrouvé dans les cas de mammites bovines est *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Cet agent pathogène peut causer des mammites cliniques avec des symptômes graves et apparents, mais il peut aussi provoquer des mammites sous-cliniques ne présentant aucun symptôme. Cette infection engendre des pertes économiques importantes dans le secteur de la production laitière, principalement par le retrait du lait lors d'infection clinique et lorsqu'un antibiotique est utilisé. Il est ainsi important d'apporter de nouveaux outils aux producteurs laitiers pour contrer la mammite bovine. Prédire les symptômes associés à la mammite bovine causée par *S. aureus* pourrait améliorer la gestion des mammites en identifiant rapidement les souches problématiques. Pour ce faire, une caractérisation génotypique et phénotypique de 587 souches de *S. aureus* isolées dans l'ensemble du Canada a été effectuée dans le but de prédire l'apparition de symptômes cliniques et la durée de l'infection.

Les séries d'isolats provenant du même quartier suivi sur une longue période de temps avec la manifestation d'au moins une mammite clinique ont été comparées aux isolats de séries sans aucune mammite clinique. Cette comparaison a été effectuée dans le but de différencier les deux types d'infection selon les caractéristiques de la souche de *S. aureus* impliqués. Les facteurs comparés sont la présence de gènes de virulence (*seg*, *lukM* et *tst*), la formation de biofilm *in vitro* et l'origine clonale des souches de *S. aureus* selon le typage *spa*. Des différences significatives ont été trouvées dans la distribution des types *spa* ( $p=0,018$ ) et la présence du gène *lukM* ( $p=0,009$ ) entre les souches causant des mammites

cliniques ou sous-cliniques. Une régression logistique, qui prend en compte tous les facteurs de la comparaison, a été effectuée. Cela a permis de faire l'importante observation qu'à chaque log additionnel de biofilm, les chances d'avoir des signes cliniques augmentent de 97% ( $p=0,05$ ).

Pour déterminer quels facteurs influençaient la durée de l'infection, chaque facteur a été utilisé individuellement dans des tests d'analyse de survie. Aucun facteur n'est ressorti significatif dans ces tests lorsque pris individuellement, mais lorsque tous les facteurs sont pris en compte dans une régression logistique, quelques différences peuvent être observées. Nous avons déterminé que les types *spa* t529 et t359 ont respectivement 3,5 à 4,5 fois plus de chance de se faire éliminer en comparaison au type *spa* t13401 ( $p = 0,047$  et  $0,019$ ).

De nombreux facteurs ont été corrélés avec les types *spa*, tels que la possession de *seg* par t529 et la formation de biofilm variable selon le type *spa*. Ces résultats tendent à montrer qu'un outil de prédiction pourrait être développé avec une caractérisation plus poussée des types *spa*. L'outil de prédiction pourra alors permettre une meilleure gestion des cas de mammite bovine causés par *S. aureus*.

Mot-clé : *Staphylococcus aureus*, mammite bovine, durée d'infection, type *spa*, biofilm.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier François Malouin, PhD, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire malgré mon cheminement universitaire différent des autres étudiants en maîtrise dans ce laboratoire. Chaque conseil que vous m'avez apporté m'a permis de m'améliorer tout au long de mes études.

J'aimerais remercier Jean-Philippe Roy, DMV, M.Sc., pour son point de vue spécialisé et précis sur la problématique. Sa collaboration a permis au projet de prendre en compte les multiples facettes de la pathologie.

Je désire aussi remercier mes conseillers Carole Beaulieu, PhD, et Sébastien Roy, PhD, pour leur implication dans le projet.

Je tiens à remercier les techniciens de laboratoire Céline Ster, PhD, Eric Brouillette, M.Sc ainsi que tous mes collègues de laboratoire.

Ce projet a été financé par le Réseau Canadien de Recherche sur la Mammite Bovine et la Qualité du Lait (RCRMBQL). De plus, une bourse du regroupement Op+Lait a été octroyée au projet. Sans leur aide le projet n'aurait pas été possible.

## TABLE DES MATIÈRES

Sommaire .....	i
Remerciements .....	iii
Liste des abréviations .....	vi
Liste des Tableaux .....	viii
Liste des Figures .....	ix
CHAPITRE 1 .....	1
INTRODUCTION .....	1
1.1 La mammite Bovine .....	1
1.1.1 L'industrie laitière au Canada .....	1
1.1.2 La mammite clinique .....	2
1.1.3 La mammite sous-clinique .....	3
1.1.4 Traitement de la mammite bovine au Canada .....	4
1.2 Biologie de la lactation .....	9
1.2.1 Anatomie de la glande mammaire .....	9
1.2.2 Mammogenèse et Lactogenèse .....	10
1.3 Staphylococcus aureus .....	13
1.3.1 Généralités .....	13
1.3.2 Superantigènes .....	14
1.3.3 Leucocidine .....	15
1.4 Biofilm .....	16
1.4.1 Facteur SigB et le système Agr .....	17
1.4.2 Les composantes du biofilm .....	19
1.4.3 Modulines phénol-soluble .....	21
1.4.4 Biofilm ica-indépendant .....	22
1.5 Techniques de typage .....	23
1.5.1 L'électrophorèse à gel pulsé (EPGP) .....	23
1.5.2 Multilocus Enzyme Electrophoresis .....	24
1.5.3 Typage spa .....	25
CHAPITRE 2 .....	27
2.1 Article .....	27
2.1.1 Résumé de l'article .....	27
2.2 Contribution .....	28

CHAPITRE 3 .....	63
DISCUSSION .....	63
CONCLUSION .....	66
BIBLIOGRAPHIE.....	67



## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

*Aap* : protéine associée à l'accumulation

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNase : désoxyribonucléase

ADNe : acide désoxyribonucléique externe

AIP : peptide d'autoinduction

AINS : anti inflammatoire non stéroïdien

*altA* : autolysine A

CCS : comptage de cellules somatiques

*clfA* : facteurs d'agrégation A

*clfB* : facteurs d'agrégation B

CMT: *california mastitis test*

CWA: *cell wall anchored*

EPGP : électrophorèse à gel pulsé

*fnBPA* : protéines de liaison au fibrinogène A

*fnBPB* : protéines de liaison au fibrinogène B

*hla* : hémolysine A

*icaADBC* : loci d'adhésion intercellulaire

*lukM*: leucocidine M

MLEE : *mutillocus enzyme electrophoresis*

MLST: *multi-locus sequencing typing*

*nucI*: nucléase 1

PIA : adhésine polysaccharidique intercellulaire

PCR : *polymerase chain reaction*

PSM : moduline phénol-soluble

PLP : protéine de liaison de la pénicilline

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline

*sasG* : protéine de surface G

*sec* : *staphylococcal enterotoxin C*

*seg* : *staphylococcal enterotoxin G*

*sdrC* : protéine C contenant des répétitions sérine-aspartate

*sigB* : facteur sigma B

*spa* : protéine A

sraP : l'adhésine riche en sérine pour thrombocyte

TSCT : toxine du syndrome du choc toxique

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Target genes, primer sequences, expected sizes of amplicons, and PCR conditions.....	37
Tableau 2. <i>spa</i> and strain type distributions, presence of virulence genes and in vitro biofilm production median for the first <i>S. aureus</i> isolate of 353 quarter series. ....	44
Tableau 3. Descriptive comparison of subclinical IMIs and clinical IMIs.....	49

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Système d'activation génique par quorum sensing Agr .....	19
Figure 2. Schéma de l'anatomie d'une glande mammaire bovine.....	10
Figure 3. Boxplots of the biofilm production <i>in vitro</i> for strains of the major <i>spa</i> types.....	47
Figure 2. Kaplan-Meier plots of the survival probability and duration of IMIs (days) for (A) biofilm (B) possession of <i>lukM</i> .....	52
Figure 3. Kaplan-Meier plots of the survival probability and duration of IMIs (days) for (A) the types of samples (first sample of the quarter series), and (B) the major <i>spa</i> types. ....	52

# **CHAPITRE 1**

## **INTRODUCTION**

### 1.1 La mammite Bovine

#### 1.1.1 L'industrie laitière au Canada

L'industrie laitière au Canada représente une industrie d'une valeur de 19,9 milliards de dollars (ÉcoResources, 2016). Le Canada compte 11 280 fermes de production laitière avec près d'un million de vaches laitières en 2016. La majorité des fermes canadiennes sont situées en Ontario (3 731 fermes laitières) et au Québec (5 546 fermes laitières). La plupart des troupeaux sont composés de vaches Holstein (93 %). Plus de 75 % des fermes laitières canadiennes font partie d'un programme de contrôle laitier. La moyenne de production laitière des vaches dans les programmes de contrôle laitier est de 10 043 kg par lactation (période de 305 jours) (Canadian Dairy Commission, 2016).

L'une des problématiques sévères dans le milieu est la propagation d'infections mammaires, communément appelées mammites bovines. Il s'agit d'une inflammation de la glande mammaire causée par une infection et aussi causé parfois par un traumatisme. Les mammites peuvent être sous-divisées en deux catégories : les mammites cliniques et les mammites sous-cliniques. Les mammites bovines occasionne des frais important à l'industrie laitière et menacent la santé des animaux. Au Québec, La mammite clinique engendre des pertes aux producteurs laitiers d'environ 200 à 250 \$ par an par vache (Jérôme Carrier, 2009). Cette perte est principalement due au retrait du lait impropre à la consommation et aux pertes potentielles de lait. Il faut aussi ajouter à la facture le coût des traitements administrés et les frais vétérinaires. Une étude par Riekerink et al. (2008) a évalué l'incidence de la mammite clinique à 23 cas pour chaque 100 vaches en lactation.

### 1.1.2 La mammite clinique

La forme clinique de l'infection de la mammite bovine présente des symptômes visibles et reconnaissables. L'apparence du lait peut être modifiée. Une apparition de grumeaux, de sang et une couleur altérée du lait peuvent être observés. Les grumeaux présents dans le lait sont composés d'une agglomération de protéines et de facteurs immunitaires. Ces grumeaux peuvent bloquer les canaux mammaires et ainsi empêcher le lait de rejoindre la citerne. L'inflammation de la glande mammaire donne une apparence rouge et enflée au pis infecté. Dans des cas plus graves, l'infection peut causer la nécrose de la glande mammaire, une septicémie, et même aller jusqu'à la mort de la bête.

Une étude menée par Reyher et al. (2011) a mené à la collecte de plus de 85 000 échantillons de lait au Canada. Les agents pathogènes les plus souvent détectés dans les cas de mammite bovine étaient *S. aureus* (13 %), *E. coli* (11 %) et des bactéries du genre *Enterococcus* (8 %). L'infection peut aussi se présenter sous une autre forme moins agressive : La mammite sous-clinique.

### 1.1.3 La mammite sous-clinique

La mammite sous-clinique est causée par une infection intramammaire ne donnant aucun signe clinique de sa présence. Cette particularité rend la détection de la mammite sous-clinique plus difficile pour les producteurs laitiers. Une mammite sous-clinique risque ainsi d'être non traitée et facilement propagée dans le troupeau par des manipulations du pis.

Des tests peuvent être effectués pour confirmer la mammite bovine sous-clinique. Le marqueur le plus utilisé pour déterminer si une glande est infectée est le comptage des cellules somatiques (CCS) dans le lait. Les cellules comptées dans ce test comprennent les lymphocytes, les macrophages et les neutrophiles, des cellules immunitaires et aussi les cellules glandulaires dont la présence en trop grande quantité indique une infection. Lorsque le CCS dépasse les 200 000 cellules par ml, la glande mammaire est considérée comme infectée (Royster et Wagner, 2015). Une façon indirecte pour les producteurs laitiers de regarder le CCS est par le *california mastitis test* (CMT). Ce test consiste à faire des prélèvements de lait dans un réceptacle avec 4 compartiments, un pour chaque glande

mammaire de la vache. Il y a ajout d'un réactif dans chaque compartiment. Plus le CCS est élevé, plus le lait devient visqueux et mauve. Cette méthode permet de confirmer rapidement la présence d'inflammation dans les glandes mammaires suspectes.

La présence d'une infection intramammaire peut être aussi détectée par la culture bactérienne d'un prélèvement de lait. Dans l'étude de Reyher et al. (2011), les espèces bactériennes principales dans les cas de mammites sous-cliniques sont les staphylocoques à coagulase négative (SCN), *S. aureus* et des membres du genre des *Corynebacterium*.

#### 1.1.4 Traitement de la mammite bovine au Canada

##### 1.1.4.1 Gestion de la propagation de la mammite bovine

Lorsqu'une infection est détectée, les producteurs ont quelques options de gestion pour réduire la propagation. Tout d'abord, l'utilisation de désinfectants pour les mamelles après chaque traite est fortement conseillée pour éliminer les agents pathogènes contagieux sur la peau des trayons. Plusieurs mesures d'hygiène, telles que changer fréquemment les litières, garder les allées propres et offrir des enclos propres pour le vêlage, peuvent aussi réduire les chances d'acquérir des agents pathogènes de l'environnement. Les vaches



infectées peuvent être traitées à la fin ou séparément pour éviter le transfert des agents pathogènes par l'équipement de traite (Code de pratique, Conseil national pour le soin aux animaux d'élevage, 2009). Bien sûr, ces options n'éradiqueront pas l'agent pathogène au site de l'infection, mais elles réduiront grandement la propagation de l'agent pathogène.

#### 1.1.4.2 Traitement antibiotique de la mammite bovine durant la lactation

Au Canada, les thérapies antibiotiques, toutes raisons confondues, sont principalement administrées de façon systémique, suivies par les formulations injectées de façon intramammaire (Saini et al., 2012). L'usage d'antibiotiques devrait être réservé aux cas qui peuvent en bénéficier. Traiter localement les infections causées par les bactéries Gram négatives n'est pas recommandé. En effet, les infections causées par ces bactéries ont plus de chances de guérison spontanée que les infections causées par des bactéries à Gram positif (Pinzón-Sánchez et Ruegg, 2011). Ainsi, la plupart des antibiotiques développés et administrés pour la mammite bovine ciblent principalement les bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus agalactiae*. La famille d'antibiotiques la plus souvent utilisée est celle des bêta-lactamines. Cette famille cible principalement la protéine de liaison de la pénicilline (PLP). Cette protéine est nécessaire à la formation du peptidoglycane, qui est une composante critique des parois bactériennes (Fisher et al., 2005). Au Canada, les molécules utilisées pour la mammite bovine sont la cloxacilline, l'ampicilline, l'amoxicilline et la pénicilline G combinée avec des antidouleurs (procaïne) ou d'autres agents pour améliorer son efficacité (Novobiocine ou Benzathine). L'arsenal pour combattre la mammite bovine comprend aussi les céphalosporines, qui proviennent aussi de la classe des bêta-lactamines. L'avantage des céphalosporines est qu'elles sont plus résistantes aux enzymes de dégradation (bêta-lactamases) qui rendent inefficaces les bêta-lactamines. La céphapirine et le ceftiofur sont deux antibiotiques de la classe des céphalosporines utilisés pour la mammite bovine. L'une des caractéristiques intéressantes

du ceftiofur est son efficacité accrue contre les bactéries à Gram négatifs, en comparaison avec les autres céphalosporines. Par contre, son activité contre les bactéries à Gram positifs est réduite, comparée aux autres céphalosporines. Les antibiotiques mentionnés plus haut sont les plus utilisés au Canada, mais d'autres antibiotiques peuvent être employés, tels que la pirlimycine, l'érythromycine, les tétracyclines et les sulfonamides en combinaison avec du triméthoprim (Saini et al., 2012).

De nouveaux traitements sont présentement étudiés pour limiter l'usage des antibiotiques. Plusieurs extraits naturels, tels que l'extrait de rose myrtle (*Rhodomyrtus tomentosa*), de giroflier (*Syzygium aromaticum*) et de cannellier (*Cinnamomum zeylanicum*), sont testés pour leur capacité bactéricide contre la mammite bovine (Budri et al., 2015; Mordmuang et Voravuthikunchai, 2015). D'autres traitements visent à utiliser les bactériophages pour éliminer les bactéries nuisibles sans l'usage d'antibiotiques (Porter et al., 2016; Schmelcher et al., 2015).

Les antibiotiques peuvent aussi être utilisés dans d'autres circonstances que le traitement d'infection. En effet, ils peuvent être utilisés en prévention de nouvelles infections intramammaires lors de la période la plus vulnérable de la glande mammaire : le tarissement.

#### 1.1.4.3 Antibiothérapies au tarissement couverture et les alternatives

Le tarissement survient quand le lait n'est plus retiré de la glande mammaire. Cela provoque l'involution de la glande, qui reprend alors une morphologie prégestationnelle. Il n'y a pas de production de lait pendant cette phase. Durant cette période, les producteurs laitiers font usage d'une antibiothérapie, qui consiste à donner une dose d'antibiotiques à toutes les vaches au moment du tarissement. Ce traitement a pour but d'éliminer les infections déjà présentes et de prévenir l'apparition de nouvelles infections (Henderson et al., 2016). L'antibiothérapie au tarissement utilise normalement une plus grande concentration d'antibiotique à longue action, comparée au traitement durant la lactation (Royster et Wagner, 2015). Cette stratégie augmente de façon significative le taux de guérison des infections mammaires (Halasa et al., 2009). Par contre, cette thérapie peut seulement être employée lors du tarissement, car, lors de la lactation, le lait ne peut être vendu avec des résidus d'antibiotique. Par conséquent, le traitement doit être court et nécessiter peu d'antibiotique pour réduire le temps où le lait est contaminé. Les molécules utilisées pour l'antibiothérapie au tarissement sont parfois les mêmes que pour le traitement de l'infection en lactation, mais à plus forte dose et à longue action. Cette utilisation d'antibiotiques de façon universelle sur l'ensemble des vaches en tarissement peut favoriser l'apparition de résistances (Saini et al., 2013). De nouvelles approches sont à l'essai pour réduire l'utilisation d'antibiotiques, par exemple, l'antibiothérapie sélective au tarissement (Cameron et al., 2014). Cette technique consiste à adapter l'antibiothérapie selon les besoins de la vache en tarissement. Tout d'abord, une culture de lait est effectuée directement sur la ferme pour obtenir rapidement le statut de la glande mammaire. Les glandes dans lesquelles le test révèle la présence de bactéries sont traitées avec des antibiotiques au moment du tarissement, tandis que les glandes dans lesquelles aucune croissance bactérienne n'est constatée sont sujettes à l'usage d'un scellant interne (Cameron et al., 2015). Ce dernier a pour but d'offrir une barrière physique contre l'introduction de bactéries et n'a pas de propriété antibiotique. Il a été démontré que l'antibiothérapie et le scellant interne ont la même efficacité pour la prévention des

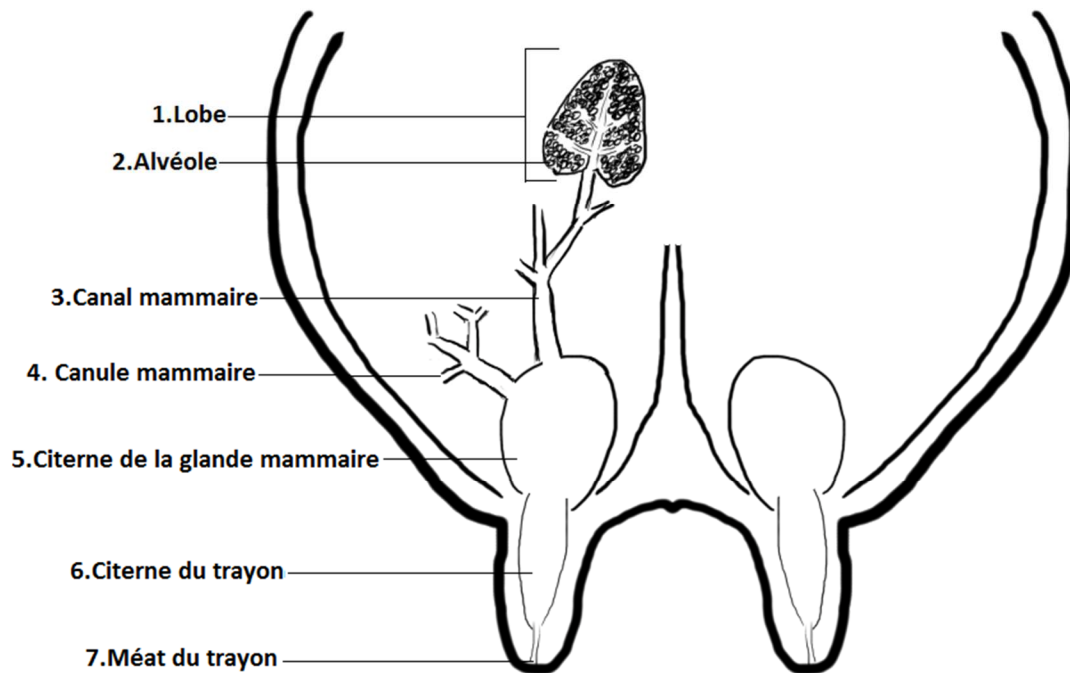
nouvelles infections intramammaire durant le tarissement chez les vaches ayant un CCS bas (M. J. Green, A. J. Bradley, G. F. Medley, 2008).

Un traitement additionnel utilisé en cas de mammite bovine est l'usage d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) pour réduire la douleur et la fièvre chez l'animal ainsi que l'inflammation de la glande mammaire. Les AINS ont démontré leur efficacité pour améliorer la récupération chez l'animal infecté (Vangroenweghe et al., 2005). Par contre, détecter la douleur chez les vaches est une tâche ardue. Les animaux qui ont évolué en tant que proie ne démontrent pas leur faiblesse physique. Ce trait a été sélectionné pour rendre plus difficile pour les prédateurs l'identification des proies faciles. Ce trait est encore présent chez la vache moderne, qui montre peu de signes de douleur. Des sondages chez les producteurs ont démontré que la douleur est souvent sous-estimée lors de mammite bovine, ce qui mène à l'inaction de la part du producteur pour contrer la douleur (Leslie et Petersson-Wolfe, 2012).

## 1.2 Biologie de la lactation

### 1.2.1 Anatomie de la glande mammaire

Le pis de la vache est composé de quatre glandes mammaires regroupées dans la partie inguinale de la vache. L'unité fonctionnelle des glandes mammaires est le lobe (figure 1.1). Celui-ci est sous-divisé en lobules, qui sont composés d'alvéoles (figure 1.2). Ces alvéoles sont recouvertes de cellules épithéliales qui sécrètent le lait. Les lobes déversent le lait par les canules mammaires (figure 1.3), qui sont des branches des canaux mammaires. Les canaux mammaires (figure 1.4) se déversent dans un réservoir nommé la citerne (figure 1.6). La citerne est rattachée à la citerne du trayon. Le lait est éjecté par le méat du trayon (figure 1.7) situé à l'extrémité du trayon.



**Figure 1 : Schéma de l'anatomie d'une glande mammaire bovine.**

### 1.2.2 Mammogenèse et Lactogenèse

Dans son développement embryonnaire, la glande mammaire consiste en un réseau de canules immatures, une citerne reliée à la citerne du trayon et le canal du trayon. Le développement de la glande avance entre chaque cycle œstrogénique pendant la puberté. La production d'œstrogènes provoque une élongation et une ramification du système de canaux mammaires. La maturation du système de canaux mammaires est contrôlée par

l'œstrogène et l'hormone de croissance (GH). La majorité du développement de la glande mammaire se produit pendant la gestation (Capuco et Ellis, 2005). Il y a développement du système de canaux en même temps que la maturation des alvéoles. Cette maturation a besoin de deux hormones pour avoir lieu: la prolactine et la progestérone (Neville et al., 2002). La partie terminale des canules se différencie en alvéole qui sécréteront ultimement le lait.

La lactogénèse se divise en trois stades distincts (Neville et al., 2002). La phase de lactogénèse 1 commence à la moitié de la gestation. Durant cette phase, plusieurs gènes nécessaires à la production de lait sont activés. Il est important de noter que la progestérone empêche la sécrétion du lait à cette étape (Tucker, 2000). La deuxième phase de lactogénèse quelques jours avant le vêlage. Le développement de la glande mammaire se continue à cette étape et mène à la sécrétion du colostrum et, finalement, à la sécrétion du lait. Le colostrum est le premier lait que la vache offre à sa progéniture. Il est très riche et contient des facteurs immunitaires, des hormones, du lactose et des nutriments. Il doit être ingéré par le veau pour que ce dernier acquiert une immunité contre les maladies communes, car le placenta sépare le sang fœtal du sang maternel, ce qui empêche le transfert d'immunoglobulines comme chez les humains (Godden, 2008). La sécrétion de colostrum cesse rapidement après le vêlage.

Suite au vêlage, l'action de la tétée par le veau provoque la dernière vague de développement de la glande mammaire. Pour avoir une bonne éjection du lait, un stimulus de tétée doit être appliqué. Le massage manuel par les employés de la ferme ou par des machines de traite fonctionne aussi bien que la tétée d'un veau. Le stimulus provoque une relâche d'ocytocine. Cette hormone cause la contraction des cellules musculaires présentes dans la glande pour déverser dans les canaux mammaires le lait qui sera acheminé jusqu'à la citerne. Le stimulus de tétée et le retrait du lait de la glande sont nécessaires pour

continuer une lactation normale. En effet, plusieurs des hormones nécessaires à la production de lait sont relâchées pendant la traite (prolactine, ocytocine et hormone corticotrope) (Gorewit, 1988). Le maintien de la production de lait se nomme la galactopoïèse et est considéré comme le dernier stage de la lactation.

Lorsque la production de lait atteint son niveau maximal, la mort programmée des cellules sécrétrices commence, ce qui diminue la quantité de lait produit (Capuco et Ellis, 2005). Ce processus s'accroît et, lorsque le lait n'est plus éjecté, il y a dégénérescence de la glande mammaire. Cette période est appelée l'involution de la glande mammaire et elle serait médiée par un groupe de métalloprotéinases de matrice (Rabot et al., 2007). Le nombre d'alvéoles diminue et les lobules dégénèrent jusqu'à ce que la glande mammaire reprenne une morphologie prégestationnelle. Les structures essentielles des lobules peuvent encore être discernées après l'involution. Le cycle de lactation pourra être effectué de nouveau.



## 1.3 Staphylococcus aureus

### 1.3.1 Généralités

*Staphylococcus aureus* est généralement considéré un agent pathogène à Gram positif nosocomial opportuniste. Cette bactérie est un coque membre de la famille des *Staphylococcaceae*. Il est un organisme aéro-anaérobique facultatif, majoritairement catalase positif. Il peut causer des infections bénignes telles que des infections de la peau, mais peut aussi causer des infections plus graves telles que la septicémie, l'endocardite, l'ostéomyélite et la pneumonie. Il fait aussi partie du microbiote normal chez l'humain. Jusqu'à un tiers des adultes seraient des porteurs asymptomatiques de *S. aureus* dans leur cavité nasale (Golubchik et al., 2013). La présence de *S. aureus* est étudiée dans plusieurs hôtes tels que les humains (Bush et al., 2015; Miko et al., 2013), le bétail (Cremonesi et al., 2015; Gomez et al., 2015; Peeters et al., 2015; van Duijkeren et al., 2015) et les animaux sauvages (Traversa et al., 2015).

La majorité des publications sur *S. aureus* se concentre sur les souches de *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM). La méthicilline est considérée comme un traitement de dernier recours et son inefficacité est alarmante. Il y a maintenant 17 fois plus d'infections au SARM répertorié dans les milieux hospitaliers qu'en 1995 (Faires et al., 2013).

### 1.3.2 Superantigènes

Les superantigènes sont une classe de toxine qui possède des propriétés très nuisibles pour les hôtes infectés. Ils ont en commun au moins deux capacités : elles sont superantigéniques et pyrogéniques. La superantigénicité est la capacité d'engendrer des réactions immunitaires non spécifiques (Dinges et al., 2000). Cela signifie que les superantigènes forcent la liaison entre les cellules T et les complexes majeurs d'histocompatibilité II. Cette liaison mène à la prolifération des cellules T, qui sécréteront une grande quantité de cytokines. Cette relâche incontrôlée de cytokine aura pour conséquence de provoquer un choc septique (Proft et Zealand, 2003). Les superantigènes, tels que les entérotoxines staphylococciques et la toxine du syndrome du choc toxique (TSCT), peuvent être présents chez des souches d'origine bovine (Haveri et al., 2007).

Les entérotoxines staphylococciques peuvent causer des empoisonnements alimentaires et sont associées à des infections dans les systèmes de santé (Mitra et al., 2013). La TSCT peut causer de la fièvre, l'hypotension et la mort (Andrey et al., 2010).

Dans l'étude de Veh et al. (2015), les entérotoxines staphylococciques G, N et C (*seg*, *sen* et *sec*) ont été étudiées pour déterminer la persistance des souches de mammite bovine. La possession du gène *seg* réduisait de 66 % les chances de persistance dans les échantillons

de mammite bovine sous-clinique durant la lactation. Une combinaison des gènes *seg* et *sec* réduisait les chances de persister de 69% dans les échantillons de mammite bovine sous-clinique durant la lactation. Dans cette étude, la possession du gène pour la TSCT (*tst*) était associée à la mammite clinique.

### 1.3.3 Leucocidine

Les leucocidines sont une classe de toxines qui a pour rôle d'affecter les facteurs immunitaires capables de phagocytose tels que les neutrophiles, les monocytes et les macrophages. Ces toxines sont généralement formées de deux sous-unités : les sous-unités S et F. La sous-unité S permet la liaison à un récepteur membranaire des cellules immunitaires. La sous-unité F a pour but de former un pore dans la membrane de la cellule pour causer son apoptose (Barrio et al., 2006). Dans le cas des souches de mammite bovine, une leucocidine particulière est adaptée pour les facteurs immunitaires bovins. Cette leucocidine se nomme la leucocidine F/M'. Elle est retrouvée dans 27 – 86 % des souches d'origine bovine (Fromageau et al., 2010). Une étude par Vrieling et al. (2015) a déterminé que cette leucocidine cible spécifiquement le récepteur CCR1, qui est très abondant chez les cellules immunitaires bovines en comparaison aux cellules immunitaires humaines.

Dans l'article d'Haveri et al. (2007), lorsque certaines souches étaient exclues de leur analyse, la possession du gène *lukM* était associée avec des mammites cliniques modérées

et sévères, ainsi qu'à une persistance accrue des infections. Si les souches étaient ajoutées à l'analyse, la présence de *lukM* était toujours associée à des mammites cliniques, mais celles-ci étaient considérées comme non persistantes. Il est aussi important de noter que les leucocidines ne peuvent engendrer d'inflammation par elles-mêmes (Fromageau et al., 2011).

#### 1.4 Biofilm

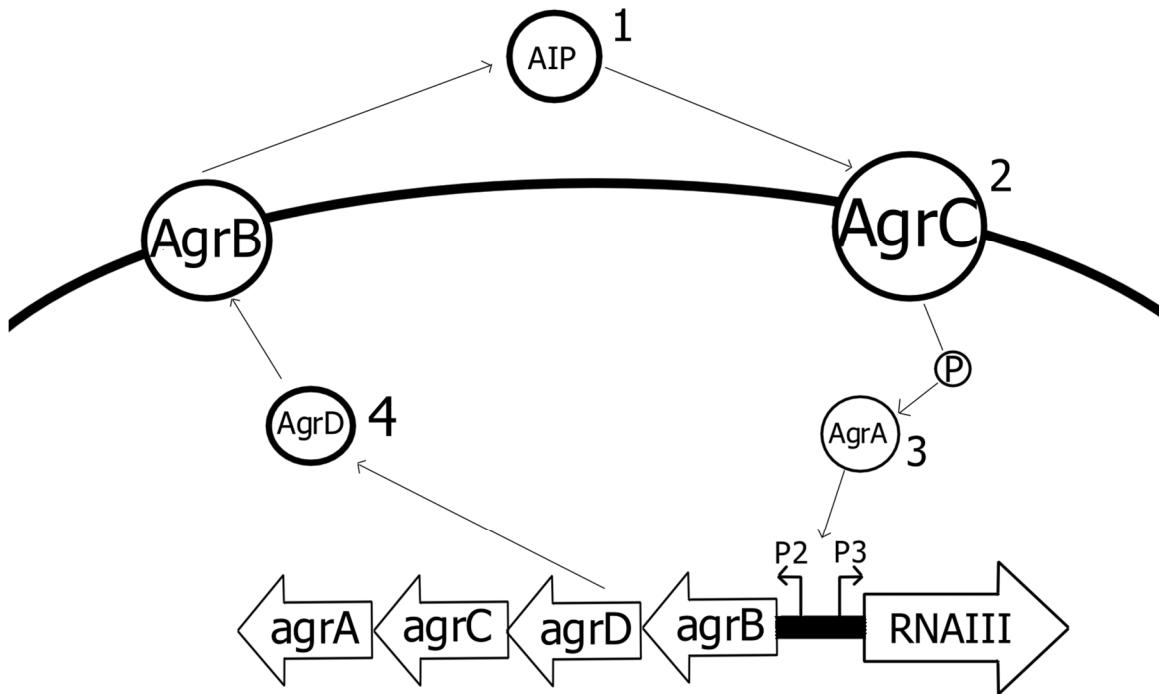
Le biofilm est une matrice extracellulaire qui protège une communauté bactérienne des facteurs externes. La formation du biofilm permet ainsi d'accroître la résistance aux différents stress environnementaux. Sur les surfaces abiotiques, elle offre une résistance aux forces appliquées, évite le dessèchement de la colonie et permet aussi de préserver la colonie plus longtemps durant les périodes où les nutriments se font plus rares (Otto, 2013). Les implants médicaux et les cathéters sont des surfaces abiotiques sur lesquelles le biofilm facilite la propagation de l'agent pathogène (Ferreira et al., 2012). Sur les surfaces biotiques, le biofilm augmente la résistance au flux laminaire et protège contre les facteurs immunitaires et les antibiotiques. Le mode de croissance en biofilm rend les bactéries de 10 à 1000 fois moins susceptibles aux antibiotiques en comparaison du mode de croissance planctonique (Davies, 2003). L'élaboration d'un biofilm par les bactéries demande une coordination fine de la régulation génique et une collaboration entre plusieurs protéines aux rôles variés.

Le cycle de formation d'un biofilm commence par l'adhésion à la surface, suivie par une maturation du biofilm avec la croissance de la colonie. La population atteint un seuil critique où le biofilm commence à se disséminer pour recommencer le cycle de biofilm ailleurs (Otto, 2013). Les systèmes de régulation du biofilm seront abordés en premier, suivis par la présentation des composantes importantes du biofilm.

#### 1.4.1 Facteur SigB et le système Agr

La formation d'un biofilm est un processus complexe qui utilise une myriade de systèmes de régulation. L'un des systèmes de régulation importants pour la formation d'un biofilm est celui du facteur *sigB*. Lorsqu'il est relâché, ce facteur augmente l'expression des gènes des protéines d'adhésion telles que les protéines de liaison au fibrinogène A et B (*fnBPA* et *fnBPB*) et diminue l'expression de protéines excrétées comme la nucléase 1 (*nuc1*) et hémolysine A (*hla*) au début de la phase exponentielle. L'absence de *sigB* réduit grandement l'habileté de *S. aureus* à former son biofilm (Rachid et al., 2000). Le facteur *sigB* est aussi activé lors de stress environnemental et lorsque le niveau d'énergie est bas. Ce facteur est normalement lié à sa protéine chaperonne RbsW. Cette dernière reste liée au facteur *sigB* en gardant son facteur antagoniste, RbsV, phosphorylé. Sous certaines conditions, la protéine RbsV est déphosphorylée par la protéine RsbU ou RsbP. La protéine RbsV peut alors se lier à la protéine chaperonne RbsW pour ultimement relâcher le facteur *sigB*. Ce facteur de régulation est étroitement en balance avec un autre système de régulation important pour la formation du biofilm: le système Agr.

Le système Agr est un système d'expression génétique important pour la sécrétion d'exoprotéines et la dissémination du biofilm. Il s'active à la moitié de la phase exponentielle et continue dans les phases subséquentes (Novick, 2003). Il s'agit d'un système avec une activation par *quorum sensing*, donc plus la population est élevée, plus il y aura activation du système. La boucle d'activation commence lorsque le peptide d'autoinduction (AIP) se lie au récepteur AgrC. Il y a alors phosphorylation du facteur AgrA, qui agit comme un signal intracellulaire et va se lier aux promoteurs P2 et P3. L'activation du promoteur P3 produit la *RNAIII*, qui augmente la transcription de protéines excrétées, tout en diminuant l'expression de la majorité des protéines de surface (Novick, 2003). Le promoteur P2 active les gènes de toutes les protéines essentielles au système Agr, soit AgrA, AgrB, AgrC et AgrD. Le précurseur de l'AIP, AgrD, est modifié et excrété dans l'environnement par le transporteur AgrB (Novick et Geisinger, 2008). Il existe 4 types de système Agr, qui mènent à la sécrétion d'AIP légèrement différents. Les AIP d'un type particulier d'Agr activeront seulement les systèmes Agr de ce type. Un AIP d'un type différent sera incompatible et agira comme un antagoniste par compétition (Novick et Geisinger, 2008).



**Figure 2: Cascade d'activation du système d'activation génique par *quorum sensing***

#### 1.4.2 Les composantes du biofilm

Les protéines en charge de l'adhésion initiale dépendent fortement de la surface. Sur une surface abiotique, telle que du plastique ou du métal, les propriétés physico-chimiques de la surface et les composantes de la paroi bactérienne sont importantes pour une bonne adhésion. Les composantes importantes pour adhérer à ces surfaces sont la protéine associée à l'accumulation (*Aap*), l'acide téichoïque et l'acide lipotéichoïque. Dans le cas

de surfaces biotiques, la bactérie doit s'ancrer aux facteurs environnementaux tels que les fibronectines, les fibrinogènes, les collagènes, les vitronectines et les laminines. Pour ce faire, une catégorie particulière de composantes est utilisée : les *cell wall-anchored* (CWA). Cette catégorie comprend les facteurs d'agrégation A et B (*clfA* et *clfB*) et les protéines de liaison au fibrinogène A et B (*fnBPA* et *fnBPB*). Après l'adhésion de la bactérie, la prolifération et l'accumulation de biofilm peuvent commencer.

Le biofilm est composé principalement d'adhésines polysaccharidiques intercellulaires (PIA), qui consiste en une chaîne de poly-N-acétylglucosamine. Les PIA sont encodés par l'opéron *icaADBC*. Les gènes compris dans le locus sont *icaA*, *icaD*, *icaB* et *icaC*. Les gènes *icaA* et *icaD* codent pour des n-acétylglucosamine transférases, qui rajoutent des résidus aux oligomères de N-acétylglucosamine. Le gène *icaC* code pour un transporteur qui permettrait aux oligomères de acétylglucosamines de traverser la membrane cellulaire. Les chaînes de N-acétylglucosamine qui demeurent à l'extérieur de la membrane cellulaire sont déacétylées par la protéine encodée par *icaB*, ce qui leur donne une charge positive (Cue et al., 2012). Cette charge positive permet l'agglomération des bactéries par une adhésion entre les oligomères de N-glucosamine et les membranes bactériennes, qui sont chargées négativement (Speziale et al., 2014). Le locus *icaADCB* peut être activé par des concentrations élevées de sel ou de glucose et par l'éthanol (Cue et al., 2012).

Une composante majeure du biofilm est l'ADN externe (ADNe) qui provient de l'autolyse de bactéries par les autolysines majeures telles qu'*atlA*. Cette faculté de produire de l'ADNe permettrait d'augmenter l'adhésion en milieu hydrophobique (Houston et al., 2011). L'ADNe pourrait aussi servir de source de nutrition, serait une source de transfert



horizontal d'ADN entre les bactéries et aiderait à l'étalement et la structuration du biofilm (Kaplan et al., 2012). Cependant, le rôle des ADNe ne fait pas consensus dans la communauté scientifique. Il a été soulevé que l'ADNe serait facilement digéré par les ADNase situées au site de l'infection. Ainsi, l'ADNe ne serait qu'un artefact de la formation de biofilm *in vitro* (Otto, 2013). Toutefois, une nouvelle propriété d'un peptide bactérien réussi à expliquer le fait que l'ADNe n'est pas digéré. Ces petits peptides se nomment les modulines phénol-soluble (PSM).

#### 1.4.3 Modulines phénol-soluble

Les PSMs sont de petits peptides sécrétés qui possèdent plusieurs caractéristiques intéressantes pour la bactérie. Tout d'abord, ils aident à l'étalement des bactéries par leur propriété de surfactant. Les PSMs peuvent aussi aider à la formation de biofilm en créant des canaux qui permettront l'apport de nutriments dans les régions centrales du biofilm. En grande quantité, les PSMs vont perturber le biofilm et favoriser sa dispersion (Peschel et Otto, 2016). Les PSMs peuvent aussi affecter la membrane des facteurs immunitaires, ce qui cause leur lyse. Leur habilité à perturber les membranes cellulaires provient de leur structure d'hélice alpha amphipatique. Ces cylindres peuvent s'introduire dans les membranes et former un pore (Otto, 2014). Le promoteur des PSMs est activé par l'effecteur AgrA. La sécrétion des PSMs est donc sous le contrôle du système Agr (Periasamy et al., 2012).

Les PSMs ont aussi la caractéristique de se conjuguer avec l'ADNe pour former des fibres amyloïdes. Ces fibres sont très difficiles à digérer par des enzymes et protègent l'ADNe du clivage par les DNase (Schwartz et al., 2015). Il semblerait donc que l'ADNe ne soit pas simplement un artéfact de culture *in vitro*, mais bien une composante majeure du biofilm.

#### 1.4.4 Biofilm *ica*-indépendant

Certaines souches bactériennes produisent des biofilms qui ne sont pas composés de adhésines polysaccharidiques intercellulaires (PIA). Ils sont plutôt formés de protéines qui promeuvent l'accumulation de bactéries. Cette découverte provient de travaux au cours desquels des mutations du gène *icaACDE* avaient très peu d'impact sur la formation de biofilms d'une souche en particulier. De plus, de nouveaux gènes qui influencent le biofilm sans avoir d'action sur le locus de *icaABDC* ont été découverts (Fitzpatrick et al., 2005). Des photos par *scanning electron microscopy* révèlent que ces biofilms sont beaucoup plus compacts que les biofilms formés de PIA (Vergara-Irigaray et al., 2009). Ces biofilms protéiques sont souvent composés de protéines de surface qui favorisent les interactions intercellulaires. L'une des protéines importantes pour ces interactions chez *S. aureus* est la protéine de surface G (*sasG*). Elle permet de promouvoir l'attachement entre les bactéries pour former un biofilm sans PIA. D'autres protéines peuvent former un biofilm protéique telles que la protéine C contenant des répétitions sérine-aspartate (SdrC), l'adhésine riche en sérine pour thrombocyte (*sraP*) et les protéines de liaison au fibrinogène (Speziale et al., 2014). Ces protéines ont des restrictions différentes en ce qui concerne les cations qu'elles nécessitent pour leurs interactions. Par exemple, *sasG* a besoin de Zn<sup>+</sup> pour permettre son interaction entre les cellules (Geoghegan et al., 2010), tandis qu'une forte teneur en Mn<sup>+</sup>

va inhiber la formation de biofilms par SdrC (Barbu et al., 2014). Cette forme de biofilms est encore très peu étudiée et plusieurs mécanismes doivent encore être investigués.

## 1.5 Techniques de typage

### 1.5.1 L'électrophorèse à gel pulsé (EPGP)

L'électrophorèse à gel pulsé (EPGP) est considérée comme la technique standard pour identifier les souches bactériennes. La technique consiste àensemencer une suspension d'agarose avec une quantité fixe de bactéries. Les bactéries sont lysées par un cocktail d'enzymes spécifique à l'espèce bactérienne. La suspension est alors refroidie à température de la pièce pour former une bandelette d'agarose. Ces bandelettes sont coupées au format des puits utilisés pour le gel de migration. Elles sont ensuite traitées avec une enzyme de restriction spécifique, qui sectionne l'ADN à chacune des séquences qu'elle reconnaît. Par la suite, les bandelettes sont positionnées à la bordure des dents du peigne de migration. Le gel d'agarose est alors coulé autour des bandelettes (Schwartz et Cantor, 1984). Après avoir laissé le gel figer, un courant alternatif est appliqué sur celui-ci. Le courant alterne entre 3 positions, dont deux positions à un angle de 60 degrés par rapport à l'axe central. Cela permet une meilleure séparation des fragments d'ADN, car le temps nécessaire pour réaligner les charges dépend de la grosseur du fragment. Plus le fragment est gros, plus il prendra du temps à réaligner ses charges. De cette façon, il est possible de différencier deux bandes avec peu de paires de bases de différence qui est essentiel pour

différencier les fragments de haut poids moléculaire. Le temps de migration se situe entre 18 et 20 heures.

La technique est reconnue surtout pour sa puissance de discrimination. Seul le séquençage complet est plus discriminant que le EPGP (Rodriguez et al., 2015). Par contre, la technique est coûteuse et lente. Il existe aussi une différence de résultats entre les manipulateurs étant donné la finesse nécessaire pour accomplir la méthode. L'interprétation des résultats est laissée à un logiciel dont les variables doivent être standardisées pour que les résultats puissent être comparés à des banques de données. La technique ne permet pas non plus de discerner les fragments d'ADN sur le gel, la position des bandes sur gel est utilisée comme identité de la souche. Il n'est pas impossible que deux souches différentes donnent les mêmes positions de bandes si les sites de restriction donnent des fragments de la même taille, bien que cela soit assez improbable. Il est aussi possible que des mutations ponctuelles dans des souches identiques mènent à la formation d'un site de restriction et change ainsi la position de bandes obtenu.

### 1.5.2 *Multilocus Enzyme Electrophoresis*

Une autre méthode utilisée pour le typage de *S. aureus* est la technique du *Multilocus sequencing Typing* (MLST). Cette technique a été inspirée par la technique de *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) qui consiste à amplifier des gènes ménagers et à

comparer leur poids moléculaire sur un gel. La différence entre les deux techniques est qu'au lieu de faire migrer les produits PCR, ils sont séquencés dans la MLST. Cette technique permet d'observer les changements lents des gènes ménagers et ainsi regrouper les échantillons selon ces changements. Pour *S. aureus*, le test de MLST prend en compte sept gènes ménagers, qui doivent être amplifiés pour permettre la comparaison avec la base de données du site MLST (<http://www.mlst.net/>). Le grand avantage de la technique est qu'elle permet une reproductibilité entre les laboratoires. Ainsi, la comparaison des résultats est possible. Les MLST sont souvent utilisées pour des études épidémiologiques dans un contexte international. Par contre, la faible variation dans les gènes ménagers diminue le pouvoir de discrimination et le séquençage de plusieurs gènes rend la technique très dispendieuse.

Ces techniques ont mené à l'élaboration d'une méthode de typage avec un pouvoir de discrimination élevé, la possibilité de comparer entre les laboratoires, un temps de manipulation moindre et un coût plus faible : le typage *spa*.

### 1.5.3 Typage *spa*

Une méthode de typage spécifique à *S. aureus* et reproductible entre laboratoires a été conçue par Koreen et al. (2003) dans le but d'analyser rapidement les épidémies locales et de permettre des investigations mondiales liées aux infections de *S. aureus*. La technique

développée se nomme le typage *spa*. Elle consiste à l'amplification et au séquençage du gène de la protéine A (*spa*). La partie séquencée du gène est située dans la région polymorphique X, qui est en aval de séquences c-terminales nécessaires pour l'attachement de la protéine à la paroi cellulaire (Shopsin et al., 1999). La région polymorphique X est composée de séquences d'acides nucléiques répétées d'environ 24 paires de bases, bien que des exemples de 21 à 30 paires de bases soient répertoriés. Le gène *spa* est donc considéré comme un gène à nombre varié de tandem répété (VNTR).

Les changements dans cette région polymorphique sont idéaux pour discriminer l'origine clonale des souches. L'avantage de la technique réside dans son interprétation et sa vitesse d'exécution. Le produit PCR du gène *spa* est séquencé. Un logiciel peut alors déterminer les types de répétition présents dans la séquence. Les répétitions sont comparées à la base de données Ridom SpaServer et un code unique lui sera attribué. Il n'y a donc aucune ambiguïté d'interprétation et les résultats sont comparables entre laboratoires. En ce qui concerne la vitesse d'exécution, un groupe de recherche en particulier a comparé le temps nécessaire à typer une banque de données par typage *spa* et par EPGP. Le temps d'analyse pour le EPGP était de 1 an, tandis que l'analyse au typage *spa* avait pris seulement 3 semaines (Shopsin et al., 1999). Le pouvoir de discrimination du typage *spa* est également élevé. Dans une étude comparant le typage *spa* à plusieurs méthodes de typage classiques, le pouvoir de discrimination de chaque méthode a été comparé au *DNA micro-assay* (Koreen et al., 2004). L'étude a révélé que la probabilité de discerner deux isolats avec le typage *spa* était de 97,3 %, tandis que le PGEF avait 96,4 %. Ainsi, le typage *spa*, par sa facilité d'utilisation, son temps d'exécution et son pouvoir de discrimination, est un outil de choix pour identifier les souches de *S. aureus*.

## CHAPITRE 2

### INSERTION DE L'ARTICLE

#### 2.1 Article

#### PRÉDICTION DE L'ÉVOLUTION CLINIQUE DES INFECTIONS INTRAMAMMAIRES CAUSÉ PAR STHAPHYLOCOCCUS AUREUS BASÉ SUR L'ANALYSE PHÉNOTYPIQUE ET GÉNOTYPIQUE DES ISOLATES.

##### 2.1.1 Résumé de l'article

*Staphylococcus aureus* est un agent pathogène qui cause des infections intramammaires (IIM) chez le bovin laitier. Ces IIM sont difficiles à éliminer et la gestion du troupeau est alors cruciale pour réduire la prévalence et l'incidence des nouvelles IIM. Le but de cette étude est de déterminer des facteurs génotypiques et phénotypiques d'isolats de mammites bovines causées par *S. aureus* qui pourraient aider à l'identification de souches causant des infections cliniques ou des infections de longue durée. Pour ce faire, 587 isolats de *S. aureus* provenant d'échantillon de lait ont été caractérisés pour la présence de facteurs de

virulences (*seg*, *tst* et *lukM*), la production de biofilm in vitro et catégorisé par typage *spa*. Chaque série d'échantillons a été obtenue d'un échantillonnage répété sur une période du cycle de lactation spécifique, dans un quartier mammaire précis. Le typage de gènes à nombre varié de tandem répété (VNTR) a été utilisé sur chaque série d'échantillon pour confirmer la persistance de l'infection. Les séries ont été catégorisées par leur symptomatologie (infection clinique ou sous-clinique) et leur durée d'infection. Par la suite, les catégories ont été comparées pour trouver des caractéristiques qui pourraient aider à prédire la symptomatologie ou la durée de l'IIM. Nous avons trouvé des différences dans la distribution des types *spa* entre les cas d'IIM cliniques et les cas sous-cliniques. La prévalence du gène *lukM* était plus élevée dans les cas cliniques que les cas sous-cliniques ( $p=0,009$ ). Les caractéristiques des souches ont alors été utilisées dans une analyse Kaplan-Meier pour déterminer si une caractéristique particulière influencerait la durée de l'infection. Les souches de type *spa* t359 et t529 ont moins de chance de persister à comparer au sous-type de type *spa* t13410 ( $p=0,019$  et  $0,047$ ). Cette étude indique qu'une caractérisation plus poussée des types *spa* pourrait aider à identifier les souches problématiques et ainsi, d'améliorer la prise de décision pour la gestion de la maladie.

## 2.2 Contribution

**Sébastien Pichette Jollette** (1<sup>er</sup> auteur) : Est l'auteur qui a participé activement à la planification du projet. Il est aussi le manipulateur principal pour la caractérisation de la banque d'isolats. Il est responsable de la majorité des manipulations pour les essais de biofilm et pour les tests PCR tels que la détection de gènes de virulence, le typage *spa* et VNTR. Il a aussi écrit le premier jet de l'article et a finalisé les versions subséquentes.



**Guillaume Millette** (2e auteur) : Est un auteur qui a grandement contribué aux essais de biofilm, ainsi qu'à la caractérisation VNTR en tant que stagiaire de premier cycle.

**Elodie Demontier** (3e auteur) : Est une auteure qui a contribué aux tests PCR et aux essais de biofilm en tant que stagiaire de premier cycle.

**Diana Bran-Barrera** (4e auteur) : Est une auteure qui a contribué aux tests PCR et aux essais de biofilm en tant que stagiaire de premier cycle.

**Mélina Cyrenne** (5e auteur) : Est une auteure qui a contribué aux extractions d'ADN et aux tests PCR en tant que stagiaire de premier cycle.

**Céline Ster** (6e auteur) : Est une auteure qui a grandement aidé à la planification expérimentale en tant que professionnelle de recherche.

**Denis Haine** (7e auteur) : Assure l'analyse statistique des données.

**Greg Keefe** (8e auteur) : Planification expérimentale du projet.

**François Malouin** (co-auteur de correspondance) : Directeur des travaux et écriture du manuscrit.

**Jean-Philippe Roy** (co-auteur de correspondance) : Principal investigateur du projet et écriture du manuscrit.



## **PREDICTION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* INFECTION EVOLUTION**

Prediction of the Clinical Evolution of *Staphylococcus aureus* Intramammary Infection

Based on the Phenotypic and Genotypic Analysis of Isolates

**S. Pichette-Jolette\***, **G. Millette\***, **E. Demontier\***, **D. Bran-Barrera\***, **M. Cyrenne\***, **C. Ster\***, **D. Haine†**, **G. Keefe‡**, **F. Malouin\*<sup>1</sup>**, **J.P. Roy<sup>1</sup>**

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

†Département de Pathologie et Microbiologie and Département de Sciences Cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-hyacinthe, QC, Canada, J2S 7C6.

‡Centre for Veterinary epidemiological Research, University of Prince Edward Island, Charlottetown, PE, Canada, C1A 4P3.

<sup>1</sup>Co-Corresponding authors:

FM , molecular microbiology

JPR , clinical investigation

**Keywords: bovine, duration, intramammary infection, severity *Staphylococcus***

***aureus***

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is a major pathogen causing intramammary infection (IMI) in dairy cow. These IMI are difficult to eliminate and herd management decisions are critical to reduce the prevalence and the incidence of new IMI. Predicting the outcome (duration of IMI or clinical symptoms) of a *S. aureus* IMI based on the characteristics of the isolate would help to make appropriate decision about treatment and animal management. For this purpose, 587 *S. aureus* isolates from quarter milk samples were characterized using genotypic tests (presence of virulence genes *seg*, *tst* and *lukM*), epidemiological typing (*spa* type) and by a phenotypic test (biofilm production *in vitro*). Each isolate was retrieved from specific series of milk samples, which were collected from the same quarter of the same cow over an extended period of time. Variable number of tandem repeats (VNTR typing) was used to infer the persistence of the same *S. aureus* strain in a series of sequential isolates. This allowed to associate each strain to a clinical or subclinical status and to determine the duration of IMI. Strains from each series were then compared to find features that could help predicting the evolution of an IMI or the duration of IMI. We found a difference in the distribution of *spa* type between the strains from clinical cases and the strains from subclinical cases. The prevalence of *lukM* in strains from clinical cases was also higher than in those from the subclinical cases ( $p=0.009$ ). The strain characteristics were then used in a Kaplan-Meier analysis to determine if any variables were influencing the duration of the IMI. Some differences in the duration of IMI were observed among different groups of strains. Strains from the *spa* type t359 and t529 were less likely to persist compared to the *spa* type t13410 ( $p= 0.019$  and  $0.047$ , respectively). With further characterization of the major *spa* types causing mastitis, *spa* type could help identifying the problematic strains on a herd and help management decisions.

## INTRODUCTION

Intramammary infections (IMIs) leading to subclinical or clinical mastitis are a recurring problem in the dairy industry. Even if the management procedures keep on improving, IMIs are still occurring on dairy farms. IMIs has a huge economic and animal welfare impact in the dairy industry worldwide (Halasa et al., 2007). In Canada, a study of the Canadian Bovine Mastitis Research Network (National Cohort of Dairy Farms (NCDF)) showed that the principal pathogen causing clinical mastitis was *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and the second pathogen isolated in subclinical mastitis (Reyher et al., 2011). This pathogen is also well known to cause chronic IMIs that are refractory to treatment (Melchior et al., 2006). *Staphylococcus aureus* infected quarters allow the infection to propagate from cow to cow mainly during milking (Zadoks et al., 2002). Therefore, it is primordial to improve management practices of these IMIs.

One way to improve the management practice would be to identify the *S. aureus* strains that are either prone to cause clinical symptoms or the strains prone to cause long lasting subclinical infections. Identification of these problematic strains could help make better management decisions at the farm including aggressive treatment or culling.

The persistence of the IMI or the severity of the mastitis symptoms is determined by multiple factors from the environment, host and pathogen including the genotype and phenotype of the *S. aureus* strain involved (Veh et al, 2015). Determining the clonal origin could provide information on these pathogen-associated factors and help discriminate populations of *S. aureus* (Feil et al., 2003). *Spa* typing is a specific method which identifies *S. aureus* strains by sequencing the X polymorphic hyper variable region of the staphylococcal protein A gene (*spa*) (Koreen et al., 2004). This typing method is well standardized and allows to compare *S. aureus* strains coming from different sources worldwide.

Many bacteria including *S. aureus* have the ability to produce biofilm. Biofilm is an extra-cellular matrix that can reduce opsonisation by antibodies and phagocytosis. Furthermore, bacterial community in biofilm are less susceptible to antibiotics (Costerton et al., 1999). Production of biofilm is tightly regulated by multiple regulatory gene systems. The quorum sensing system Agr is one of the most influential regulatory systems to influence the formation of biofilm in *S. aureus* (Arciola et al., 2015). The activation of this system is proportional to the density of the autoinducing peptide (AIP) released in the environment by the bacteria (Novick, 2003). High density of AIP will lead to an autocatalytic activation of the Agr system and to the production of the secondary messenger RNAlII. This secondary messenger downregulates cell-wall associated proteins that help to colonize the host and also upregulated virulence factors that help the invasion of the host (Novick and Geisinger, 2008). Low activation of the Agr system reduces the dispersion of the biofilm, hence promotes a more abundant biofilm than normal (Otto, 2013).

*Staphylococcus aureus* have some virulence factors that help the establishment of an IMI (Sutra and Poutrel, 1994). They can be grouped in multiple categories like enterotoxins, degradative enzymes, hemolysins, surfaced-associated factors, leukocidins and superantigens. Enterotoxins like the staphylococcal enterotoxin G (*SEG*) and TSST-1 are superantigens with the ability to cause a non-specific polyclonal activation of immune cells (Dinges et al., 2000). Leukocidin LukM/F' is a two-component pore forming protein (Fromageau et al., 2010). Bovine neutrophils express a high quantity of CCR1 receptors that are the target of the LukM/F' leukocidin, which make them vulnerable to lysis from this toxin (Vrieling et al., 2015).

The objective of this study were to identify the genotypic and phenotypic characteristics of *S. aureus* strains that could be associated to clinical mastitis or subclinical mastitis or that could be used to predict the duration of *S. aureus* IMI.

## MATERIAL AND METHODS

### *Bacterial Isolates Collection*

Five hundred eighty seven *S. aureus* isolates from quarter milk samples were characterized in this study. All isolates came from the Canadian Bovine Mastitis and milk quality Research network (CBMMQRN) Mastitis Pathogen Culture Collection (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada). As described in Reyher et al. (2011), the isolates were collected over a two-year period from 91 herds in the National Cohort of Dairy Farms from four different regions of Canada (Atlantic provinces, Quebec, Ontario and Western provinces). Briefly, quarter milk samples were collected on several occasions during the two-year period: 1-during lactation, 2- prior dry-off and after calving and 3-when a clinical mastitis case was observed. All *S. aureus* isolates were archived with related data both at the farm and cow levels. All milk samples coming from the same quarter collected at different time over the two-year period for any reason formed a quarter series.

*Staphylococcus aureus* isolates from the mastitis pathogen culture collection were identified from milk samples as Gram-positive cocci showing a positive catalase test, hemolysis on blood agar, and positive nuclease and coagulase tests (Reyher et al., 2011). All *S. aureus* isolates coming from samples with at least one colony of *S. aureus* from a 10  $\mu$ L milk sample (100 cfu/ml) were kept in the mastitis pathogen culture collection. The somatic cell count (SCC) was available for most of the samples.

### ***Selection of isolates***

*Staphylococcus aureus* isolates from a quarter series, as defined above, were coming from a cow sampled over the two-year period and included first and last samples in which *S. aureus* was retrieved. Series constituted from a single sample that was positive for *S. aureus* was also included in the study. All series ended by two samples, three weeks apart, that were negative for *S. aureus*.

The types of sample were named based on the phase of the lactation cycle. Lactation sample were all the isolates collected during the lactation. Dry-cow samples were isolates collected before the dry-off period. Fresh-cow samples were isolates collected just after calving. Clinical samples were isolates collected when a clinical case was observed.

Variable number of tandem repeats (VNTR) typing is described below and was used to infer the persistence of the same *S. aureus* strain in a quarter series of sequential isolates. This allowed to associate a specific strain to a clinical or subclinical mastitis behavior and a duration of IMI. The duration of IMI (or the time to elimination of *S. aureus*) is defined further below. Complete characterization of *S. aureus* was performed on the first isolate of the quarter series.

### ***Extraction of gDNA***

The isolates were inoculated in 3ml of brain heart infusion (BHI) (BD, ON, Canada) and incubated overnight. Genomic DNA was extracted using the kit Gen Elute kit according to manufacturer's recommendations (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) with few modifications. Lysostaphin incubation was increased from 30 minutes to 1h30 and proteinase K incubation time was increased from 10 min to 30 minutes.



**Table 1.** Target genes, primer sequences, expected sizes of amplicons, and PCR conditions

Gene Primer sequence <sup>1</sup>	Product size (bp)	PCR hybridization temperature	Reference
seg <sup>2</sup> Fwd: AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC Rev: AAACTTATATTGGAACAAAAGGTACT AGTTC	642	50°C	Jarraud et al., 2002
tst <sup>2</sup> Fwd: TTCACTATTTGTAAAAGTGTCAGACCC ACT Rev: TACTAATGAATTTTTTTTATCGTAAGCC CTT	180	50°C	Jarraud et al., 2002
femA <sup>2</sup> Fwd: ACAGCTAAAGAGTTTGGTGCCTIIIIIGAT AGCATGC Rev: TTCATCAAAGTTGATATACGCTAAAGG TIIIIICACACGGTC	729	50°C	Veh et al., 2015
lukm <sup>2</sup> Fwd: TGGATGTTACCTATGCAACCTA C Rev: GTTCGTTTCCATATAATGAATC ACTAC	780	55°C	Jarraud et al., 2002
spa typing: spa-113f: TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC spa-1514r: CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	110 to 422	63°C	Aires-de-Sousa et al., 2006

<sup>1</sup>Fwd = forward; Rev = reverse. <sup>2</sup> used in mutiplex PCR

### ***Determination of the Duration of Infection by VNTR Typing***

The infection was considered to have persisted if the first and the last isolates of the series of quarter milk samples showed an identical VNTR profile. If the VNTR profiles differed, the other isolates of the series were retrieved from the pathogen collection. The tests were repeated looking for the last sequential isolates showing the same VNTR profile to be able to measure time to elimination of IMI. The VNTR test was previously described by Sabat et al. (Sabat et al., 2003). The primers used were for the clumping factor genes A and B (*clfA* and *clfB*), staphylococcal protein A (*spa*), V8 serine protease (*ssp*) and Ser-Asp-rich fibronectin-binding protein (*srdCDE*) (Table 1). All VNTR PCR were performed using the GeneAmp PCR system 2700 (Life Technologies, Burlington, ON). The PCR reaction final volume was 25  $\mu$ L and was composed of 1X PCR buffer with  $MgCl_2$  (NEB, Ipswich, MA), 0.8 mM dNTP final concentration (Bioshop, CA, ON); 1.5 mM  $MgCl_2$  solution (NEB, Ipswich, MA); final primer concentration was 160  $\mu$ M except for the *clfB* primer which was 80  $\mu$ M; final concentration of the Taq DNA polymerase (NEB) was 0.025 U/ $\mu$ L. The cycling settings were 5 min of denaturation at 94°C; 20 cycles of amplification with 30 s at 90°C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C; 5 min elongation at 72°C. The amplicon was migrated on a 1.5 % agarose gel, stained with bromide ethidium, visualized with a UV transmitter and photographed. The first isolate of the quarter series was then used for further characterization of the *S. aureus* strain.

### ***Spa Typing***

The polymorphic X region of the *spa* gene was amplified using the primers *spa*-1113f and *spa*-1514r (Table 1), as describe by Aires de Sousa et al. (2006). The PCR reaction was previously described in Veh et al. (2015). The presence of the amplicon was confirmed on a 0.5% agarose gel and then sent for sequencing at the *Plateforme d'Analyses Biomoléculaires de l'Université Laval* (Quebec, QC, Canada). The sequences were analyzed with the software Bionumerics v5.10 (Austin, TX, USA). The *spa* plug-in was

used to compare the sequence obtained to the *spa* database server (<http://www.spaserver.ridom.de/>). One specific *spa* type was assigned to each strain.

### ***Virulence Gene PCR***

The presence of the virulence genes *seg*, *tst* and *lukFM* was detected by PCR. Detection of the gene *femA* was used as a positive control. *FemA* encoded for the biosynthesis of a cell-wall protein that is universally carried by *S. aureus* (Mehrotra et al., 2000). All primer sequences are presented in Table 1. One PCR multiplex (*tst* and *femA* genes) and two additional simplex PCR (*seg* and *lukM* genes) were performed. The final volume for each PCR reaction was 25 µl and consisted of 1X PCR buffer (NEB), 0.4 mM of dNTP (Bioshop), 80 µM of each primer for simplex PCR and 40 µM of each primer for the multiplex PCR; 0.025 U/ µL Taq DNA polymerase (NEB). All the PCR reactions were performed on the GeneAmp PCR system 2700 (Life Technologies, Burlington, ON). The cycling conditions were 4 min at 95°C for initial denaturation, 35 cycles of 30 s at 95°C followed by 30 cycles of primer specific temperature (Table 1) and 1 min at 68°C. A final extension of the product was performed for 10 min at 68°C. The gDNA of the *S. aureus* strain N315 was used as a positive control for the *seg* and *tst*. *Staphylococcus aureus* strain RF122 was used as a positive control for the *lukM* gene.

### ***Biofilm Production in vitro***

*Staphylococcus aureus* strains were plated on BHI agar supplemented with 0.25% glucose and were incubated overnight. For each strain, a 0.5 McFarland standard suspension was inoculated in a flat bottom cellular culture treated 96 wells-plates in quadruplicate. Each well contains 100 µL of BHI supplemented with 0.25% glucose. The 96 well plates were incubated at 37°C for 24h. After incubation, plates were washed three times with 200 µL of PBS, then air dried and stained with a 0.01% (w/v) crystal violet (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) solution for 30 minutes. The plates were washed with

distilled water two times and the biofilm was dissolved in 100% ethanol. The absorbance was measured at 540 nm by spectrometry (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). Each strain biofilm production was normalized to the biofilm production of the strain Sa2539 which produce an average stable biofilm. For each strain, biofilm quantification was performed 3 independent times. The means of the biofilm production from the strains were used for the subsequent statistical analysis.

### ***Statistical Analysis***

#### Case-control study with clinical cases against series without any clinical case

The case group contained all the quarter series showing at least one clinical case during the sampling period. The strains from these series were compared to a control group which contained all series showing no manifestation of mastitis in the series although a *S. aureus* strain was detected in the series samples (i.e. subclinical mastitis). The distribution of the *spa* type between clinical and subclinical IMIs was compared using the Pearson chi-square test ( $\chi^2$ ). The distribution of virulence genes in the strains of the case and control groups was also compared using  $\chi^2$  test. The production of biofilm was compared using Wilcoxon signed rank test.

#### Kaplan-Meier (time survival) analysis

The samples used for this statistical test were all the samples with more than one sample in the quarter series and for which the duration of infection was validated by VNTR. The time to elimination of the *S. aureus* strain responsible for a quarter series was defined as the time from the first positive sample to the last positive sample followed by at least two negative samples taken three weeks apart. If the elimination was not confirmed, right-censoring was applied at the last observation available. In this case, the data were considered to be type 2 interval censored (Huang and Wellner, 1997). Survival analysis with non-parametric likelihood estimators of the survivor distribution was used to estimate

the time to elimination (Robert and Geyer, 2011). The time of survival analysis compared, sample types, *S. aureus spa* type, possession or not of virulence genes, and biofilm production. Weighted log-rank tests were applied on the variables (Sun, 1996).

Parametric regression proportional hazard models for interval censored data with Weibull baseline distribution were fit separately for sample type, *spa* type, biofilm production, virulence genes, and also within a model considering all of them.

## RESULTS

### *Description of the Staphylococcus aureus isolates*

In total, 353 different series of strains were used. Series had up to 18 isolates. From these 353 series, 584 isolates for *S. aureus* were retrieved from the pathogen collection. For the series having more than one isolate, 234 pairs of isolates were formed with the first and the last isolates from a series to validate the persistence of a strain in each series using VNTR typing. This validation thus also provided the duration of infection for that strain. In addition to the 234 series having more than one *S. aureus* isolates, 119 series were composed of a single positive isolate for *S. aureus*, which was thereafter eliminated based on two following samples negative for *S. aureus*.

### *Validation of Persistent Strains from Quarter Series by VNTR typing*

The VNTR typing was performed to determine the duration of the *S. aureus* IMIs. The infection was considered to be persistent if the VNTR profiles for the first and last quarter series isolates were the same. From the 234 pairs of samples studied, 195 pairs (i.e. 195 series) showed a persistent strain based on VNTR typing, meaning that 39 pairs were composed of isolates with different VNTR profiles (possible reinfection with a different strain). The characteristics of the persistent strains and series were used in the time survival analysis.

### *Somatic Cell Count*

The somatic cell count (SCC) is routinely used to evaluate udder health and to detect possible IMIs. The SCC was available for most of the samples in this study. Lactation

samples were associated with a lower log SCC (5.5) compared to clinical (8.1), dry-cow (6.5) and fresh cow (8.2) samples ( $p < 0.001$ ). Fresh-cow samples were also associated with a significantly higher log SCC compared to dry-cow samples ( $p = p < 0.05$ ).

**Table 2.** *spa* and strain type distributions, presence of virulence genes and *in vitro* biofilm production median for the first *S. aureus* isolate of 353 quarter series.

Type <i>spa</i>	n	Type of <i>S. aureus</i> strain <sup>1</sup> (n=353) <sup>2</sup>				Virulence gene			Biofilm median
		Lactation	Clinical	Dry-cow	Fresh-cow	<i>seg</i>	<i>lukM</i>	<i>tst</i>	
t529	115	38	32	25	20	82	103	9	1.02
t267	67	27	15	12	13	2	59	1	1.10
NT <sup>3</sup>	58	28	8	15	7				
t359	36	13	14	1	8	6	32	0	1.09
t605	18	8	1	9	0	0	1	1	2.18
t2445	11	3	4	4	0	0	11	0	0.59
t13401	10	5	1	2	2	0	2	0	3.59
t3380	9	3	2	3	1	0	8	0	1.11
t521	8	1	4	1	2	1	6	0	1.21
t1965	8	5	2	1	0	1	5	0	0.70
t1166	3	2	0	0	1	0	0	0	0.91
t11215	2	2	0	0	0	0	0	0	4.13
t1190	2	1	0	1	0	0	2	0	0.83
t1236	2	1	0	0	1	0	1	0	1.32
t015	1	0	0	0	1	1	0	0	1.26
t021	1	0	0	1	0	1	0	0	4.11
t044	1	1	0	0	0	0	1	0	1.02
t078	1	1	0	0	0	1	1	0	0.83
t10610	1	0	0	1	0	0	0	0	2.33
t12186	1	0	0	1	0	0	1	0	5.22
t15058	1	1	0	0	0	0	0	0	3.47
t127	1	0	0	1	0	0	0	0	3.68
t177	1	0	0	1	0	0	0	0	2.58
t224	1	1	0	0	0	0	NA <sup>4</sup>	0	NA <sup>4</sup>
t5180	1	1	0	0	0	0	0	0	2.59
t5475	1	0	1	0	0	0	1	0	NA <sup>4</sup>
t9129	1	1	0	0	0	0	NA <sup>4</sup>	0	NA <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Based on sample type (lactation, clinical, dry-cow, fresh cow). <sup>2</sup>There were 353 quarter series studied and the first *S. aureus* strain of each series was *spa* typed. <sup>3</sup>NT, non typable (*i.e.*, no amplification of *spa* by PCR). <sup>4</sup>NA, not available.



### ***Spa Typing***

The compilation of all *spa* types found for the first strain of the 353 studied series is reported in Table 2. There were 27 different *spa* types found in the quarter milk strains. The number of *spa* repeat was between 2 and 14 and each were assign a code based on their repeated sequence. A novel *spa* type with 14 repeats was discovered in the series. 58 strains were non typable (no PCR amplification). The main *spa* types were t529 (n=115), t267 (n=67), t359 (n=36), t605 (n=18), t2445 (n=11) and t13405 (n=10).

### ***Virulence Genes***

The distribution of the virulence genes for the first strain of the 353 series is represented in Table 2. Among all the *S. aureus* strains, 34% were positive for *seg*. The presence of virulence genes was correlated with specific *spa* types. The *seg* positive strains were mainly found in the *spa* type t529 (68%). The *spa* type t267 and t359 only represented 2 and 6% of the *seg* positive strains. The *spa* type t529 had an increase of 650% in the possibility of having the *seg* gene compared to the other *spa* types.

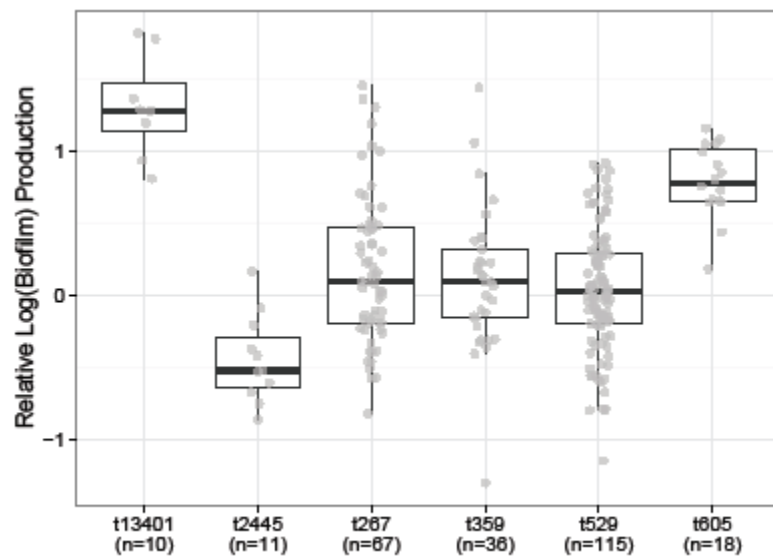
For the *tst* gene, only 11 strains were positive, which is too few to find a strong statistical significance, but note that 50% of the *tst* gene was found in strains of *spa* type t529.

The gene *lukM* gene was present at a higher rate than *seg* with 70% of all strains being positive. The three main *spa* types found in the study (t529, t267 and t359) included 90%, 88% and 88% of *lukM* positive strains, respectively.

## ***Biofilm Production***

The ability to produce biofilm *in vitro* was investigated using the crystal violet staining method. For this 302 strains were compared. The median values for biofilm production for each *spa* type are shown in Table 2. The distribution of biofilm production of the six main *spa* types is presented in the Figure 1. Biofilm production was different among the six main *spa* types ( $p < 0.001$ ). More specifically, the *spa* type t13401 produces more biofilm than all the other main *spa* types ( $p < 0.001$ ), excepted for t605. The *spa* type t605 produces more biofilm than t529, t267, t359, and t2445 ( $p < 0.001$ ). The *spa* type t2445 also produces less biofilm than t267 ( $p < 0.001$ ), t359 ( $p < 0.01$ ), and t529 ( $p = 0.01$ ) (Figure 1).

Biofilm production was also compared according to the presence or absence of virulence genes. The *seg* positive strains produce less biofilm than the *seg* negative strains ( $p < 0.01$ ). The *tst* and *lukM* positive strains produce less biofilm than the negative strains ( $p < 0.001$ ). Noteworthy, the high biofilm producer *spa* types t605 and t13401 mostly do not possess the *lukM* gene.



**Figure 3.** Boxplots of the biofilm production *in vitro* for strains of the major *spa* types. Each dot represents one strain. The first strain for each quarter series was used. The horizontal bar represents the median of biofilm production for each *spa* type. The boxes represent the interquartile interval

### **Influence of a clinical episode within a series**

All quarter milk series with at least one case of clinical mastitis (106 series, case group) were compared to all quarter milk sample series without any case of clinical mastitis (247 series, control group). The descriptive statistics showed a different *spa* type distribution between the two groups ( $p < 0.05$ ). Presence of virulence genes was also compared between these two groups. A significant difference was found with the *lukM* gene. The series with a clinical mastitis episode had 94% of *lukM* positive strains compared to the non clinical mastitis series with 80% of *lukM* positive strains ( $p = 0.017$ ) (Table 3).

In the final logistic regression model for this case-control study, the series with clinical IMIs were compared to the series without any IMI. The only factor that was significantly different was the biofilm production *in vitro* ( $p = 0.05$ ). The conclusion was that for each log of biofilm production, there was 97% chance to have clinical IMI.

**Table 3.** Descriptive comparison of subclinical IMIs and clinical IMIs

		Subclinical IMIs (n=247) n (%)	Clinical IMIs (n=106) n (%)	
<i>spa</i> Type	Others and NT <sup>1</sup>	76 (30.8)	20 (18.9)	
	t529	74 (30.0)	41 (38.7)	
	t267	46 (18.6)	21 (19.8)	
	t359	22 (9.0)	14(13.2)	
	t605	17(6.8)	1 (0.9)	
	t13401	7 (2.8)	3 (2.8)	
	t2445	5 (2.0)	6 (5.7)	p=0.018 <sup>2</sup>
	Superantigen	<i>seg</i>	86 (33.6)	29 (35.4)
	<i>tst</i>	12 (5.2)	4 (4.9)	p=0.75 <sup>2</sup>
Leukocidin	<i>lukM</i>	161 (80.0)	75 (94.0)	p=0.009 <sup>2</sup>
Biofilm median		1.14	1.07	p=0.25 <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Others are strains of minor *spa* types (those with n < 10) and include non typable (NT strains (i.e., those with no PCR amplification for *spa*)) <sup>2</sup>Wilcoxon test <sup>3</sup>Pearson test

## Time Survival Analysis

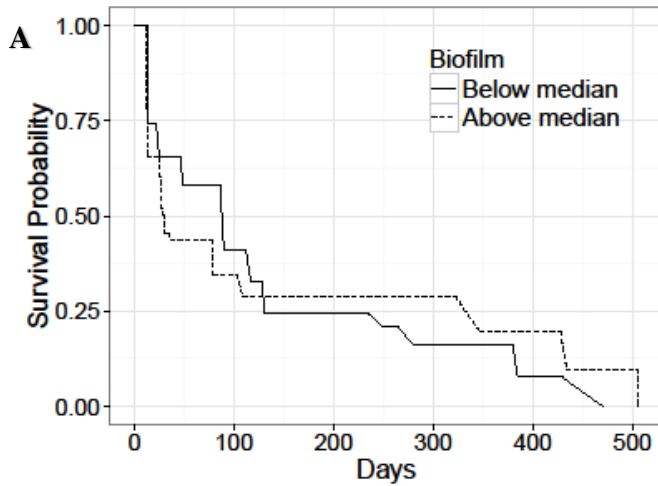
The time survival analysis was performed using the duration of infection determined after VNTR typing. The elimination was defined as two negative samples (taken three weeks apart) following the last positive isolate in a given quarter series. If the conditions for time to elimination calculation were not met, the data was right-censored. Time survival analysis according to the presence/absence of the virulence genes showed no significant difference when each virulence gene was considered alone (Figure 2B and 2C). Note that no time survival analysis was performed with the *tst* gene as a variable since there were too few positive strains.

For the time survival analysis according to biofilm production, strains were divided between the strong biofilm producers, which produce more biofilm than the median of the overall dataset, and the weak biofilm producers, which produce less biofilm than the median of the overall dataset. The time to elimination of those 2 groups (high and low biofilm producers) was then investigated. No difference could be observed for the time to elimination with only the biofilm as the main factor (Figure 2A).

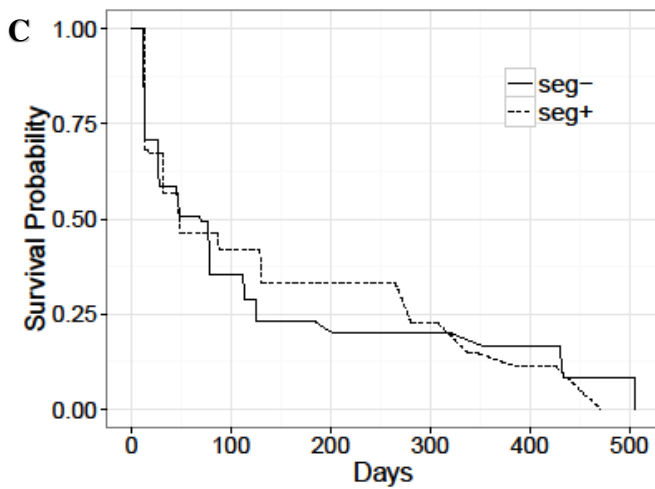
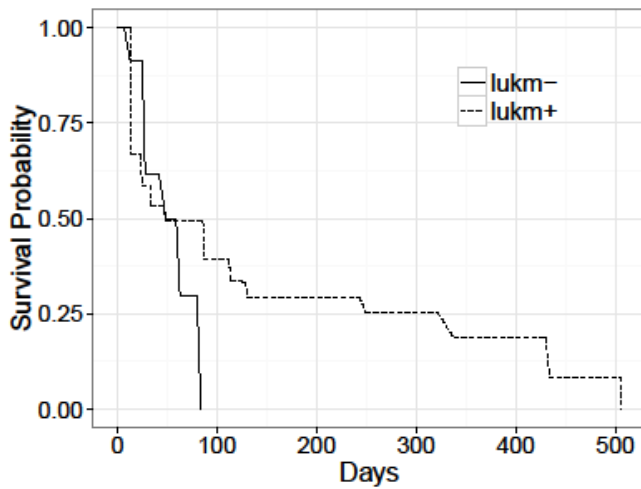
Time survival analysis, according to the sample type and *spa* type, also did not show any statistical difference between these categories (Figure 3A and 3B).

The survival analysis was then followed by a logistic regression, which included all variables (type of samples, *spa* type, biofilm production, presence virulence genes). In this multivariable model of the logistic regression, time to elimination was shorter with the strains of the lactation series compared to the clinical and the fresh-cow series. The strains in the clinical sample had an increase of 50% in the possibility that the bacteria persist compared to the lactation samples ( $p < 0.05$ ). Similarly, the strains fresh-cow sample were associated with an increased chance of persisting by 60% compared to the lactation samples

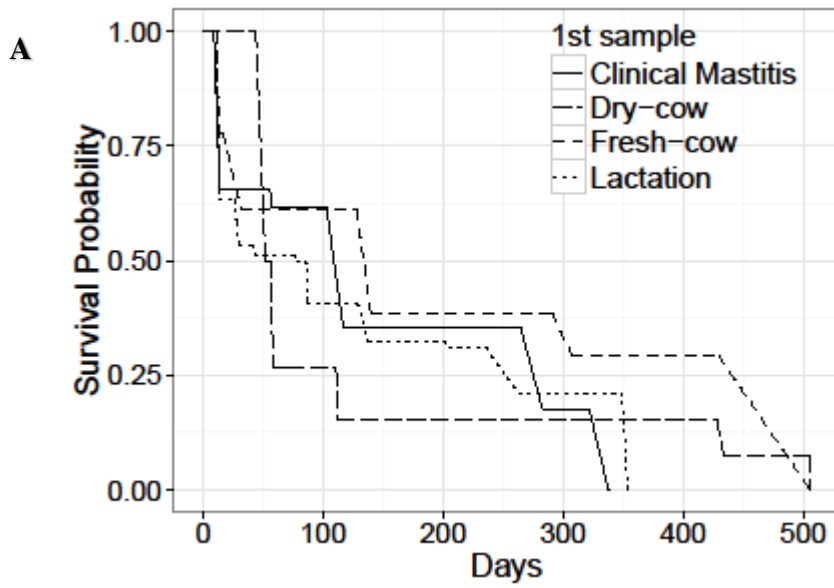
( $p < 0.05$ ). The *spa* type t13401 is associated with an increased 350% in the possibility that the bacteria persist compared to the type *spa* t359 strains ( $p < 0.05$ ), and also an increase of 250% in the possibility that the bacteria persist compared to the type *spa* t529 strains ( $p < 0.05$ ).



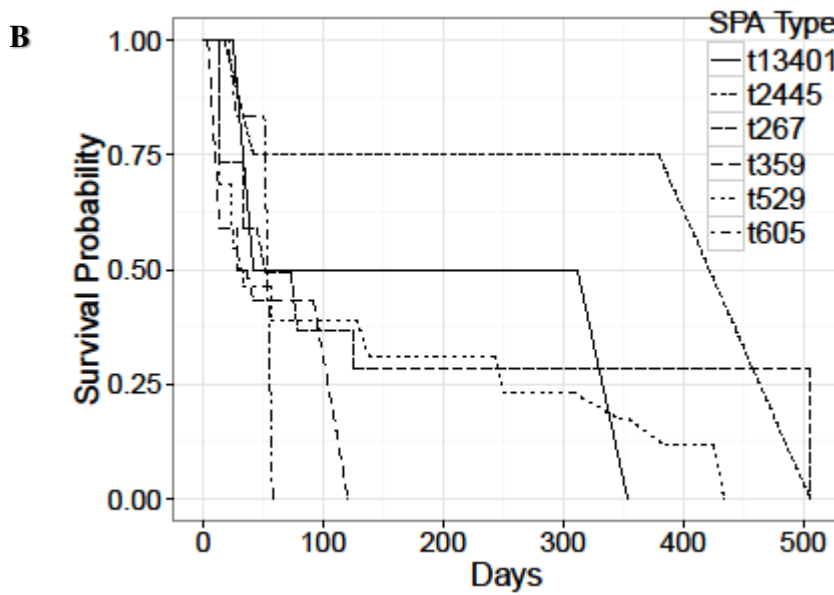
**Figure 4.** Kaplan-Meier plots of the survival probability and duration of IMIs (days) for (A) the strains which produce more biofilm than the overall median and the strains which produce less biofilm than the median, (B) the presence or absence of the *lukM* gene, and (C) the presence or absence of the *seg* gene.







**Figure 5.** Kaplan-Meier plots of the survival probability and duration of IMIs (days) for (A) the types of samples (first sample of the quarter series), and (B) the major *spa* types.



## DISCUSSION

Currently, the main information that a dairy producers receive when a milk culture bacteriology is performed on quarter milk samples is the species of bacteria that is found. This information is helpful but for *S. aureus* IMI, it guides poorly the dairy producer and the accompanying veterinarian in the decision to either treat the *S. aureus* IMI or to cull the infected animal. The objectives of this study was to identify the genotypic and phenotypic characteristics of *S. aureus* strains that could be associated to clinical mastitis or subclinical mastitis or that could be used to predict the duration of *S. aureus* IMIs.

The *spa* typing method is frequently used to characterize *S. aureus*. Previous studies compared it to other typing methods such as PFGE and found that *spa* typing to be as good to discriminate *S. aureus* strains of different clonal origins (Koreen et al., 2004). A study even found that the *spa* typing had more discriminatory power than other techniques for typing of MSSA strains (Rodriguez et al., 2015). The *spa* types found in the present study were similar to those found in other studies conducted on the bovine IMIs in Canada (Veh et al., 2015; Said et al., 2010). The three main *spa* types encountered in this work (t529, t267 and t359) were also recovered from other IMI cases around the world (Bar-Gal et al., 2015; Cremonesi et al., 2015). The present work additionally associated some genotypic and phenotypic features to specific *spa* types, like the high percentage of *seg* positive strains among t529. The ability to produce biofilms *in vitro* was also different between *spa* types.

Biofilm production allows bacteria to tolerate a multitude of stresses. It provides protection against antibiotics unable to reach the lower layer of the biofilm (Davies, 2003). The lower layer is also populated with bacteria with a slower metabolism and serves has a reservoir to rebuild the biofilm after damage (Huang et al., 1995). The immune system of the host is also severely impaired by the presence of biofilm (Hernández-Jiménez et al., 2013; Domenech et al., 2013). Here, the virulence gene *seg* was strongly associated with lower

biofilm production. The same observation was made with the other virulence genes *tst* and *lukM*. Overall, the presence of these virulence genes is associated with a lower production of biofilm. An intriguing result found in the logistic regression of the case-control study was that higher production biofilm strains were more at risk to cause clinical symptoms (clinical mastitis). The strains causing clinical mastitis signs had 1.5 more chance to persist than strains from the lactation series with only subclinical mastitis signs. Whether or not biofilm facilitates persistence which in turn provokes clinical symptoms needs to be investigated further.

The leukocidin FM' is a leukocidin mostly present in bovine strains of *S. aureus* (Haveri et al., 2007; Hata et al., 2008). Recently, Vrieling et al. (2015) demonstrated that the leukocidin FM' specifically targets the CRR1 receptor, which is abundant in the bovine neutrophils. Leukocidin FM' is very effective against bovine neutrophils. When comparing *S. aureus* strains from clinical and subclinical cases, we found that the clinical series had a higher percentage of *lukM* positive strains (94% vs 80%). The presence of *lukM* alone does not induce an immune response (Fromageau et al., 2011), but the presence of the leukocidin may help in the establishment of the infection. The *spa* types that mostly do not have the *lukM* gene produce more biofilm. This may indicate that there is more than one efficient strategy for establishing an IMI: biofilm producers may need the leukocidin to protect themselves from the immune system of the host, whereas high biofilm producers may succeed without the presence of such a virulence factor.

Several studies have attempted to identify the critical factor that would allow to discriminate *S. aureus* strains causing clinical signs from those causing only subclinical mastitis (Le Maréchal et al., 2011; Wolf et al., 2011; Ote et al., 2011). In this study, the characteristics of strains from quarter milk series with at least one clinical event were compared to strains from the quarter milk series without any clinical mastitis event. Also, for the first time, a wide range of *S. aureus* strains and sample types has been used in a time survival analysis in an attempt to associate strain characteristics with the duration of IMIs. However, the difficulty in regards to the survival analysis was that the 4 longitudinal

studies previously performed to investigate bovine IMIs among Canadian dairy farms across Canada (Reyher et al, 2011) was not initially designed to completely support this type of analysis. Each quarter milk series was reconstructed in a chronological order to then be used in a time survival analysis. Therefore, time gaps between the sampling varied very much and unaccountable events could have happened during those significant time gaps. For example, between two samplings, the infection could have cured and a new infection have occurred with the same strain or a new strain. If that was the case, the duration of infection would be falsely overestimated if it was with the same strain. Even with such restrictions, the time survival analysis gives us insights into what the characteristics of strains that are more prone to persist than others.

In a previous study by our team, enterotoxins G and C (*seg* and *sec*) were correlated with a lesser probability of the strains to persistence (69.0%) during the lactation period (Veh et al., 2015). In the present study, only *seg* was amplified because of the likelihood chance that both enterotoxins would be located on the same enterotoxin gene cluster (*egc*) found on the genomic island (Wolf et al., 2011; Piccinini et al., 2012; Ote et al., 2011). Furthermore, Veh et al (2015), found that the propability of persistence was about the same for strains having both *sec* and *seg* varies only the *seg* gene. In that study, the persistence was evaluated during the lactation period or the dry-off period; these are generally shorter periods than those investigated in the present study. In our study, the duration of infection could be set in numerical value (numbers of days infected) and was observed over a longer period of time. By observing a longer period of infection, the *seg* gene did not appear to be associated with reduction of the overall persistence of the *S. aureus* strains.

The time survival analysis was applied to the sample types based on the first strain of the series to find any distinction in the duration of IMIs. The only difference detected with the time survival analysis was that strains isolated from fresh cows were 2.2 times more likely to persist in comparison to the strains isolated from dry cows. This observation may be due to selective pressure on these strains because strains from dry cows most likely were exposed to antibiotic treatment, decreasing their chance of persistence. The duration of

infection of low biofilm producers (relative to the median production of all strains) was compared to those of high biofilm producers. In these conditions, the biofilm production alone was a poor predictor of persistence. Also, survival rates were not impaired by the presence of virulence factor *seg*, *lukM*, or *tst*.

Differences were only observed in the final logistic regression model which combines all the variables in one statistical test. This indicates that multiple variable must be considered to determine the duration of infection by a particular *S. aureus* strain. In the multivariable logistic regression model, strains coming from clinical and fresh-cow series were more persistent than strains coming from lactation series. Some studies showed that a higher SCC increases the chance of persistence of the infection (Pinzón-Sánchez and Ruegg, 2011). We also found this pattern for persistent strains that have higher log SCC compared to strains that were eliminated (6.6 log vs 6.0 log cells/ml, respectively,  $p < 0.005$ ). Furthermore, the SCC measured from the samples of these strains were also higher than the SCC of the lactation series which may explain the higher likelihood of persistence for these strains.

Interestingly, the logistic regression model showed that strains with *spa* types t529 and t359 were more at risk of being eliminated than those of *spa* type t13401. Those two *spa* type strains possess more virulence genes and produce less biofilm than t13401. Additional factors could influence the persistence of strains. Our support that that *spa* types could be appropriate to identify persistent strains, however more data on the duration of infection would be warranted. For this purpose, a prospective study with the goal of sampling quarters from the first lactation to the third lactation at regular intervals would create a survival analysis with better follow-up intervals and thus produce a more accurate analysis. This approach would eliminate the also be no more bias associated to the type of sample.

Also some methodological adjustments could be made to produce results which would better mimic mammary gland infections. Here, the evaluation of biofilm production was conducted in vitro using a bacterial growth medium supplemented with glucose. It would

be interesting to produce the biofilm in a broth that mimics the host environment. The method could be adapted by either replacing glucose by lactose, which is present in the host environment or using milk as the growth medium.

Clearly, the duration of infection according to the *spa* types should be further investigated as a prognostic tool to help udder health management decision-making. The cow's genetic and immune status should also be considered as determining factors in future studies.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This research was supported by a contribution from the Dairy Research Cluster initiative [Dairy Farmers of Canada (Ottawa, ON, Canada), Agriculture and Agri-Food Canada (Ottawa, ON, Canada), and the Canadian Dairy Commission (Ottawa, ON, Canada)] through the Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network (St-Hyacinthe, QC, Canada). This project was also partially funded by the *Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale (Op+Lait)* supported by the FRQNT, the *Fonds de Recherche du Québec, Nature et Technologies* (St-Hyacinthe, Québec, Canada). S.P.-J. and M.C. obtained a studentship from Op+Lait, G.M. from the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, D.B.B. and E.D. from the NSERC CREATE milk quality. Finally, we thank Eric Frost and Sophie Michaud for access to the Bionumerics software and databases.

## **REFERENCES**

- Arciola, C.R., D. Campoccia, S. Ravaioli, and L. Montanaro. 2015. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5:1–10.
- Bar-Gal, G.K., S.E. Blum, L. Hadas, R. Ehricht, S. Monecke, and G. Leitner. 2015. Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy

- animals assessed by genotyping and virulence genes. *Vet. Microbiol.* 176:143–54.
- Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* (80-. ). 284:1318–1322.
- Cremonesi, P., F. Pozzi, M. Raschetti, G. Bignoli, E. Capra, H.U. Graber, F. Vezzoli, R. Piccinini, B. Bertasi, S. Biffani, B. Castiglioni, and M. Luini. 2015. Genomic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains associated with high within-herd prevalence of intramammary infections in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:6828–6838.
- Davies, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:114–22.
- Dinges, M.M., P.M. Orwin, and P.M. Schlievert. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:16–34.
- Domenech, M., E. Ramos-Sevillano, E. Garcia, M. Moscoso, and J. Yuste. 2013. Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 81:2606–2615.
- Feil, E.J., J.E. Cooper, H. Grundmann, D.A. Robinson, M.C. Enright, T. Berendt, S.J. Peacock, J.M. Smith, M. Murphy, B.G. Spratt, C.E. Moore, and N.P.J. Day. 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J. Bacteriol.* 185:3307–16.
- Fromageau, A., P. Cunha, F.B. Gilbert, and P. Rainard. 2011. Purified *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM/F' does not trigger inflammation in the bovine mammary gland. *Microb. Pathog.* 51:396–401.
- Fromageau, A., F.B. Gilbert, G. Prévost, and P. Rainard. 2010. Binding of the *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM to its leucocyte targets. *Microb. Pathog.* 49:354–362.
- Halasa, T., K. Huijps, O. Østerås, and H. Hogeveen. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet. Q.* 29:18–31.
- Hata, E., K. Katsuda, H. Kobayashi, K. Nishimori, I. Uchida, M. Higashide, E. Ishikawa, T. Sasaki, and M. Eguchi. 2008. Bacteriological characteristics of *Staphylococcus*

- aureus* isolates from humans and bulk milk. *J. Dairy Sci.* 91:564–569.
- Haveri, M., A. Roslöf, L. Rantala, and S. Pyörälä. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J. Appl. Microbiol.* 103:993–1000.
- Hernández-Jiménez, E., R. Del Campo, V. Toledano, M.T. Vallejo-Cremades, A. Muñoz, C. Largo, F. Arnalich, F. García-Rio, C. Cubillos-Zapata, and E. López-Collazo. 2013. Biofilm vs. planktonic bacterial mode of growth: which do human macrophages prefer? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441:947–52.
- Huang, C.T., F.P. Yu, G.A. McFeters, and P.S. Stewart. 1995. Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2252–2256.
- Huang, J., and J.A. Wellner. 1997. Interval censored survival data: a review of recent progress. *Proc. First Seattle Symp.* 1–47.
- Koreen, L., S. V Ramaswamy, E.A. Graviss, S. Naidich, J.M. Musser, and B.N. Kreiswirth. 2004. spa Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates : Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation spa Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates :
- Le Maréchal, C., N. Seyffert, J. Jardin, D. Hernandez, G. Jan, L. Rault, V. Azevedo, P. François, J. Schrenzel, M. van de Guchte, S. Even, N. Berkova, R. Thiéry, J.R. Fitzgerald, E. Vauto, and Y. Le Loir. 2011. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS One.* 6.
- Mehrotra, M., G. Wang, W.M. Johnson, M. Mehrotra, G. Wang, and W.M. Johnson. 2000. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins , Exfoliative Toxins , Toxic Shock Syndrome Toxin 1 , and Methicillin Resistance,. *J. Clin. Microbiol.* 38:1032–1035.
- Melchior, M.B., H. Vaarkamp, and J. Fink-Gremmels. 2006. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *Vet. J.* 171:398–407.



- Novick, R.P. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* 48:1429–1449.
- Novick, R.P., and E. Geisinger. 2008. Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* 42:541–64.
- Ote, I., B. Taminiiau, J.N. Duprez, I. Dizier, and J.G. Mainil. 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 153:285–292.
- Otto, M. 2013. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* 64:175–88.
- Piccinini, R., R. Tassi, V. Daprà, R. Pilla, J. Fenner, B. Carter, and M.F. Anjum. 2012. Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. *J. Dairy Res.* 79:249–255.
- Pinzón-Sánchez, C., and P.L. Ruegg. 2011. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 94:3397–410.
- Reyher, K.K., S. Dufour, H.W. Barkema, L. Des Coteaux, T.J. DeVries, I.R. Dohoo, G.P. Keefe, J.P. Roy, and D.T. Scholl. 2011. The National Cohort of Dairy Farms-A data collection platform for mastitis research in Canada. *J. Dairy Sci.* 94:1616–1626.
- Robert, G. and, and C.J. Geyer. 2011. Maximum likelihood for interval censored data : and computation Consistency. *Biometrika.* 81:618–623.
- Rodriguez, M., P.G. Hogan, S.W. Satola, E. Crispell, T. Wylie, H. Gao, E. Sodergren, G.M. Weinstock, C.D. Burnham, and S.A. Fritz. 2015. Discriminatory Indices of Typing Methods for Epidemiologic Analysis of Contemporary *Staphylococcus aureus* strain. 94:1–8.
- Sabat, A., J. Krzyszton-Russjan, W. Strzalka, R. Filipek, K. Kosowska, W. Hryniewicz, J. Travis, and J. Potempa. 2003. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41:1801–1804.

- Said, K.B., J. Ismail, J. Campbell, M.R. Mulvey, A.-M. Bourgault, S. Messier, and X. Zhao. 2010. Regional profiling for determination of genotype diversity of mastitis-specific *Staphylococcus aureus* lineage in Canada by use of clumping factor A, pulsed-field gel electrophoresis, and spa typing. *J. Clin. Microbiol.* 48:375–86.
- Sun, J. 1996. A non-parametric test for interval-censored failure time data with application to AIDS studies. *Stat. Med.* 15:1387–1395.
- 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.
- Veh, K.A., R.C. Klein, C. Ster, G. Keefe, P. Lacasse, D. Scholl, J. Roy, and D. Haine. 2015. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. *J. Dairy Sci.* 1:1–14.
- Vrieling, M., K.J. Koymans, D. a C. Heesterbeek, P.C. Aerts, V.P.M.G. Rutten, C.J.C. De Haas, and K.P.M. Van Kessel. 2015. Bovine *Staphylococcus aureus* Secretes the Leukocidin LukMF' To Kill Migrating Neutrophils through CCR1. *MBio.* 6:e00335-15.
- Wolf, C., H. Kusch, S. Monecke, D. Albrecht, S. Holtfreter, C. von Eiff, W. Petzl, P. Rainard, B.M. Bröker, and S. Engelmann. 2011. Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin. *Proteomics.* 11:2491–2502.
- Zadoks, R.N., W.B. Van Leeuwen, D. Kreft, L.K. Fox, H.W. Barkema, Y.H. Schukken, and A. Van Belkum. 2002. Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Human Skin , Milking Equipment , and Bovine Milk by Phage Typing , Pulsed-Field Gel Electrophoresis , and Binary Typing. 40:3894–3902.

## CHAPITRE 3

### DISCUSSION

Dans cette étude, 587 isolats de *S. aureus* de provenance bovine ont été caractérisés de façon génotypique et phénotypique dans le but de trouver des facteurs bactériens associés propres aux mammites avec symptômes cliniques et aux mammites à longue durée d'infection.

Dans le but de déterminer quels facteurs influencent l'apparition de symptômes cliniques, une comparaison a été effectuée entre les séries d'isolats qui ne comportent aucun échantillon de mammite clinique et les séries avec au moins un cas de mammite clinique. La distribution des types *spa* était différente entre les deux groupes et la proportion d'isolats *lukM* positifs était plus élevée dans les cas de mammites cliniques. Malgré la différence significative de l'expression de *lukM* entre les deux séries, le pourcentage élevé de positifs dans les deux catégories ne nous permet pas d'utiliser seulement ce facteur pour identifier les souches pouvant causer des mammites cliniques. La régression logistique en fonction de ces paramètres indique que pour chaque log additionnel de biofilm, les chances d'avoir des signes cliniques augmentent de 97 %. Ce résultat est très intrigant, étant donné que le biofilm est associé aux infections sous-cliniques. Il est possible qu'une grande

formation de biofilm permette aux souches de survive plus longtemps dans leur hôte, ce qui donnerait de nombreuses opportunités pour causer des symptômes cliniques. Un moment opportun, par exemple, serait après une antibiothérapie au tarissement, qui élimine une partie du microbiote de la glande mammaire. D'autres observations doivent être effectuées pour confirmer et expliquer ce phénomène.

La durée d'infection a été comparée par analyse de survie selon chaque facteur étudié. Cette approche n'a donné aucun résultat significatif. Par contre, Le modèle finale de régression logistique, qui prend en compte tous les facteurs à la fois, a déterminé que le type *spa* t13401 a une durée d'infection accrue en comparaison avec les types *spa* t529 et t359. Cela démontre bien la facette multifactorielle de la mammite bovine. Le type d'échantillonnage a aussi été corrélé avec des durées d'infections différentes. Plus spécifiquement, les échantillons de lactation avaient moins de chance de persister en comparaison aux échantillons de vêlage et aux échantillons de mammites cliniques. Ce résultat serait dû au CCS élevé dans ces deux catégories d'échantillons. En effet, il est démontré dans la littérature que les mammites bovines avec des CCS élevés sont plus difficiles à éliminer que les mammites avec des CCS bas (Pinzón-Sánchez and Ruegg, 2011). Cette tendance a aussi été retrouvée dans notre modèle de régression logistique.

Plusieurs facteurs de virulence, tels que la possession de gènes de virulence (*seg*, *lukM*) et la formation de biofilm, sont corrélés au type *spa*. Une différence est observable dans la distribution des types *spa* pour l'apparition de symptômes cliniques et pour la durée d'infection.

Cela semble indiquer que le typage *spa* serait une méthode très utile pour quantifier plusieurs facteurs de la mammite bovine simultanément. Il serait possible d'orienter un outil de pronostique sur le typage *spa*.

## CONCLUSION

Dans cette étude, plusieurs facteurs ont été corrélés avec l'apparition de symptômes cliniques ou la durée de l'infection. La prévalence de la leucocidine F/M' est plus élevée chez les souches qui causent des mammites cliniques. Cela suggère une certaine importance de ce facteur dans l'apparition de symptômes cliniques. La formation de biofilm pourrait aussi avoir un rôle dans l'apparition de symptômes cliniques. La durée d'infection, la formation de biofilm et la possession de facteurs de virulence étaient significativement différentes pour certains types *spa*.

Le typage *spa* semble une technique prometteuse pour sa rapidité d'exécution, sa clarté et pour l'obtention d'informations sur la souche de mammite bovine. Une caractérisation plus poussée des types *spa* serait requise pour permettre le développement d'un outil pronostique basé sur le typage *spa*. Pour évaluer la durée d'infection, un échantillonnage avec pour seul but de déterminer le temps d'infection précis serait très intéressant. Cet échantillonnage devra prendre des échantillons de lait toutes les 2 semaines dès la première lactation. Avec un suivi plus étroit des vaches durant leur cycle de lactation, un temps d'infection plus précis pourrait être obtenu et de meilleures corrélations pourraient être effectuées.

## BIBLIOGRAPHIE

- Andrey, D.O., A. Renzoni, A. Monod, D.P. Lew, A.L. Cheung, and W.L. Kelley. 2010. Control of the *Staphylococcus aureus* toxic shock tst promoter by the global regulator SarA. *J. Bacteriol.* 192:6077–6085.
- Barbu, E.M., C. Mackenzie, T.J. Foster, and M. Höök. 2014. SdrC induces staphylococcal biofilm formation through a homophilic interaction. *Mol. Microbiol.* 94:172–185.
- Barrio, M.B., P. Rainard, and G. Prévost. 2006. LukM/LukF'-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. *Microbes Infect.* 8:2068–2074.
- Budri, P.E., N.C.C. Silva, E.C.R. Bonsaglia, A.F. Júnior, J.P.A. Júnior, J.T. Doyama, J.L. Gonçalves, M. V Santos, D. Fitzgerald-Hughes, and V.L.M. Rall. 2015. Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. *J. Dairy Sci.* 98:1–6.
- Bush, K., J. Leal, S. Fathima, V. Li, D. Vickers, L. Chui, M. Louie, G. Taylor, and E. Henderson. 2015. The molecular epidemiology of incident methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cases among hospitalized patients in Alberta, Canada: a retrospective cohort study. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 4:35.
- Cameron, M., G.P. Keefe, J.-P. Roy, H. Stryhn, I.R. Dohoo, and S.L. McKenna. 2015. Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: Milk yield and somatic cell count in the subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 98:2427–36.
- Cameron, M., S.L. McKenna, K. a MacDonald, I.R. Dohoo, J.P. Roy, and G.P. Keefe. 2014. Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: risk of postcalving intramammary infection and clinical mastitis in the subsequent lactation.

*J. Dairy Sci.* 97:270–84.

- Capuco, A. V., and S. Ellis. 2005. Bovine mammary progenitor cells: Current concepts and future directions. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 10:5–15.
- Cremonesi, P., F. Pozzi, M. Raschetti, G. Bignoli, E. Capra, H.U. Graber, F. Vezzoli, R. Piccinini, B. Bertasi, S. Biffani, B. Castiglioni, and M. Luini. 2015. Genomic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains associated with high within-herd prevalence of intramammary infections in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:6828–6838.
- Cue, D., M.G. Lei, and C.Y. Lee. 2012. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Front.Cell.Infect.Microbiol.* 2:38.
- Davies, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:114–22.
- Dinges, M.M., P.M. Orwin, and P.M. Schlievert. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:16–34,
- van Duijkeren, E., P. Hengeveld, T.P. Zomer, F. Landman, T. Bosch, A. Haenen, and A. van de Giessen. 2015. Transmission of MRSA between humans and animals on duck and turkey farms. *J. Antimicrob. Chemother.* dkv313.
- Faires, M.C., D.L. Pearl, O. Berke, R.J. Reid-Smith, and J.S. Weese. 2013. The identification and epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* in patient rooms and the ward environment. *BMC Infect. Dis.* 13:342.
- Feil, E.J., J.E. Cooper, H. Grundmann, D.A. Robinson, M.C. Enright, T. Berendt, S.J. Peacock, J.M. Smith, M. Murphy, B.G. Spratt, C.E. Moore, and N.P.J. Day. 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J. Bacteriol.* 185:3307–16.
- Ferreira, F.A., R.R. Souza, R.R. Bonelli, M.A. Américo, S.E.L. Fracalanza, and A.M.S. Figueiredo. 2012. Comparison of in vitro and in vivo systems to study ica-independent *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Microbiol. Methods.* 88:393–398.
- Fisher, J.F., S.O. Meroueh, and S. Mobashery. 2005. Bacterial resistance to beta-lactam



antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem. Rev.* 105:395–424.

Fitzpatrick, F., H. Humphreys, and J.P. O’Gara. 2005. Evidence for *icaADBC* - independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43:1973–1976.

Fromageau, A., P. Cunha, F.B. Gilbert, and P. Rainard. 2011. Purified *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM/F’ does not trigger inflammation in the bovine mammary gland. *Microb. Pathog.* 51:396–401.

Fromageau, A., F.B. Gilbert, G. Prévost, and P. Rainard. 2010. Binding of the *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM to its leucocyte targets. *Microb. Pathog.* 49:354–362.

Geoghegan, J.A., R.M. Corrigan, D.T. Gruszka, P. Speziale, J.P. O’Gara, J.R. Potts, and T.J. Foster. 2010. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 192:5663–5673.

Godden, S. 2008. Colostrum Management for Dairy Calves. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 24:19–39.

Golubchik, T., E.M. Batty, R.R. Miller, H. Farr, B.C. Young, H. Larner-Svensson, R. Fung, H. Godwin, K. Knox, A. Votintseva, R.G. Everitt, T. Street, M. Cule, C.L.C. Ip, X. Didelot, T.E.A. Peto, R.M. Harding, D.J. Wilson, D.W. Crook, and R. Bowden. 2013. Within-Host Evolution of *Staphylococcus aureus* during Asymptomatic Carriage. *PLoS One.* 8:1–14.

Gomez, P., C. Lozano, D. Gonzalez-Barrio, M. Zarazaga, F. Ruiz-Fons, and C. Torres. 2015. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in a semi-extensive red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) farm in Southern Spain. *Vet Microbiol.* 177:326–331.

Gorewit, R.C. 1988. Lactation biology and methods of increasing efficiency, *Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace.* page 208-220

Halasa, T., M. Nielsen, a C. Whist, and O. Osterås. 2009. Meta-analysis of dry cow

management for dairy cattle. Part 1. Protection against new intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 92:3150–7.

Haveri, M., A. Roslöf, L. Rantala, and S. Pyörälä. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J. Appl. Microbiol.* 103:993–1000.

Henderson, A.C., C.D. Hudson, A.J. Bradley, V.E. Sherwin, and M.J. Green. 2016. Prediction of intramammary infection status across the dry period from lifetime cow records. *J. Dairy Sci.* 99:1–10.

Houston, P., S.E. Rowe, C. Pozzi, E.M. Waters, and J.P. O’Gara. 2011. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect. Immun.* 79:1153–1165.

Kaplan, J.B., K. LoVetri, S.T. Cardona, S. Madhyastha, I. Sadovskaya, S. Jabbouri, and E.A. Izano. 2012. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J. Antibiot. (Tokyo).* 65:73–7.

Koreen, L., S. V Ramaswamy, E.A. Graviss, S. Naidich, J.M. Musser, and B.N. Kreiswirth. 2004. spa Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates : Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation spa Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates : Implications for Us.

Leslie, K.E., and C.S. Petersson-Wolfe. 2012. Assessment and Management of Pain in Dairy Cows with Clinical Mastitis. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 28:289–305.

M. J. Green, A. J. Bradley, G. F. Medley, and W.J.B. 2008. Cow, Farm, and Herd Management Factors in the Dry Period Associated with Raised Somatic Cell Counts in Early Lactation. *J. Dairy Sci.* 91:1403–1415.

Miko, B. a, C. a Hafer, C.J. Lee, S.B. Sullivan, M. a M. Hackel, B.M. Johnson, S. Whittier, P. Della-Latta, A.-C. Uhlemann, and F.D. Lowy. 2013. Molecular characterization of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates in

- the United States, 2004 to 2010. *J. Clin. Microbiol.* 51:874–9.
- Mitra, S.D., D. Velu, M. Bhuvana, N. Krithiga, a Banerjee, R. Shome, H. Rahman, S.K. Ghosh, and B.R. Shome. 2013. Staphylococcus aureus spa type t267, clonal ancestor of bovine subclinical mastitis in India. *J. Appl. Microbiol.* 114:1604–15.
- Mordmuang, A., and S.P. Voravuthikunchai. 2015. Rhodomyrtus tomentosa (Aiton) Hassk. leaf extract: An alternative approach for the treatment of staphylococcal bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 102:242–246.
- Neville, M.C., T.B. McFadden, and I. Forsyth. 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 7:49–66.
- Novick, R.P. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* 48:1429–1449.
- Novick, R.P., and E. Geisinger. 2008. Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* 42:541–64.
- Olde Riekerink, R.G.M., H.W. Barkema, D.F. Kelton, and D.T. Scholl. 2008. Incidence Rate of Clinical Mastitis on Canadian Dairy Farms. *J. Dairy Sci.* 91:1366–1377.
- Otto, M. 2013. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* 64:175–88.
- Otto, M. 2014. Phenol-soluble modulins. *Int. J. Med. Microbiol.* 304:164–9.
- Peeters, L.E.J., M.A. Argudín, S. Azadikhah, and P. Butaye. 2015. Antimicrobial resistance and population structure of Staphylococcus aureus recovered from pigs farms. *Vet. Microbiol.* 180:151–156.
- Periasamy, S., H.-S. Joo, A.C. Duong, T.-H.L. Bach, V.Y. Tan, S.S. Chatterjee, G.Y.C. Cheung, and M. Otto. 2012. How Staphylococcus aureus biofilms develop their characteristic structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:1281–6.
- Peschel, A., and M. Otto. 2016. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. 116:1477–1490.
- Pinzón-Sánchez, C., and P.L. Ruegg. 2011. Risk factors associated with short-term post-

treatment outcomes of clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 94:3397–410.

- Porter, J., J. Anderson, L. Carter, E. Donjacour, and M. Paros. 2016. In vitro evaluation of a novel bacteriophage cocktail as a preventative for bovine coliform mastitis. *J. Dairy Sci.* 99:2053–2062.
- Proft, T., and J. Fraser. 2003. Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol* 299-306
- Rabot, A., F. Sinowatz, B. Berisha, H.H.D. Meyer, and D. Schams. 2007. Expression and localization of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in the bovine mammary gland during development, function, and involution. *J. Dairy Sci.* 90:740–748.
- Rachid, S., K. Ohlsen, U. Wallner, J. Hacker, M. Hecker, W. Ziebuhr, and R.G. Hacker. 2000. Alternative Transcription Factor  $\zeta$  B Is Involved in Regulation of Biofilm Expression in a Staphylococcus aureus Mucosal Isolate Alternative Transcription Factor B Is Involved in Regulation of Biofilm Expression in a Staphylococcus aureus Mucosal Isolate. *Society.* 182:1–4.
- 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.* 94:1616–26.
- Rodriguez, M., P.G. Hogan, S.W. Satola, E. Crispell, T. Wylie, H. Gao, E. Sodergren, G.M. Weinstock, C.D. Burnham, and S.A. Fritz. 2015. Discriminatory Indices of Typing Methods for Epidemiologic Analysis of Contemporary Staphylococcus aureus Strains. 94:1–8.
- Royster, E., and S. Wagner. 2015. Treatment of Mastitis in Cattle. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 31:17–46.
- Saini, V., J.T. McClure, D. Léger, S. Dufour, a G. Sheldon, D.T. Scholl, and H.W. Barkema. 2012. Antimicrobial use on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 95:1209–21.
- Saini, V., J.T. McClure, D.T. Scholl, T.J. DeVries, and H.W. Barkema. 2013. Herd-level relationship between antimicrobial use and presence or absence of antimicrobial

resistance in gram-negative bovine mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 96:4965–76.

Schmelcher, Mathias, Anne M. Powell, Mary J. Camp, Calvin S. Pohl, and D.M.D. 2015. Synergistic streptococcal phage  $\lambda$ SA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis. 33:395–401.

Schwartz, D.C., and C.R. Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37:67–75.

Schwartz, K., M. Ganesan, D.E. Payne, M.J. Solomon, and B.R. Boles. 2015. Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Mol. Microbiol.* n/a-n/a.

Shopsin, B., M. Gomez, S.O. Montgomery, D.H. Smith, M. Waddington, D.E. Dodge, D. a. Bost, M. Riehman, S. Naidich, and B.N. Kreiswirth. 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 37:3556–3563.

Speziale, P., G. Pietrocola, T.J. Foster, and J. a Geoghegan. 2014. Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:171.

Traversa, A., G.R. Gariano, S. Gallina, D.M. Bianchi, and R. Orusa. 2015. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and wild animal carcasses in Italy. *Food Microbiol.* 52:154–158.

Tucker, H.A. 2000. SYMPOSIUM: HORMONAL REGULATION OF MILK SYNTHESIS Hormones, Mammary Growth, and Lactation: a 41-Year Perspective. 1–11.

Vangroenweghe, F., L. Duchateau, P. Boutet, P. Lekeux, P. Rainard, M.J. Paape, and C. Burvenich. 2005. Effect of carprofen treatment following experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in primiparous cows. *J. Dairy Sci.* 88:2361–76.

Veh, K.A., R.C. Klein, C. Ster, G. Keefe, P. Lacasse, D. Scholl, J. Roy, and D. Haine. 2015. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during

lactation or the dry period. *J. Dairy Sci.* 1:1–14.

Vergara-Irigaray, M., J. Valle, N. Merino, C. Latasa, B. García, I.R. De Los Mozos, C. Solano, A. Toledo-Arana, J.R. Penadés, and I. Lasa. 2009. Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. *Infect. Immun.* 77:3978–3991.

Vrieling, M., K.J. Koymans, D. a C. Heesterbeek, P.C. Aerts, V.P.M.G. Rutten, C.J.C. De Haas, and K.P.M. Van Kessel. 2015. Bovine *Staphylococcus aureus* Secretes the Leukocidin LukMF<sup>7</sup> To Kill Migrating Neutrophils through CCR1. *MBio.* 6:e00335-15.

