

2m11.2823.7

Université de Montréal

Démonstration de la présence de l'agent de la mammite bovine
***Staphylococcus aureus*, au niveau intracellulaire, dans les cellules alvéolaires**
et les macrophages de la glande mammaire.

Par

Alexandre Hébert

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

en microbiologie et immunologie

Juin, 2000

©Alexandre Hébert, 2000



1944 2822.7

Université de Montréal

Démonstration de la présence de l'acide de la membrane protéique

géophysicochimie moderne, au niveau intermédiaire, dans les cellules vivantes

et les microorganismes de la grande mammifère.

W
4
W58
2000
N. 096



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Démonstration de la présence de l'agent de la mammité bovine
Staphylococcus aureus, au niveau intracellulaire, dans les cellules alvéolaires
et les macrophages de la glande mammaire.**

Présenté par

Alexandre Hébert

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jacques Thibodeau	Président du jury
Dr Jaqueline Lagacé	Directrice de recherche
Dr Pascal Dubreuil	Co-directeur de recherche
Dr Jean Barbeau	Membre du jury

Mémoire accepté le 21.09.2000

SOMMAIRE

Les pertes de production engendrées par la mammite bovine représentent le problème le plus coûteux pour l'entreprise laitière. Il s'agit de la maladie la plus fréquente chez la vache laitière et elle représente approximativement 70% des pertes totales du producteur laitier (Lescourret et Coulon, 1994). La baisse de production laitière, le remplacement des vaches infectées et les frais vétérinaires sont autant de facteurs contribuant aux coûts énormes engendrés par cette maladie (DeGraves et Fetrow, 1993).

Deux hypothèses principales sont susceptibles d'expliquer la chronicité et la persistance de ce type d'infection : 1) la formation d'un biofilm par les bactéries qui causent la mammite bovine; 2) la pénétration et la survie des bactéries qui causent la mammite bovine et plus particulièrement *Staphylococcus aureus* dans les cellules alvéolaires et/ou les macrophages. Il faut souligner que *Staphylococcus aureus* n'est généralement pas considéré comme une bactérie pathogène intracellulaire. Par contre, de nombreuses études confirment que *Staphylococcus aureus* peut pénétrer, survivre et se multiplier à l'intérieur des cellules phagocytaires non-professionnelles en culture. La possibilité de maintenir une niche intracellulaire peut promouvoir une colonisation à long terme et aussi jouer un rôle dans la persistance d'une infection chronique (Bayles et coll., 1998; Dziwanowska et coll., 1999; Lammers et coll., 1999; Wesson et coll., 1998).

Le but de ce travail est de démontrer la présence de *Staphylococcus aureus* dans les cellules alvéolaires et les macrophages fraîchement isolés du lait de vaches mammites infectées de façon naturelle.

Pour atteindre cet objectif, nous avons développé, dans un premier temps, un traitement efficace pour les cellules isolées du lait dans le but d'éliminer tout ADN et/ou bactéries exogènes. Par la suite, à l'aide d'amorces universelles visant l'ensemble des eubactéries, nous avons utilisé la technique du PCR pour démontrer la présence intracellulaire d'ADN bactérien à partir de cellules présentes dans le lait infecté par *Staphylococcus aureus*. Une troisième étape a consisté à identifier des anticorps capables de reconnaître et de permettre l'isolement par la technique de cytométrie en flux (FACS) des cellules alvéolaires et des macrophages bovins. Par la suite, nous avons confirmé, par hybridation des produits d'amplification du PCR avec une sonde maison spécifique à l'ADN au genre Staphylocoque, la présence de *Staphylococcus aureus* dans les cellules alvéolaires et les macrophages isolés à partir du lait mammitique. Finalement, l'internalisation de *Staphylococcus aureus* vivant, retrouvé dans 100% des échantillons contenant les macrophages et 60% des échantillons contenant les cellules alvéolaires isolés par FACS, a été mise en évidence suite à l'étalement sur gélose de ces cellules préalablement lysées.

En conclusion, notre travail a permis de démontrer, pour la première fois, la présence intracellulaire de *Staphylococcus aureus* et de son ADN dans les cellules alvéolaires et les macrophages isolés à partir du lait de vaches ayant contracté de façon naturelle une mammité chronique à *Staphylococcus aureus*. Ce

travail confirme les études antérieures effectuées *in vitro* et suggère que la chronicité de telles infections qui résistent à l'antibiothérapie repose en partie sur la présence intracellulaire de *Staphylococcus aureus* dans les cellules alvéolaires qui sécrètent le lait ainsi que dans les macrophages.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTES DES FIGURES	ix
ABRÉVIATIONS	x
DÉDICACE	xii
REMERCIEMENTS	xiii
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
Introduction	1
1. Mammite bovine	2
1.1. Définition de la mammite	2
1.2. Types de mammite	2
1.2.1. Mammite subclinique	2
1.2.2. Mammite clinique	3
1.2.3. Mammite chronique	3
2. Organismes pathogènes	4
2.1. Pathogènes contagieux majeurs	5
2.2. Pathogènes environnementaux majeurs	6
2.3. Pathogènes mineurs	6
3. Pertes économiques associées à la mammite	7

3.1. Cellules somatiques : pertes associées et qualité du lait	8
3.2. Facteurs affectant la susceptibilité de la vache aux infections	9
4. Méthodes de diagnostic de la mammite	9
5. Mécanismes de défense de la vache contre les infections	10
5.1. Mécanismes de défense non-spécifiques	10
5.1.1. Barrière physiques	10
5.1.2. Système du complément	11
5.1.3. Phagocytose	12
5.1.3.1. Cellules phagocytaires	12
5.1.3.2. Opsonisation	14
5.2. Mécanismes de défense spécifiques	15
5.2.1. Lymphocytes B	15
5.2.2. Lymphocytes T	15
6. Traitement de la mammite	16
7. Mécanismes susceptibles d'expliquer la résistances des bactéries	17
7.1. Formation du biofilm	18
7.2. Internalisation de <i>S. aureus</i> dans les cellules alvéolaires	20
8. Approche expérimentale pour l'étude de la mammite	24
8.1. Cytométrie en flux	24
8.1.1. Récepteur de surface des monocytes et macrophages bovins	26
8.1.2. Récepteurs de surface des cellules épithéliales bovines	26
9. Objectifs expérimentaux	29

CHAPITRE 2 : ARTICLE	31
2.1 Title	32
2.2 Abstract	33
2.3. Introduction	34
2.4. Materials ans Methods	35
2.5. Results	39
2.6. Discussion	41
2.7. Acknowledgements	44
2.8. References	45
2.9. Figures and tables	48
DISCUSSION ET CONCLUSION	55
BIBLIOGRAPHIE	64

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les différentes étapes de la formation du biofilm	19
Figure 2 : Le modèle résume les voies possibles de <i>Staphylococcus aureus</i> une fois libre dans le cytoplasme des MAC-T	23

ABRÉVIATIONS

AcM : anticorps monoclonal

BMEC : «bovine mammary epithelial cell»

BMGE : «bovine mammary gland epithelial»

CCS : comptage des cellules somatiques

CD : «cluster of differentiation»

CMF : cytométrie en flux

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

coll. : collaborateurs

CPAs : cellule présentatrice d'antigène professionnelles

DMPC : «dimyristoyl phosphatidylcholine»

DMPG : «dimyristoyl phosphatidylglycerol»

DOPE : «dioleoylphosphatidylethanolamine»

DOTMA : «N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride»

FACS : «fluorescence activated cell sorting»

FITC : «fluorescein isothiocyanate»

FSC : «forward scatter»

ica : «intercellular adhesin gene cluster»

IFN : interféron

Ig : immunoglobuline

IIM : infection intramammaire

LBP : «LPS binding protein»

LPS : lipopolysaccharide

MAC-T : «mammary alveolar cell with large T-antigen»

MET : microscopie électronique à transmission

MoAb : «monoclonal antibody»

PBS : «phosphate buffered saline»

PCR : «polymerase chain reaction»

PE : «phycoerythrin»

PIA : «polysaccharide intercellular adhesin»

PMN : polymorphonucléaire

SSC : «side scatter»

SCVs : «small colony variants»

T_H^1 : cellules T CD4 inflammatoires

T_H^2 : cellules T CD4 auxiliaires

TNF : facteur de nécrose de tumeur

DÉDICACE

À mes parents, Lise et Gilles, pour leur support et pour m'avoir enseigné trois principes fondamentaux : la persévérance, l'intégrité et le courage.

À ma fiancée Diane, pour sa compréhension, ses encouragements et surtout pour son amour.

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord exprimer toute ma gratitude envers le Dr Jacqueline Lagacé, ma directrice de mémoire. Elle a su me transmettre sa passion pour la recherche et son souci du travail bien fait. Par son enseignement rigoureux, elle m'a guidé dans mon cheminement intellectuel. Grâce à elle, mes études de maîtrise furent une expérience fort enrichissante.

Le Dr Pascal Dubreuil, mon codirecteur, pour sa disponibilité, ses conseils et ses connaissances. Aussi pour m'avoir enseigné à traire les vaches !!!

et M. Serge Sénéchal, technicien en charge de la cytofluorométrie, pour sa très grande disponibilité, ses mille et un conseils et son amitié. OSU SENSEI

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Introduction

L'expression «mastitis» ou mammite provient du terme grec «mama» signifiant mamelle alors qu'«itis» signifie inflammation. La mammite est une inflammation de la glande mammaire qui se caractérise habituellement par la présence de germes pathogènes dans le lait et par des dommages aux tissus internes de la glande en association avec une réaction inflammatoire (DeGraves et Fetrow, 1993).

La mammite bovine est la maladie engendrant le plus de pertes pour l'industrie laitière. Il s'agit de la maladie la plus fréquente chez la vache laitière et elle représente approximativement 70% des pertes totales du producteur laitier (Lescourret et Coulon, 1994). La baisse de production laitière, le remplacement des vaches infectées et les frais vétérinaires sont autant de facteurs contribuant aux coûts énormes engendrés par cette maladie (DeGraves et Fetrow, 1993).

C'est seulement au début des années 1980 que les chercheurs commencèrent à s'intéresser réellement à la mammite bovine. Depuis ce temps, les connaissances sur les mécanismes de défense immunitaire de la glande mammaire et les facteurs de virulence des bactéries causant cette infection ont progressé. Cependant, nous sommes encore loin d'être en mesure de contrôler cette infection (Sutra et Poutrel, 1994).

1. Mammite bovine

1.1. Définition de la mammite

La mammite bovine est habituellement une infection bactérienne de la glande mammaire qui induit le recrutement et l'activation de nombreux leucocytes. La multiplication bactérienne entraîne la production de toxines et l'activation du système immunitaire, ce qui engendre une inflammation de la glande. Cette infection glandulaire se traduit par une augmentation du taux des cellules somatiques dans le lait, une baisse de la production laitière et un changement dans la composition du lait. À long terme, si l'infection n'est pas éradiquée, ces changements deviennent irréversibles dus à la nécrose du tissu parenchymateux produisant le lait et à la fibrose de la mamelle (Kehrl et Shuster, 1994).

1.2. Types de mammite

1.2.1. Mammite subclinique

Tout d'abord, la mammite subclinique ou asymptomatique est la plus fréquente chez les vaches d'un troupeau. On décèle, dans le lait, la présence de germes pathogènes qui entraînent une réaction inflammatoire très discrète. Même si la glande mammaire paraît normale, les organismes infectieux envahissent les

cellules productrices du lait (cellules alvéolaires) et causent une inflammation qui se traduit par une augmentation du comptage des cellules somatiques (CCS). Dans le lait contaminé d'une mammite subclinique, le CCS est généralement supérieur à 500 000 cellules/mL comparativement à moins de 200 000 cellules/mL dans le lait non contaminé. La mammite subclinique est généralement associée aux bactéries *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus agalactiae* (Harmon, 1994).

1.2.2. Mammite clinique

La mammite est dite clinique quand les signes sont bien nets et les effets de l'inflammation de la glande mammaire sont si importants qu'il peuvent être visibles à l'œil nu. Comme dans la mammite subclinique, on remarque une baisse de la production laitière, des bactéries dans le lait et un changement dans la composition du lait. De plus, une mammite clinique à *Staphylococcus aureus* a presque toujours comme origine une infection subclinique (Vaarst et Enevoldsen, 1997).

1.2.3. Mammite chronique

Nous sommes en face d'un cas de mammite chronique lorsque les traitements d'antibiothérapie répétés ou prolongés ne viennent pas à bout de l'infection. La mammite chronique à *Staphylococcus aureus* est caractérisée par des réveils périodiques accompagnés d'une inflammation intense lorsque le

traitement est arrêté. À cause de la chronicité, elle provoque des lésions généralement irréversibles de la glande mammaire. Elle constitue une cause fréquente de réforme de la vache infectée, soit la vente de l'animal à l'abattoir, entraînant des pertes économiques considérables (Smith et Hogan, 1993).

2. Organismes pathogènes

La mammite est l'infection de la glande mammaire par des micro-organismes pathogènes. Les agents bactériens associés à la mammite ont été classifiés en deux groupes principaux selon leur niche écologique respective : les agents pathogènes «environnementaux» que l'on retrouve principalement dans l'environnement immédiat de la vache et les agents pathogènes «contagieux» qui sont étroitement associés à la glande mammaire et à la peau du trayon. L'infection de la glande mammaire par un pathogène «environnemental» peut se produire durant pratiquement toute la vie de la vache incluant la traite, entre la traite et pendant la période de tarissement. L'infection de la glande d'une vache par un pathogène «contagieux» se limite à la période de la traite (Smith et Hogan, 1993). À l'intérieur de chacun de ces groupes, on retrouve des agents pathogènes «majeurs» et «mineurs» selon l'importance de la réaction inflammatoire qu'ils engendrent (Cullen et Herbert, 1967; Schalm et coll., 1971).

2.1. Pathogènes contagieux majeurs

Les mammites contagieuses sont le plus fréquemment causées par les bactéries Gram-positif comme *Streptococcus agalactiae* et *Staphylococcus aureus* (Fox et Gay, 1993; Gudding et coll., 1984). Ces bactéries sont la cause d'environ 95% de toutes les mammites (Lawrence et coll., 1993).

L'habitat naturel de la bactérie *Streptococcus agalactiae* se limite à la glande mammaire et constitue le seul réservoir connu (Fox et Gay, 1993). Dans les troupeaux infectés par *Streptococcus agalactiae*, l'éradication est facilement réalisable par le traitement de tous les animaux infectés durant la lactation ou en début de période de tarissement. La presque totalité des souches bactériennes de *Streptococcus agalactiae* ne posent aucun problème de résistance aux antibiotiques (Messier et coll., 1994). Les chances de guérison se situent généralement au dessus de 90% suite à une antibiothérapie durant la lactation ou le tarissement (Erskine et Eberhart, 1990).

Les *Staphylococcus aureus*, qui démontrent une forte hémolyse (α et β) et qui possèdent les caractéristiques biochimiques de catalase positive et coagulase positive, sont considérées comme des pathogènes majeurs de la mammité bovine (Anderson, 1976; Watson et Prideaux, 1979; Watts, 1988). La glande mammaire ainsi que la peau du pis constituent le réservoir de *Staphylococcus aureus* (Lawrence et coll., 1993). L'éradication de *Staphylococcus aureus* d'un troupeau et le maintien de ce statut sont beaucoup plus difficiles à obtenir que dans le cas de

Streptococcus agalactiae. Pour une vache infectée par *Staphylococcus aureus*, les chances de guérison suite à une thérapie durant la lactation sont pratiquement nulles, tandis que les chances de guérison durant le tarissement sont au maximum de 30% si la vache est jeune par la suite les chances de guérison diminuent avec l'âge et la chronicité. De plus, il peut s'écouler jusqu'à 28 jours avant que *Staphylococcus aureus* puisse être isolé à nouveau dans le lait de la vache ayant subi une antibiothérapie (Harmon, 1994).

2.2. Pathogènes environnementaux majeurs

Il s'agit principalement des pathogènes Gram-positif représentés par les bactéries *Streptococcus dysgalactiae* et *Streptococcus uberis*. Le traitement de ce type de mammite se fait généralement sans complication (Smith et Hogan, 1993). Parmi les bactéries Gram-négatif, on retrouve principalement la famille des coliformes comprenant *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp* et *Pseudomonas spp*. La mammite à coliformes peut être soignée par des infusions intramammaires et parentérales d'antibiotiques mais elle est souvent mortelle (Smith et Hogan, 1993).

2.3. Pathogènes mineurs

Dans le groupe des pathogènes contagieux mineurs, on retrouve principalement des Staphylocoques coagulases négatifs, *Corynebacterium bovis* et

de multiples *mycoplasma spp* (Fox et Gay, 1993). Les micro-organismes environnementaux mineurs comme les levures, les champignons et les virus sont rarement la cause de mammite (Schalm et coll., 1971).

3. Pertes économiques associées à la mammite

On a estimé la prévalence annuelle de cette maladie dans les troupeaux laitiers ontariens à 37 cas par 100 vaches/année (Meek et coll., 1986). Aux États-Unis, les pertes annuelles individuelles sont de l'ordre de 90\$ à 250\$ par vache (DeGraves et Fetrow, 1993; Hoblet et coll., 1991). Il est généralement admis que les principales pertes économiques engendrées par la mammite sont attribuables à la diminution de la production laitière causée par la mammite subclinique due principalement aux pathogènes contagieux (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*) et aux pathogènes environnementaux (*Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*) (DeGraves et Fetrow, 1993). Cette observation est importante puisque les infections subcliniques représenteraient approximativement 90% des infections de la glande mammaire (Philpot, 1984). Pour chaque cas de mammite clinique, il y aurait 15 à 40 cas de mammites subcliniques; la majorité des épisodes cliniques étant précédés d'une infection de niveau subclinique (Philpot, 1984).

3.1. Cellules somatiques : pertes associées et qualité du lait

Le CCS dans le lait est un indicateur de la réponse inflammatoire et un moyen d'évaluer la présence de la mammite subclinique chez la vache (Paape et coll., 1991). Les cellules somatiques sont constituées de lymphocytes, de neutrophiles, de macrophages et de cellules épithéliales (Kehrli et Shuster, 1994). Dans le lait non-contaminé, les rapports sont approximativement: lymphocytes : 1; neutrophiles et macrophages : 1,5; cellules épithéliales : 14. De plus, le CCS dans le lait normal se situe sous les 200 000 cellules/mL (Kitchen, 1981). Dans le lait contaminé, les rapports sont approximativement: lymphocytes : 1; neutrophiles et macrophages : 10; cellules épithéliales : 10. Au début de l'infection, le lait contaminé contient donc presque 7 fois plus de neutrophiles et de macrophages que le lait non-contaminé et il contient un peu moins de cellules épithéliales. De plus, le CCS dans le lait contaminé se situe au-dessus des 300 000 cellules/mL et peut atteindre plusieurs millions (Kitchen, 1981).

Cependant, lors de mammites cliniques avancées ou de mammites chroniques à *Staphylococcus aureus*, le nombre de macrophages présents dans le lait peut chuter sous les 10%, le nombre de cellules alvéolaires ne représente plus que 2% et les leucocytes polymorphonucléaires peuvent atteindre 90 à 95% des cellules totales du lait (Concha, 1986; Piccinini et coll., 1999).

3.2. Facteurs affectant la susceptibilité de la vache aux infections

Le stage de lactation, l'âge, le statut immunitaire, la génétique, la nutrition, l'hygiène du bâtiment et les conditions environnementales sont des facteurs pouvant affecter la susceptibilité de la vache aux infections. De plus, les méthodes de traite mécanique inadéquates ou défectueuses et les blessures au pis, qui affaiblissent la résistance naturelle de l'orifice du trayon, sont aussi des facteurs qui favorisent les invasions bactériennes chez la vache laitière (Harmon, 1994).

4. Méthodes de diagnostic de la mammite

Il existe deux méthodes couramment employées dans l'industrie laitière pour le dépistage de la mammite : l'examen bactériologique et le CCS du lait. L'examen bactériologique, qui a pour but de mettre en évidence les bactéries à l'origine de l'infection, est habituellement suivi d'un antibiogramme qui permet de mesurer la sensibilité aux antibiotiques laquelle oriente la thérapie (Hortet et Seegers, 1998). Le diagnostic basé sur le CCS du lait permet de caractériser l'inflammation du tissu mammaire. Son but est d'identifier les vaches atteintes de mammite subclinique dans le troupeau (Jones et coll., 1984).

5. Mécanismes de défense de la vache contre les infections

Les mécanismes de défense de l'hôte qui permettent d'instaurer un état de protection ou d'immunité envers les agents infectieux constituent la réponse immunitaire (Roitt et coll., 1996). Ces mécanismes sont non-spécifiques ou spécifiques. Ils sont non-spécifiques dans la mesure où ils permettent d'obtenir une protection contre plusieurs agents pathogènes et qu'il ne dépendent pas d'un contact antérieur avec le micro-organisme impliqué (Roitt et coll., 1996). Ils sont spécifiques en permettant une protection contre un organisme en particulier mais ils nécessitent un contact préalable avec ce dernier afin qu'ils soient fonctionnels (Roitt et coll., 1996).

5.1. Mécanismes de défense non-spécifiques

5.1.1. Barrières physiques

La mammite se produit quand les bactéries entrent dans la glande mammaire via le canal du trayon du pis. C'est pour cette raison que le trayon est considéré comme la première ligne de défense contre les pathogènes. Plus précisément, le muscle du sphincter de la fin du trayon et la couche de kératine tapissant le canal forment cette barrière physique (Sordillo et coll., 1997). Les muqueuses qui tapissent les surfaces internes du pis de la vache sont aussi des barrières physiques qui constituent les défenses non-spécifiques primaires (Salyers

et Whitt, 1994). Par contre, *Staphylococcus aureus* est capable de s'attacher et d'adhérer aux cellules épithéliales qui tapissent la glande mammaire, ce qui lui permet de résister à cette première ligne de défense (Concha, 1986; Fox et gay, 1993). Dans l'éventualité où des bactéries contourneraient ces différentes barrières physiques et se retrouveraient dans la glande mammaire, deux mécanismes non-spécifiques supplémentaires existent. Ces mécanismes sont la destruction des bactéries par des facteurs chimiques solubles (système du complément) et la phagocytose (Salyers et Whitt, 1994).

5.1.2. Système du complément

Le système du complément sert principalement à attirer les cellules de défense vers les micro-organismes, à permettre une meilleure reconnaissance des envahisseurs et finalement à entraîner l'élimination de ces derniers. Il est activé de façon non-spécifique par la voie alterne et de façon spécifique par la voie classique (Ross, 1986). La voie classique d'activation du complément nécessite la présence d'anticorps et sera traitée dans la section des mécanismes de défense spécifiques. La voie alterne d'activation du complément ne requiert pas la présence d'anticorps. Le système du complément entraîne le dépôt de molécules du complément à la surface des bactéries. Cette réaction engendre des pores dans la membrane des bactéries entraînant la mort de l'agent pathogène. Les bactéries Gram-positif comme *Staphylococcus aureus* sont résistantes à l'action cytolytique du complexe d'attaque membranaire car elles sont dépourvues de membrane

externe (Prescott et coll., 1995). Le dépôt de la molécule C3b du complément à la surface des bactéries stimulera aussi la phagocytose de celles-ci. Comme chez tous les organismes Gram-positif, la paroi cellulaire de *Staphylococcus aureus* contient de l'acide téichoïque. En principe, *Staphylococcus aureus* devrait être sensible au complément. Cependant, il faut se rappeler que la majorité des isolats de *Staphylococcus aureus* possèdent une capsule. Cette capsule qui recouvre la paroi cellulaire de *Staphylococcus aureus* peut venir masquer l'acide téichoïque empêchant ainsi la liaison du fragment C3b à la surface de l'agent pathogène (Norcross et Opdebeeck, 1983).

5.1.3. Phagocytose

5.1.3.1. Cellules phagocytaires

Les phagocytes sont des cellules qui sont adaptées spécifiquement pour ingérer et détruire des bactéries ainsi que des particules étrangères (Tizard, 1996). Chez les mammifères, deux types de leucocytes sont capables de phagocyter activement et de détruire les particules ingérées : les leucocytes polymorphonucléaires (PMN) et les monocytes/macrophages (Tizard, 1996).

Les leucocytes PMN comprennent les éosinophiles, les basophiles et les neutrophiles; ils possèdent des noyaux segmentés et des granules dans leur cytoplasme (Tizard, 1996). Les neutrophiles, principaux représentants des leucocytes PMN, sont les cellules de défense qui arrivent les premières à un foyer

d'infection et phagocytent les organismes étrangers (Tizard, 1996). *Staphylococcus aureus* est capable de produire des toxines (α -toxine, β -toxine, leucocidine et coagulase) qui endommagent la membrane des leucocytes PMN et inhibent leur action phagocytaire. Par exemple, la coagulation du fibrinogène du lait en fibrine par la coagulase des *Staphylococcus aureus* leur permet de se regrouper en microcolonies et de résister à l'action phagocytaire des leucocytes PMN (Haraldsson et Jonsson, 1984). De plus, l' α -toxine et la β -toxine produites par *Staphylococcus aureus* et les molécules proinflammatoires produites par les leucocytes PMN endommagent l'épithélium de la glande en créant des micro abcès qui sont des endroits prisés par *Staphylococcus aureus* pour sa survie (Guiding et coll., 1986; Zavizion et coll., 1996).

Les monocytes/macrophages possèdent des noyaux non-segmentés et très peu de granules dans leur cytoplasme (Tizard, 1996). Les monocytes circulent dans le sang pendant environ 72 heures où ils présentent des activités réduites. Par la suite, les monocytes migrent dans les tissus, subissent des modifications morphologiques, acquièrent des changements fonctionnels et se développent en macrophages. Les macrophages y vivent pendant plusieurs jours où ils exercent activement leurs fonctions (Tizard, 1996). Le rôle principal des macrophages est de phagocyter les particules étrangères. De plus, ils amplifient la réponse immunitaire, contrôlent la réponse inflammatoire via la synthèse de cytokines, participent à la réparation des tissus endommagés et présentent les antigènes afin d'induire une réponse immunitaire spécifique (Langermans et coll., 1994).

5.1.3.2. Opsonisation

L'opsonisation est la liaison spécifique entre des molécules (opsonines) et la surface des bactéries (Paul, 1993). Les opsonines sont attirées, à cause de leurs charges positives, à la surface des bactéries qui possèdent généralement des charges négatives (Paul, 1993). De plus, les opsonines sont généralement reconnues par des récepteurs spécifiques à la surfaces des cellules phagocytaires. Les opsonines entraînent donc l'augmentation de la phagocytose des bactéries car elles se lient aux pathogènes et aux phagocytes (Paul, 1993).

L'opsonisation par le complément est possible car les cellules phagocytaires possèdent des récepteurs pour le complément. En effet, les récepteurs CR1 et CR3 présents à la surface des phagocytes lient le complément (Paul, 1993).

L'opsonisation par les immunoglobulines (Ig) est aussi possible car les cellules phagocytaires possèdent des récepteurs de surface qui lient les différentes classes d'anticorps. Les récepteurs FcRI, qui lient les Ig de type G, sont exprimés par les monocytes/macrophages et les leucocytes PMN. De plus, les récepteurs pour les IgA sont aussi présents à la surface des monocytes/macrophages et des leucocytes PMN et ils engendrent la même activité que les récepteurs des IgG (Paul,1993).

5.2. Mécanismes de défense spécifiques

En plus d'un système de défense non-spécifique, le système immunitaire est composé d'un système spécifique permettant de mieux défendre l'organisme contre les envahisseurs (Roitt, 1996).

5.2.1. Lymphocytes B

Les lymphocytes B produisent les anticorps qui interagissent spécifiquement avec certaines composantes des micro-organismes afin de mieux détecter, inactiver et éliminer les pathogènes ou les toxines. Les anticorps permettent l'activation du complément par la voie classique et l'opsonisation. Ces mécanismes amènent l'amplification de la réponse immunitaire conduisant habituellement à l'élimination des bactéries. Par contre, *Staphylococcus aureus* produit la protéine A qui a la capacité de lier la portion Fc des immunoglobulines induisant ainsi l'inactivation de l'opsonisation via les immunoglobulines (Fox et Gay, 1993; Sordillo et coll., 1997).

5.2.2. Lymphocytes T

Les lymphocytes T se définissent par leur développement dans le thymus et par leurs récepteurs hétérodimériques associés aux protéines du complexe CD3. Les cellules T CD4 auxiliaires (T_H^2) peuvent aider les lymphocytes B à produire

l'anticorps en réponse à un stimulus antigénique. Les cellules T CD4 inflammatoires (T_H^1) sécrètent les cytokines interféron- γ (IFN- γ) et facteur de nécrose des tumeurs (TNF) lors de la reconnaissance de l'antigène. Leur fonction principale est l'activation des macrophages. Le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) sont des molécules présentant aux cellules T CD4 des peptides qui proviennent de la dégradation de protéines dans des vésicules cellulaires. Seules les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPAs), constituées des cellules dendritiques, des macrophages et des cellules B, peuvent initier des cellules T CD4 à l'antigène via le CMH II. Les cellules T CD8 cytotoxiques jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre les pathogènes intracellulaires, car le CMH I, présent à la surface de toutes les cellules, présente aux cellules T CD8 des peptides générés dans le cytosol (Concha, 1986; Sordillo et coll., 1997).

6. Traitement de la mammité

La majorité des souches de *Staphylococcus aureus* causant une infection intramammaire (IIM) produisent l'enzyme β -lactamase qui leur accorde une résistance contre plusieurs antibiotiques du groupe β -lactame. Par contre, la résistance bactérienne contre les antibiotiques chez *Streptococcus spp* est beaucoup moins développée (Fox et Gay, 1993). Plus précisément pour une infection à *Staphylococcus aureus*, les chances de guérison suite à une thérapie

durant la lactation sont pratiquement nulles, tandis que les chances de guérison durant le tarissement ne peuvent pas dépasser 30%. Par contre, le taux de guérison des mammites à *Streptococcus spp* se situe aux alentours de 85% (Owens et coll., 1997). La vaccination, en combinaison avec l'antibiothérapie d'une vache infectée, permet d'obtenir un meilleur taux de guérison mais le problème majeur des vaccins actuels est leur incapacité à protéger les vaches contre une nouvelle infection à *Staphylococcus aureus* (Degraes et Fetrow, 1993; Sordillo et coll., 1997; Tyler et coll., 1993). Étant donné le peu de succès de l'antibiothérapie et des vaccins contre l'infection à *Staphylococcus aureus*, le seul traitement vraiment efficace reste donc la prévention (Craven et coll., 1986; Sutra et Poutrel, 1994).

7. Mécanismes susceptibles d'expliquer la résistance des bactéries

Il a été mentionné que le système immunitaire de la vache, malgré un traitement d'antibiothérapie agressive, n'a pratiquement aucune chance d'éradiquer une infection de la glande mammaire causée par *Staphylococcus aureus*. En premier lieu, le lait contenu dans la glande mammaire est un excellent milieu nutritif pour la croissance bactérienne. De plus, le lait nuit au système immunitaire de la vache : l'inhibition du système par des produits contenus dans le lait (acides gras et protéines) et la différence de pH entre le lait et le sang (Sordillo et coll., 1997). Ces éléments sont des facteurs qui facilitent mais qui ne peuvent pas expliquer à eux seuls le problème d'infection chronique. Deux hypothèses sont susceptibles d'expliquer le développement d'infections chroniques totalement

résistantes aux traitements d'antibiothérapie : la formation du biofilm et l'internalisation de *Staphylococcus aureus* dans les cellules alvéolaires.

7.1. Formation du biofilm

Le biofilm se définit comme une matrice entourant des microcolonies servant à l'adhésion des bactéries entre elles ou à une surface (Costerton et coll., 1987). Dans la nature, l'importance du biofilm est immense car plus de 99% de toute la masse bactérienne vivant dans l'environnement se développe et vit sous la forme de biofilm tandis qu'une infime partie (moins de 1%) se trouve en suspension (Potera, 1996). Dans le milieu médical, la formation du biofilm par les bactéries est un grave problème de santé publique car ils colonisent les appareils biomédicaux des patients (cathéters, valves cardiaques, appareils orthopédiques, etc.) et causent des infections chroniques comme les infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose ou fibrose kystique (Costerton, 1995). Le gel du biofilm constitué d'exopolysaccharides formés par les bactéries permet d'avoir une protection contre le système immunitaire de l'hôte et forme aussi une barrière physique contre les désinfectants et les antibiotiques. Par exemple, la résistance des bactéries à des agents antimicrobiens vivant sous forme de biofilm *in vivo* est jusqu'à 500 fois plus grande que les mêmes bactéries vivant en suspension dans un milieu de culture *in vitro* (Costerton et coll., 1995). Il y aurait deux étapes distinctes dans la formation du biofilm : la première étape se caractérise par une adhérence initiale rapide des bactéries à une surface grâce à des liaisons chimiques

et de multiples protéines de la surface des bactéries appelées adhésines et la deuxième étape se caractérise par une accumulation lente de microcolonies de bactéries en multicouches et d'une synthèse d'exopolysaccharides par des enzymes bactériennes qui permettent de former un gel protecteur appelé biofilm (Figure 1) (Hussain et coll., 1997).

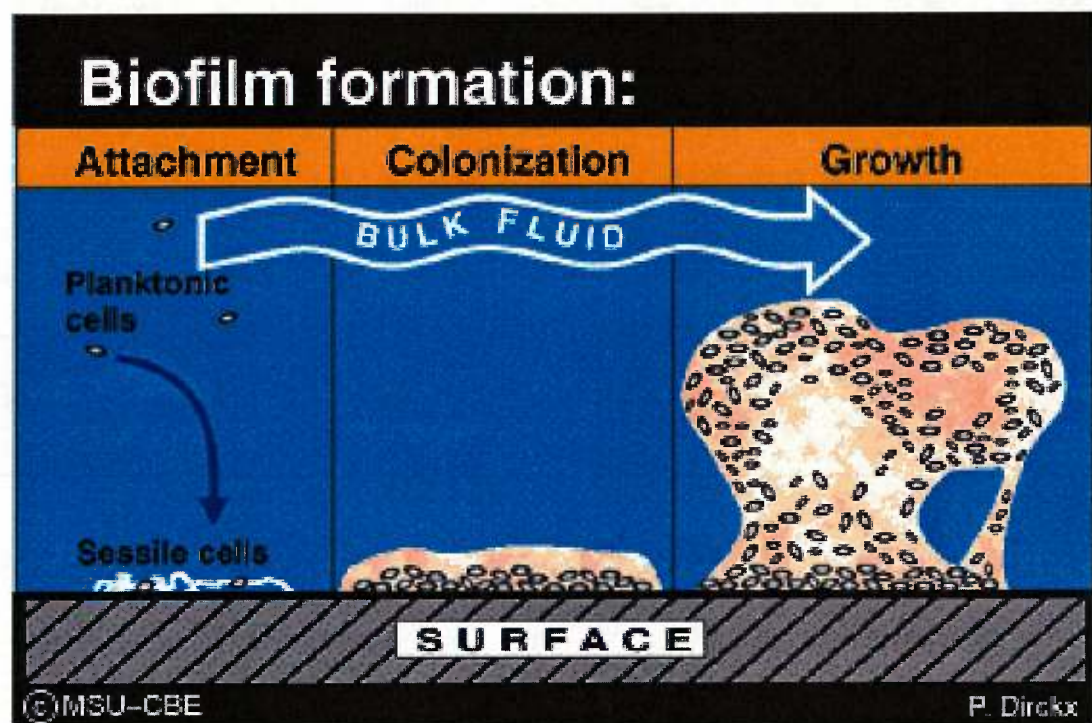


Figure 1. Les différentes étapes de la formation du biofilm. L'adhérence initiale rapide des bactéries à une surface suivie d'une accumulation lente de microcolonies de bactéries en multicouches. Tiré de <http://www.erc.montana.edu>

Plus précisément chez les Staphylocoques, les liaisons chimiques responsables de l'adhérence primaire sont dues à des interactions hydrophobes et à des forces de van der Waal's (Dalton et coll., 1998). Les «staphylococcal surface proteins» SSP-1 et SSP-2 organisées en une structure ressemblant à des «fimbriae», les «fibronectin binding protein» (FnBP), les «fibronogen-binding protein» (Fbp), l'autolysine E (atlE) et la «capsular polysaccharide/adhesin» (PS/A) sont de multiples protéines de nature et fonctions variées citées dans la littérature comme étant responsables de l'adhérence initiale (Heilmann et coll., 1997; Tojo et coll., 1988; von Eiff et coll., 1999). La «polysaccharide intercellular adhesin» (PIA) est le polymère clé responsable de la présence des exopolysaccharides qui forment le biofilm proprement dit (von Eiff et coll., 1999).

7.2. Internalisation de *Staphylococcus aureus* dans les cellules alvéolaires

Bien que *Staphylococcus aureus* ne soit pas habituellement considéré comme un pathogène intracellulaire, plusieurs travaux *in vitro* indiquent qu'il peut entrer dans les cellules phagocytaires non-professionnelles telles que les cellules endothéliales et épithéliales (Dziewanowska et coll., 1999). Par exemple, *Staphylococcus aureus* est capable d'adhérer, de pénétrer et de se diviser dans une lignée cellulaire endothéliale humaine (Ogawa et coll., 1985), dans une lignée cellulaire endothéliale aortique bovine (Hamill et coll., 1986; Vann et Proctor, 1987) et dans une lignée cellulaire épithéliale mammaire bovine (MAC-T) (Almeida et coll., 1996; Bayles et coll., 1998).

Dès sa pénétration dans la glande mammaire, *Staphylococcus aureus* se multiplie rapidement en produisant de nombreuses toxines qui causent une réaction inflammatoire. L'inflammation de la glande résulte en un dommage à la couche de cellules épithéliales permettant un contact entre *Staphylococcus aureus* et les cellules épithéliales (Lammers et coll., 1999). L'adhésion aux cellules épithéliales est généralement considérée comme le premier et crucial événement dans le processus d'infection (Cifrian et coll., 1994).

L'adhésion s'effectue par une liaison irréversible entre un ligand exprimé par *Staphylococcus aureus* et un récepteur à la surface cellulaire des MAC-T. Le ligand est la protéine «fibronectin binding protein» (FnBP) et le récepteur n'est pas encore bien caractérisé mais les auteurs pensent qu'il provient de la grande famille des intégrines (Dziewanowska et coll., 1999). La liaison entre le ligand et le récepteur peut s'expliquer par deux façons; soit une liaison directe entre le ligand et le récepteur ou bien avec la participation de la fibronectine qui agit comme intermédiaire entre le ligand et le récepteur pour créer un pont entre les deux (Lammers et coll., 1999). Une fois cette liaison établie, une signalisation cellulaire via une «protein tyrosine kinase» (PTK) permet le réarrangement du cytosquelette de la cellule (Almeida et coll., 2000; Dziewanowska et coll., 1999). Le réarrangement du cytosquelette de la cellule s'effectue par des filaments d'actine qui servent à la formation d'une structure ressemblant à des pseudopodes qui engouffrent les bactéries dans une vacuole nommée endosome. Par la suite, *Staphylococcus aureus* s'échappe par la lyse de la membrane des endosomes pour se retrouver libre dans le cytoplasme de la cellule (Bayles et coll., 1998).

Lorsque les bactéries ont gagné l'accès au cytoplasme, il y a trois dénouements possibles qui ont des effets dramatiquement opposés sur la pathogénie. Premièrement, il y a l'induction de l'apoptose, qui est la mort programmée de la cellule, par les gènes *agr* et *sar* de *Staphylococcus aureus*. Plus précisément, le locus *agr* permet la sécrétion d'une panoplie d'exoprotéines (hémolysines, protéases et lipases) qui sont toxiques pour la cellule, tandis que *sar* agit comme régulateur positif du locus *agr*. L'apoptose amène les macrophages à ingérer les corps cellulaires apoptotiques contenant des *Staphylococcus aureus*. Par conséquent, *Staphylococcus aureus* peut pénétrer dans les macrophages sans stimuler une activité bactéricide directe ayant pour conséquence un environnement protecteur contre le système immunitaire comme par analogie avec le cheval de Troie (Bayles et coll., 1998; Wesson et coll., 1998). Deuxièmement, le milieu intracellulaire favorise le changement phénotypique de *Staphylococcus aureus* en «small colony variant» (SCVs) qui est un état d'inactivité métabolique. Les SCVs sont très difficiles à éradiquer en raison de leur croissance extrêmement lente. Les antibiotiques (aminoglycosides et β -lactames) sont inefficaces contre les SVCs car ils requièrent des composantes métaboliques actives (Vesga et coll., 1996). Cette variation cause très peu de dommage aux cellules de l'hôte et entraîne une maladie persistante et chronique (Wesson et coll., 1998). Finalement, *Staphylococcus aureus* produit des protéines cytolytiques conduisant à la lyse cellulaire. On observe ce phénomène lors du réveil sporadique de la phase aiguë de cette infection caractérisée par la nécrose de la glande mammaire (Figure 2) (Wesson et

coll., 1998). Par contre, nous ne comprenons pas encore comment génétiquement *Staphylococcus aureus* décide de sa tactique. La composition du milieu intracellulaire ou l'état immunologique de la vache peuvent-ils influencer les voies possibles d'attaque?

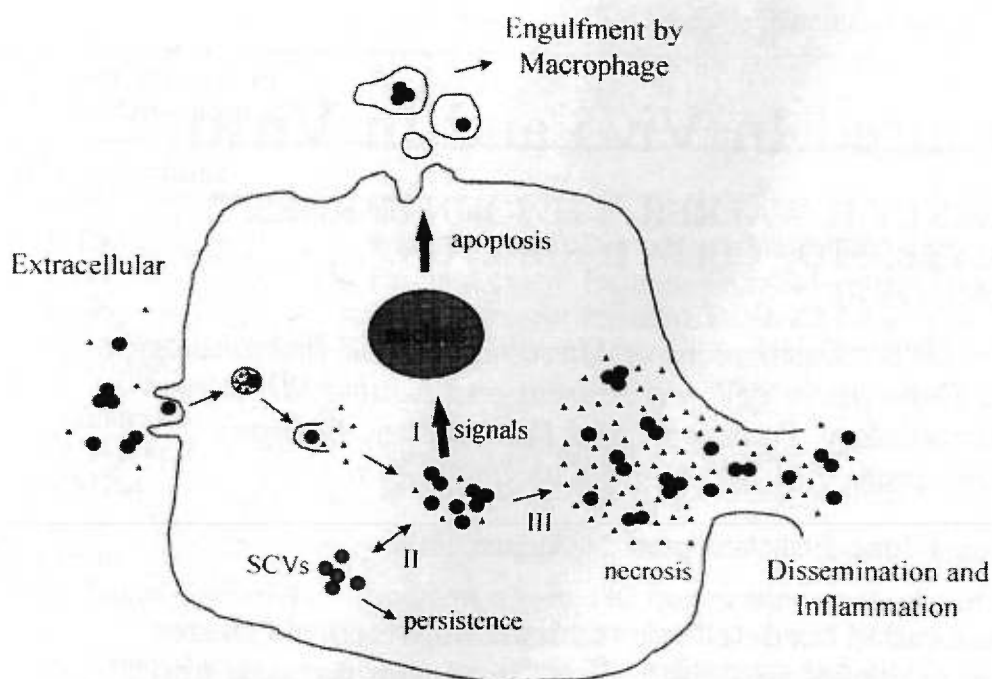


Figure 2. Le modèle résume les voies possibles de *Staphylococcus aureus* une fois libre dans le cytoplasme des MAC-T : (i) l'induction de l'apoptose, (ii) la formation de SCVs, (iii) la lyse de la cellule (Wesson et coll., 1998).

De plus, *Streptococcus dysgalactiae* et *Streptococcus uberis* peuvent aussi pénétrer et persister dans la lignée cellulaire MAC-T, mais les auteurs sont

incapables de démontrer la présence d'apoptose et de lyse cellulaire et notent aucun changement morphologique des cellules infectées comme dans le cas d'infection à *Staphylococcus aureus* (Almeida et coll., 1995; Almeida et coll., 1999; Almeida et coll., 1999; Calvinho et coll., 1998; Matthews et coll., 1994).

La possibilité d'invasion et de survie de *Staphylococcus aureus* dans une niche protectrice intracellulaire peut expliquer, chez la vache mammiteuse, la persistance à long terme de la maladie et le rôle clé joué lors des infections chroniques (Dziewanowska et coll., 1999). De plus, l'internalisation de *Staphylococcus aureus* pourrait permettre de comprendre l'inefficacité du système immunitaire et des traitements d'antibiotiques contre l'adaptation parfaite de ce pathogène à son milieu (Bayles et coll., 1998). Ce mécanisme d'évasion a été démontré sur des lignées cellulaires mais jamais sur des cellules isolées du lait d'une vache mammiteuse infectée de façon naturelle.

8. Approche expérimentale pour l'étude de la mammite

8.1 Cytométrie en flux

Le cytofluoromètre, un appareil développé à partir des travaux de Moldovan (1934), permet l'étude précise de cellules en suspension entraînées par un flux de liquide. On peut mesurer de façon quantitative différents paramètres se rapportant à la taille, la granularité et la fluorescence des cellules (Shapiro, 1995). La diffraction est la déviation de la lumière au contact de la cellule lorsque

mesurée à un angle solide inférieur à 12° par rapport au rayon incident et est appelée couramment «forward scatter» (FSC); elle donne une indication de la taille relative de la cellule (Sharpless et coll., 1975). La réfraction et la réflexion proviennent de la déviation de la lumière par son passage à travers la cellule mesurée à un angle droit de 90° ; elles donnent une information sur la complexité du contenu intracytoplasmique de celle-ci et sont nommées couramment «side scatter» (SSC) (Loken et coll., 1976). La fluorescence est le paramètre le plus étudié en cytofluométrie. La fluorescence est la propriété de certaines molécules, ayant de nombreuses liaisons π , d'absorber l'énergie lumineuse et de la réémettre à une longueur d'onde supérieure. Par exemple, pour le laser argon qui émet à 488 nm, le fluorochrome «fluorescein isothiocyanate» (FITC) réémet à environ 530 nm, soit dans la zone de la lumière verte. Le fluorochrome «phycoerythrin» (PE) réémet vers 575 nm, soit dans la zone de la lumière orangée (Brown, 1984).

Le tri cellulaire consiste à séparer physiquement des cellules de la population globale en utilisant la déflexion des gouttelettes chargées électriquement et déviées par un champ électrique dans le but d'avoir une sous-population cellulaire pure portant un marqueur de surface spécifique précédemment sélectionné. Pour ce faire, il existe des anticorps monoclonaux, couplés à des fluorochromes, qui réagissent de façon spécifique avec des récepteurs cellulaires (Yeutsch et coll., 1983).

8.1.1. Récepteur de surface des monocytes et macrophages bovins

Le récepteur CD14 se retrouve uniquement sur les cellules phagocytaires et permet une identification phénotypique de ce type de cellules. On retrouve ce récepteur en abondance sur les monocytes et macrophages et en quantité minimale sur les granulocytes activés (Haziot et coll., 1988; Simmons et coll., 1989). Le rôle du CD14 sur les cellules mononucléaires est de lier le complexe formé par les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram-négatif et de la protéine du sérum «LPS Binding Protein» (LBP). La liaison de ce complexe (LPS et LBP) au CD14 active la synthèse de TNF- α par les macrophages (Wright, 1990). Il faut souligner que le CD14 n'est pas exprimé sur les lignées cellulaires myéloïdes immatures U937 et HL60 (Haziot et coll., 1988). Même si le pourcentage d'homologie entre le CD14 bovin et humain n'est pas connu, PharminGen (CA) a démontré que l'anticorps monoclonal M5E2 qui est dirigé contre le récepteur CD14 humain peut reconnaître le récepteur CD14 bovin par réaction croisée.

8.1.2. Récepteurs de surface des cellules épithéliales bovines

Les diverses activités du cytosquelette ne dépendent que de trois principaux types de filaments protéiques : les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Les filaments intermédiaires sont des polymères de protéines fibreuses qui procurent aux cellules animales une stabilité mécanique.

Dans la famille des filaments intermédiaires, il y a les filaments contenant les «keratin-like proteins» appelés aussi cytokératines et qui sont caractéristiques des cellules épithéliales (Moll et coll., 1982). Les cytokératines constituent un groupe de protéines exprimées à la surface des cellules épithéliales et qui servent de marqueurs biochimiques et immunologiques durant leurs différents stades de différenciation et de maturation. Leurs masses moléculaires apparentes varient de 40 000 à 68 000 Da tandis que leurs points isoélectriques se situent entre un pH de 5,0 à 8,5 (Moll et coll., 1982). L'acidité du pH d'un polypeptide est corrélée avec un degré de phosphorylation élevé (Steinert et coll., 1982).

Le tissu de la glande mammaire est constitué morphologiquement et fonctionnellement de trois types différents de cellules épithéliales (ductales, myoépithéliales et sécrétoires) montrant leurs propres patrons d'expression des cytokératines (Franke et coll., 1980). Il existe commercialement deux lignées cellulaires bien caractérisées pour étudier la sécrétion du lait chez la vache. La lignée «mammary alveolar cell with large T-antigen» (MAC-T) provient de cellules alvéolaires mammaires bovines primaires transfectées avec l'antigène Grand-T de SV-40. Selon les auteurs, cette lignée cellulaire contient les caractéristiques phénotypiques des «bovine mammary epithelial cell» (BMEC), plus précisément elles expriment les cytokératines 1 à 8 (Hung et coll., 1991). La lignée «bovine mammary gland epithelial» (BMEG) provient de cellules épithéliales de la glande mammaire d'une vache en lactation. Cette lignée possède trois versions clonales dépendamment de la méthode de culture soit sans hormone (-H), avec hormones (+H) ou avec une forte concentration d'hormones (HM).

Malgré la différence morphologique drastique entre ces trois clones, l'expression spécifique des protéines du cytosquelette s'avère inchangée (Schmid et coll., 1983a). Plus précisément, les trois clones expriment la cytokératine «A» ou cytokératine 8 (Schmid et coll., 1983a; Schmid et coll., 1983b).

Chez l'humain, 19 polypeptides différents ont été répertoriés comparativement à 22 chez le bovin (Schiller et coll., 1982). Par contre, la cytokératine 8 du bovin possède les mêmes caractéristiques biochimiques que celles de l'humain avec une masse moléculaire de 52 Da approximativement et d'un pI d'environ 6,2. De plus, la digestion peptidique de ces deux protéines montre des patrons vraiment similaires. Cette similitude indique que l'expression de certaines cytokératines spécifiques, qui est une caractéristique de la voie qui mène à la différenciation épithéliale, fut grandement conservée durant l'évolution des mammifères (Schiller et coll., 1982).

L'anticorps monoclonal CAM5.2 de la compagnie Becton Dickinson (CA) est capable de lier des cellules épithéliales sécrétoires normales à l'exception des cellules épithéliales squameuses stratifiées (Leader et coll., 1986). De plus, cet anticorps est capable de se lier aux cellules du canal sécrétoire et aux cellules alvéolaires du sein de la femme par liaison avec les cytokératines 8, 18 et 19 (Goddard et coll., 1991; Makin et coll., 1984). Par contre, certains auteurs affirment que le CAM5.2 réagit fortement contre le peptide 8 et faiblement par réaction croisée avec le peptide 7 et notent l'absence de réaction avec les peptides 18 et 19 (Smedts et coll., 1990) et ces résultats sont confirmés par la fiche signalétique de Becton Dickinson (CA). Même si le pourcentage d'homologie

entre la cytokératine 8 bovine et humaine n'est pas connu, l'anticorps monoclonal CAM5.2 dirigé contre le récepteur des cytokératines humaines 8 et 7 peut reconnaître le récepteur des cytokératines bovines 8 et 7 par réaction croisée. Ceci donne donc la possibilité d'isoler les cellules alvéolaires (BMEC) à partir du lait de vache.

9. Objectifs expérimentaux

Pour une vache infectée par *Staphylococcus aureus*, les chances de guérison suite à une antibiothérapie durant la lactation sont pratiquement nulles, tandis que les chances de guérison durant le tarissement sont au maximum de 30% (Harmon, 1994). Deux hypothèses principales sont susceptibles d'expliquer la chronicité et la persistance de ce type d'infection : 1) la formation d'un biofilm par *Staphylococcus aureus*; 2) la pénétration et la survie de *Staphylococcus aureus* dans les cellules alvéolaires et les macrophages. Il est à noter que *Staphylococcus aureus* n'est généralement pas considéré comme un pathogène intracellulaire. Par contre, de nombreuses études confirment que *Staphylococcus aureus* peut pénétrer, survivre et se multiplier à l'intérieur des cellules phagocytaires non-professionnelles en culture. La possibilité de maintenir une niche intracellulaire peut promouvoir une colonisation à long terme et aussi jouer un rôle dans la persistance d'une infection chronique (Bayles et coll., 1998; Dziewanowska et coll., 1999; Lammers et coll., 1999; Wesson et coll., 1998). Le but de ce travail est de démontrer la présence de *Staphylococcus aureus* dans les cellules alvéolaires et

les macrophages fraîchement isolés du lait de vaches mammites infectées de façon naturelle. Pour atteindre cet objectif, nous avons développé, dans un premier temps, un traitement efficace pour les cellules du lait qui permet d'éliminer tout ADN et/ou bactéries exogènes. À l'aide d'amorces universelles, nous avons ensuite démontré la présence intracellulaire d'ADN bactérien dans les cellules du lait en utilisant la technique du PCR. Une troisième étape a permis d'identifier des anticorps capables de reconnaître les cellules alvéolaires et les macrophages bovins. Par la suite, nous avons démontré, par hybridation des produits d'amplification du PCR avec une sonde maison spécifique à l'ADN du genre *Staphylocoque*, la présence de bactéries intracellulaires dans les cellules alvéolaires et les macrophages isolés du lait mammitique. Finalement, l'internalisation de *Staphylococcus aureus* vivant, retrouvé dans les cellules alvéolaires et les macrophages isolés par FACS, fut mise en évidence suite à l'étalement sur gélose de ces cellules préalablement lysées. Nos résultats confirment, pour la première fois, la présence de *Staphylococcus aureus* et de son ADN à l'intérieur des cellules alvéolaires et des macrophages isolés à partir du lait infecté par *Staphylococcus aureus*.

CHAPITRE 2 : ARTICLE

Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk.

Alexandre Hébert ^a, Khampoune Sayasith ^a, Serge Sénéchal ^a, Pascal Dubreuil ^b,
and Jacqueline Lagacé ^{a*}

a. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montreal, Québec, Canada, H3C 3J7.

b. Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200, rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 2M2.

* Corresponding author.

Tel. : (514) 343-2180

Fax : (514) 343-6358

E-mail : jacqueline.lagace@umontreal.ca

Abstract

Numerous *in vitro* studies have demonstrated that *Staphylococcus aureus* may be internalized and survive in a bovine mammary epithelial cell-line. We report here the presence of internalized and living *S. aureus* in alveolar cells and macrophages in milk samples of bovine mastitis. We used fluorochrome labeled monoclonal antibodies, specifically recognizing surface cell markers of bovine alveolar cells and macrophages, to isolate these two types of cells using Fluorescence Activated Cell Sorting. Extracellular bacteria and DNA were previously eliminated to exclude possible contamination. In order to detect intracellular bacterial DNA inside the isolated cells, we used PCR amplification of bacterial DNA and the PCR products were analyzed by Southern blot with a specific probe for *Staphylococcus*. The results showed the presence of *Staphylococcus* DNA inside the two isolated populations of cells, confirming that *S. aureus* could penetrate alveolar cells and macrophages. The demonstration of the presence of intracellular living *S. aureus* was determined by bacteriological culture of positive samples plated onto blood agar plates and by its further identification. Our results showed for the first time that living *S. aureus* and its DNA are present in both alveolar cells and macrophages in chronically infected cow milk.

Keywords : Mastitis; Internalization; Invasion; *Staphylococcus aureus*

1. Introduction

Staphylococcus aureus is one of the major agents of bovine mastitis in lactating dairy cows. After entering the mammary gland through the teat canal and adaptation to the udder environment, the bacteria can multiply rapidly, and an inflammatory reaction starts, which results in tissue damages [1]. The adhesion of *S. aureus* to the epithelial cells is considered as the first and crucial event in the process of infection [2]. Even if mastitis is generally considered as the most costly disease of dairy cows industry, no effective vaccine is available and current antibiotic therapies are very often unsuccessful [3].

Although *S. aureus* is not normally considered as an intracellular pathogen, many studies show that it can penetrate inside non-professional phagocytic cells [4-11]. It has been demonstrated that *S. aureus* is able to adhere, penetrate and divide in human and bovine aortic endothelial cell-lines as well as in a bovine mammary epithelial cell line (MAC-T) [4-11]. Based on these results, it was hypothesized that the resistance of *S. aureus* chronic infections to natural immune defenses and antibiotherapies could be due to the intracellular presence of these bacteria in alveolar cells and/or macrophages.

The aim of the present study was to demonstrate the presence of *S. aureus* in alveolar cells and/or macrophages of milk samples obtained from chronic bovine mastitis acquired in a natural way. Alveolar cells and macrophages were isolated from milk samples by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). The results showed the presence of *Staphylococcus* DNA inside both cell types.

Moreover, growth of *S. aureus* was found for both alveolar cell and macrophage populations when plated on blood agar plates, strongly suggesting the presence of intracellular living bacteria.

2. Materials and Methods

2.1 Isolation of cells by FACS analysis and cell treatment

Eighteen milk samples from 18 Holstein cows were used in this study: 10 infected with *S. aureus*, 4 infected with *Streptococcus agalactiae* and 4 from young healthy cows whom milk has never been infected. Half of the samples were used for PCR and hybridization study and the second half for culture analysis. The cows with bovine mastitis were selected because the chronicity of their infection that lasted for at least 3 months at the time of collection. The diagnostic was based on somatic cell counts (SCC) superior to 10^6 cells per ml of milk and on the presence of bacteria between 10^2 to 10^4 per ml in the analyzed samples. Milk samples of 200 ml were hand collected in sterile bottles after udder disinfection and kept frozen at -20°C . Ten ml of samples were used for bacteriologic analysis and the remaining 190 ml were used for cell isolation. Preliminary cytometry studies performed to compare the number and the reactivity of alveolar cells and macrophages in fresh and frozen milk showed no significant difference between the viability (90%) of fresh or frozen cells in milk. Samples obtained from healthy cows were used as negative control. Prior to the experiments, milk was thawed at

37°C and total cells were isolated by centrifugation at 2000 rpm (RT6000B, DuPont) for 10 min at 22°C. Pellets were washed four times with phosphate-buffered saline (PBS 0.01M, pH 7.2) and resuspended in 1.5 ml of PBS. A volume of 500 µl of this cell suspension was then used and treated with 20 µl of anti-cytokeratin fluorescein isothiocyanate (FITC) monoclonal antibody (MoAb) (CAM 5.2) (Becton Dickinson) or anti-human CD14 phycoerythrin (PE) MoAb (M5E2) (PharMingen) for 30 min at room temperature. The anti-cytokeratin (CAM 5.2) MoAb has been developed against human keratin proteins that correspond to Moll's peptides #7 and #8, commonly named cytokeratin 7 and 8 [12]. Both are present on secretory epithelia of normal human tissue but not on stratified squamous epithelium [13]. M5E2 MoAb is known to be directed against the human CD14 receptor and can react with bovine CD14 receptor by cross reaction. Receptors CD14 are specifically distributed on monocytes and macrophages and can be detected in a small proportion of activated granulocytes [14]. Control samples were also prepared using no antibody. After incubation, the cells were washed three times with PBS and centrifuged as previously described. Alveolar and phagocytic cells were then isolated using FACS (FACSVantage SE, Becton Dickinson) at 2000 events/s with 530/30 nm filter for FITC and 575/22 nm filter for PE.

In order to eliminate all exogenous bacteria and all traces of exogenous nucleic acids in the medium or at the surface of the cells, we applied an extracellular treatment which consisted of incubation of the cells in PBS containing penicillin (2500 U ml⁻¹, Sigma), streptomycin (2.5 mg ml⁻¹, Sigma).

gentamicin ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$, GibcoBRL), lysostaphin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$, Sigma), DNase I ($0.5 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$, GibcoBRL) and MgCl_2 (10 mM, Sigma) for 3 h at 25°C . After incubation, supernatants were kept as control for bacterial DNA detection or culture whereas the cell pellets were washed three times with PBS and stored at -70°C until use.

2.2 Bacteriologic analysis for detecting intracellular living bacteria

To detect intracellular living bacteria, frozen cells (isolated and treated as described above) were thawed, plated onto blood agar plates (BAP) and incubated overnight at 37°C . The killing of extracellular bacteria was monitored by culturing supernatants collected from infected cells treated with the antibiotic-enzymes. Bacteriologic identification was performed in duplicate from the positive BAP plates in an independent laboratory of diagnosis using standard biochemical methods (Gram, catalase, hemolysis, coagulase, etc.).

2.3 Polymerase chain reaction (PCR) assay

DNA of isolated and treated cells obtained as described in 2.1 was extracted using a commercial kit adapted for Gram-positive bacteria (DNeasy Tissue Kit, QIAGEN). To perform PCR amplification, a $5 \mu\text{l}$ sample of DNA ($\pm 2 \text{ ng}$) was added to $100 \mu\text{l}$ of PCR buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM of the four deoxynucleotides, 0.5 μM Primer

93a, 0.5 μ M Primer 97ar and 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Gibco/BRL) [15]. Amplification was performed with the nucleotide sequences of universal eubacterial primers 93a (GGG TTC AGA ACG TCG TGA GA) and 97ar (CCC GCT TAG ATG CTT TCA GC) in position 2608-2627 and 2790-2771 respectively of the 23S rRNA genes of *S. aureus* (GenBank X68425.1) [16]. Forty cycles of PCR amplification were performed under the following conditions: 94°C for 15 s, 55°C for 15 s, and 72°C for 30 s. After the last cycle the samples were incubated at 72°C for an additional 7 min, to complete all strands (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer). Probe AH (TAG CTA TGT GTG GAC GGG ATA A) was 5'-end labeled with [γ -³²P]dATP as described elsewhere [17]. This probe, specific for the genus *Staphylococcus* (23S rRNA gene in position 2747-2768), gives an amplified product of 183 pb.

2.4 DNA radiolabeling and hybridization

A 20 μ l sample of amplified DNA was submitted to electrophoresis using 1.2% (wt/vol) agarose gels. After denaturation and neutralization, DNA was transferred from the gel to a nylon H⁺-hybond membrane (Roche Diagnostics, Laval, Québec) according to the Southern blotting technique [18]. Blots were hybridized for 4 h with the purified 5'-end radiolabeled oligonucleotide probe AH (2×10^6 cpm ml⁻¹) at 50°C in a QuikHyb^R solution (Stratagene) containing 100 μ g ml⁻¹ of denatured salmon sperm DNA. The blots were washed three times, each for

20 min at room temperature with 2X SSC buffer containing 0.1% SDS (wt/vol), and once for 20 min at 60°C with 0.1X SSC buffer containing 0.1% SDS (wt/vol). Finally, the membrane was exposed to X-ray film (Kodak) at -70°C.

3. Results

3.1 Isolation of bovine alveolar cells and macrophages by FACS

Alveolar cells and macrophages were isolated by FACS (Figure 1). The negative control without antibody is shown in Fig. 1A. M5E2 MoAb was used to identify and isolate the bovine phagocytic cells from other cell populations of the milk samples. First, the specificity of the M5E2 MoAb on different cell types was determined (Table I). Results show that M5E2 MoAb recognized human and bovine cells in blood samples but didn't react with the CD14 control cell line U937 [14] (Table I and Fig. 1). Using anti-CD14 antibody, FACS analysis showed that 35.5% of the cells in milk samples are macrophages (Fig. 1B).

We used the anti-cytokeratin (CAM 5.2) MoAb to isolate the bovine alveolar cells. Bovine cytokeratin 8 presents the same biochemical characteristics as the human one [19]. Even though the percentage of homology between human and bovine cytokeratin 8 is unknown, CAM 5.2 MoAb can also recognize the bovine cytokeratin 8 by cross reaction. Specificity of this particular MoAb was determined and results are shown in Table I. It can be observed that CAM 5.2 MoAb binds specifically to alveolar and mammary cells. No cross reaction was

found with the WI38 lung epithelial cell line. FACS analysis using CAM 5.2 MoAb showed 13.6% of alveolar cells in the whole population of cells (Fig. 1C). CD45RO MoAb (UCHL1) was used as a negative isotypic control and no binding was found with bovine cells using this antibody (data not shown).

3.2 Bacteriological analysis of milk samples

The results shown in Table II indicate the growth of *S. aureus* on blood agar plates for 7 samples obtained from chronically infected cows (5 by *S. aureus* and 2 by *S. agalactiae*) and from 2 healthy cows. The presence of living *S. aureus* was 5/5 positive for macrophages and 3/5 positive for alveolar cells. This suggests that *S. aureus* is still able to multiply after its stay in alveolar cells and macrophages. Contrasting with this result, no intracellular living *S. agalactiae* bacteria obtained from chronically infected milk cows with this bacterium were found since no growth was observed.

3.3 Demonstration of the presence of Staphylococcus DNA in alveolar and macrophages

Table III shows the specificity of the probe used for hybridization. Southern blot analysis performed on the PCR products obtained with universal eubacterial primers designed to amplify all possible bacterial DNA, demonstrates the specificity of the probe AH for DNA of genus *Staphylococcus*. Indeed,

hybridization was observed for all the *Staphylococcus* tested but not for the *Streptococcus* and the other tested bacteria.

PCR products obtained from total cells of milk samples or isolated alveolar cells and macrophages were analyzed by Southern blot with the probe AH in order to determine the presence of intracellular *Staphylococcus* DNA. Results are summarized in Table IV and a typical blot is shown in Fig.2. Table IV shows that *Staphylococcus* DNA was amplified in all total cells, macrophages and alveolar cells obtained from cows chronically infected with *S. aureus*. Extracellular treatment with antibiotics and Dnase I eliminated exogenous *S. aureus* and bacterial DNA since no signal was detected in the supernatant of each sample. The PCR and hybridization analysis of bacterial DNA using the probe AH specific for the genus *Staphylococcus* gave negative results with milk samples obtained from 2 uninfected cows and 2 chronically infected cows with *S. agalactiae* used as controls. A FACS study also showed no effect on the membranary integrity of the cells following this treatment (data not shown).

4. Discussion

The aim of the present study was to demonstrate the presence or the absence of living *S. aureus* and/or its DNA in different cellular types of bovine mastitis and particularly in alveolar cells and macrophages contained in the milk of cows chronically infected in a natural way.

A preliminary and crucial step of this work consisted in the development of an efficient treatment of cells isolated from infected milk. Indeed, the validity of the study depends on the efficiency of the treatments to eliminate all exogenous DNA and bacteria from the cell preparation. We modified and combined different treatments previously described [5-11]. In brief, antibiotic concentrations and lysostaphin concentration were increased respectively 5 and 10 times, and Dnase I was also added. This latter protocol applied to the infected milk allowed obtaining supernatants that were negative for bacterial DNA detection following PCR studies using radioactive probes.

PCR and hybridization analysis demonstrate the presence of specific *S. aureus* DNA in all alveolar cells and macrophages whereas the culture of cells onto BAP shows that the presence of bacterial DNA in the cells is not necessarily correlated with the presence of living *Staphylococcus* in the two different populations of cells (Table II). If we detected intracellular living *S. aureus* in macrophages of the five milk samples analyzed, only three samples out of the five alveolar cell samples were positives. An independent laboratory confirmed the identification of *S. aureus*. These results show that the two tests bring complementary informations. This point is important since the presence of DNA in cells indicates that the bacteria can penetrate in cells without necessarily maintaining an active infection. It seems to be the case of milk cell samples from chronically infected cows with *S. agalactiae* in whom it was impossible to isolate living bacteria whereas PCR analysis detected intracellular bacterial DNA with universal eubacterial primers in a preliminary study with three other samples (Data

not shown). In clear, living *S. aureus* was recovered from 5 out of 5 macrophage samples isolated from milk samples, comparatively to 0 out of 5 for *S. agalactiae*. These results show that if *S. agalactiae* can penetrate in bovine cells, its capacity of surviving in these cells and promoting chronic infection has still to be demonstrated.

The fact that *S. aureus* is known as the most irreducible agent of bovine mastitis is in accordance with its capacity of survival in bovine cells. Therefore, some bovine mastitis caused by *S. agalactiae* are also very resistant to treatment as it was the case for the samples used as control in the present study. Other complementary studies with larger groups of animals would be necessary to answer the question concerning the chronicity of *S. agalactiae* in bovine mastitis.

The demonstration of the internalization and survival of *S. aureus* in macrophages and alveolar cells coming from milk samples of bovine mastitis, confirms numerous *in vitro* studies that demonstrate intracellular presence of *S. aureus* in MAC-T cell lines [7-11]. The fact that the live bacteria are found in a higher percentage of macrophages compared to alveolar cells can indicate that the bacteria are more protected inside the macrophages [9]. Our results suggest that the internalization process of *S. aureus* is a current phenomenon in chronic infections by this bacterium. The demonstration of the invasion and survival of *S. aureus* inside a protective intracellular niche can explain the long term persistence of this disease affecting the lactating dairy cows and the key role played by the internalization [10]. Internalization and survival of *S. aureus* allows to understand

why the immune system is inefficient and why the antibiotic treatments fail to eliminate this pathogen, so well adapted to its environment [8].

This study confirms the importance that the milk industry should concede to prevention in purpose to avoid new infection of the cows by *S. aureus* because, so far, there is no efficient treatments. The prevention by using appropriate hygienic methods and the development of efficient vaccines would be the best arms to prevent the propagation of bovine mastitis cases. In conclusion, the present study demonstrates for the first time the intracellular presence of living *S. aureus* and its DNA in alveolar cells and macrophages isolated from cows chronically infected with *S. aureus*. This result confirms previous *in vitro* studies that the chronicity of such infections might depend on the intracellular presence of *S. aureus* in macrophages and in alveolar cells that secrete milk.

Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Dairy Farmers of Canada.

References

- [1] Sutra, L. and Poutrel, B. (1994) Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 40, 79-89.
- [2] Cifrian, E., Guidry, A.J., O'Brien, C.N., Nickerson, S.C. and Marquardt, W.W. (1994) Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. J. Dairy Sci. 77, 970-983.
- [3] DeGraves, F.J. and Fetrow, J. (1993) Economics of mastitis and mastitis control. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 9, 421-434.
- [4] Ogawa, S.K., Yurberg, E.R., Hatcher, V.B., Levitt, M.A. and Lowy, F.D. (1985) Bacterial adherence to human endothelial cells *in vitro*. Infect. Immun. 50, 218-224.
- [5] Hamill, R.J., Vann, J.M. and Proctor, R.A. (1986) Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. Infect. Immun. 54, 833-836.
- [6] Vann, J.M. and Proctor, R.A. (1987) Ingestion of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells results in time- and inoculum-dependant damage to endothelial cell monolayers. Infect. Immun. 55, 2155-2163.
- [7] Almeida, R.A., Matthews, K.R., Cifrian, E., Guidry, A.J. and Oliver, S.P. (1996) *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. J. dairy Sci. 79, 1021-1026.

- [8] Bayles, K.W., Wesson, C.A., Liou, L.E., Fox, L.K., Bohach, G.A. and Trumble, W.R. (1998) Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 66, 336-342.
- [9] Wesson, C.A., Liou, L.E., Todd, K.M., Bohach, G.A., Trumble, W.R. and Bayles, K.W. (1998) *Staphylococcus aureus* agr and sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect. Immun.* 66, 5238-5243.
- [10] Dziewanowska, K., Patti, J.M., Deobald, C.F., Bayles, K.W., Trumble, W.R. and Bohach, G.A. (1999) Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* 67, 4673-4678.
- [11] Lammers, A., Nuijten, P.J.M. and Smith, H.E. (1999) The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 180, 103-109.
- [12] Moll, R., Franke, W.W. and Schiller, D.L. (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 31, 11-24.
- [13] Smedts, F., Ramaekers, F., Robben, H., Pruszczynski, M., Muijen, G.V., Lane, B., Leigh, I. and Vooijs, P. (1990) Changing patterns of keratin expression during progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Am. J. Pathol.* 136, 657-668.

- [14] Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M.G., Silder, R. and Goyert, S.M. (1988) The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J. Immunol.* 141, 547-552.
- [15] Van Camp, G., Chapelle, S. and De Wachter, R. (1993) Amplification and sequencing of variable regions in bacterial 23S ribosomal RNA genes with conserved sequences. *Curr. Microbiol.* 27, 147-151.
- [16] Ludwig, W., Kirchof, G., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Betzl, D., Ehrmann, M., Hertel, C., Jilg, S., Tatzel, R., Zitzelsberger, H., Liebl, S., Hochberger, M., Shah, J., Lana, D. and Wallnoef, P.R. (1992) Complete 23S ribosomal RNA sequences of Gram-positive bacteria with a low DNA G+C content. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 487-501.
- [17] Sayasith, K., Sauve, G. and Yelle, J. (1999) Analysis of the three enzymatic activities of HIV-1 integrase *in vitro* using minigels for detection of the reaction products. *Anal. Biochem.* 269, 189-192.
- [18] Southern, E. (1979) Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol.* 68, 152-176.
- [19] Schiller, D.L., Franke, W.W. and Geiger, B. (1982) A subfamily of relatively large and basic cyokeratin polypeptides as defined by peptide mapping is represented by one or several polypeptides in epithelial cells. *EMBO J.* 1, 761-769.

Legend of Figures

Fig. 1. FACS analysis of cell populations in the milk samples of cows affected from bovine mastitis. (A) Cells without antibody, autofluorescence of the cells in the gate R2. (B) Isolation in the gate R1 of macrophages (35.5%) with MoAb anti-CD14 PE. (C) Isolation in the gate R3 of alveolar cells (13.6%) with MoAb anti-cytokeratin FITC.

Fig. 2. DNA hybridization of amplified products for *Staphylococcus* using specific oligonucleotide probe labeled with [γ - 32 P]dATP. Lanes : 1 and 8, total cells not sorted; lanes 2 and 9, supernatants of the total cells not sorted; lanes 3 and 10, macrophages; lanes 4 and 11, supernatants of the macrophages; lanes 5 and 12, alveolar cells; lanes 6 and 13, supernatants of the alveolar cells; lanes 7 and 14, negative control without DNA; and lane 5, *Staphylococcus aureus* positive control. The band represents the presence of the *Staphylococcus* DNA.

Table I. Reactivity of the MoAb anti-CD14 PE (M5E2) and anti-cytokeratin FITC (CAM 5.2) against different cell types.

Types of cells	anti-CD14 PE	anti-cytokeratin FITC
U937 (CD14 ⁺) (monoblastoid cell line)	-	-
Human blood	+	-
Bovine blood	+	-
WI38 (lung epithelial cell line)	-	-
Human alveolar cells	-	+
Bovine mammary cells	-	+

+: positive reaction; -: negative reaction

Table II. Culture on blood agar plates and identification of intracellular living bacteria coming from unseparated and separated cells following the use of Fluorescence Activated Cell Sorting.

Bacteriology of milk	Total cells	Supernatant of total cells	Macrophages	Supernatant of macrophages	Alveolar cells	Supernatant of alveolar cells
<i>S. aureus</i> ^a	+	-	+	-	+	-
<i>S. aureus</i> ^a	+	-	+	-	+	-
<i>S. aureus</i> ^a	+	-	+	-	+	-
<i>S. aureus</i> ^a	+	-	+	-	-	-
<i>S. aureus</i> ^a	+	-	+	-	-	-
<i>S. agalactiae</i> ^a	-	-	-	-	-	-
<i>S. agalactiae</i> ^a	-	-	-	-	-	-
negative ^b	-	-	-	-	-	-
negative ^b	-	-	-	-	-	-

^a infected milk samples with *S. aureus* or *S. agalactiae*

^b milk samples obtained from uninfected cows

+: presence of living bacteria

-: absence of living bacteria

Table III. PCR^a and hybridization^b analysis of bacterial genome.

Bacteria	PCR	Hybridization
<i>S. aureus</i> (Bovine Mastitis isolate)	+	+
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 35984)	+	+
<i>S. hyicus</i> (ATCC 11249)	+	+
<i>S. carnosus</i> (ATCC 51365)	+	+
<i>S. uberis</i> (Bovine Mastitis isolate)	+	-
<i>S. agalactiae</i> (Bovine Mastitis isolate)	+	-
<i>S. dysgalactiae</i> (Bovine Mastitis isolate)	+	-
<i>E. coli</i> (ATCC 4157)	+	-
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 25619)	+	-
Bovine DNA	-	-

+: presence of bacterial DNA; -: absence of bacterial DNA

^a: use of two universal eubacterial primers for the conserved region of the 23S rRNA gene region position 2608-2627 and 2790-2771.

^b: use of a specific *Staphylococcus* probe for the 23S rRNA gene region, position 2747-2768.

Table IV. PCR and hybridization^c analysis of bacterial DNA in milk samples.

Bacteriology of milk	Total cells	Supernatant of total cells	Macrophage	Supernatant of macrophage	Alveolar cells	Supernatant of alveolar cells
<i>S. aureus</i> ^a	+	-	+	-	+	-
<i>S. aureus</i> ^a	+	-	+	-	+	-
<i>S. aureus</i> ^a	+	-	+	-	+	-
<i>S. aureus</i> ^a	+	-	+	-	+	-
<i>S. aureus</i> ^a	+	-	+	-	+	-
<i>S. agalactiae</i> ^a	-	-	-	-	-	-
<i>S. agalactiae</i> ^a	-	-	-	-	-	-
negative ^b	-	-	-	-	-	-
negative ^b	-	-	-	-	-	-

^a infected milk samples with *S. aureus* or *S. agalactiae*

^b milk samples coming from uninfected cows

^c Staphylococcus specific probe AH

+: presence of bacterial DNA

-: absence of bacterial DNA

Figure 1.

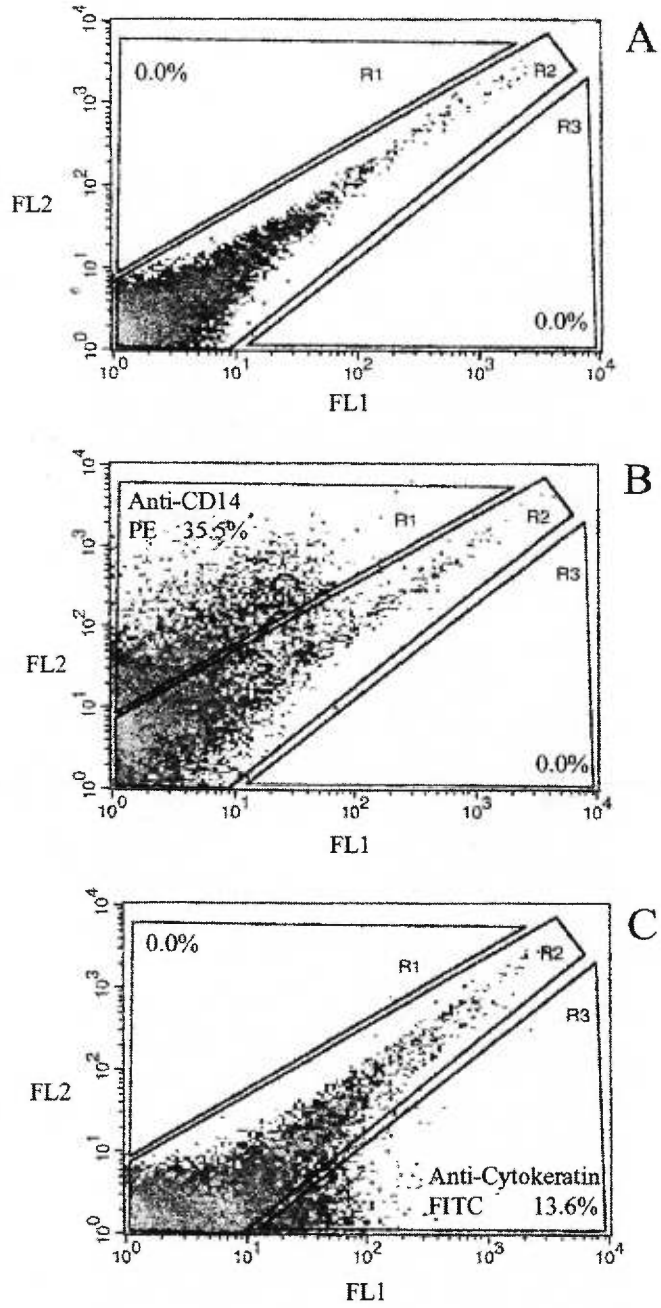
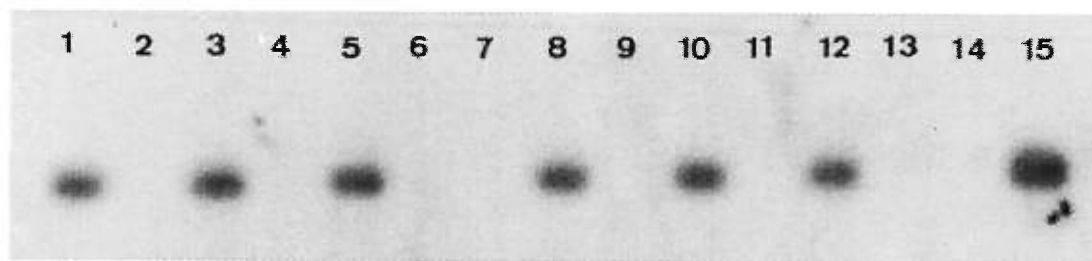


Figure 2.



↑
183 pb

DISCUSSION ET CONCLUSION

Il est reconnu que le système immunitaire de la vache, malgré un traitement d'antibiothérapie agressive, a peu de chance d'éradiquer une infection de la glande mammaire causée par *Staphylococcus aureus*. Étant donné le peu de succès de l'antibiothérapie et des vaccins disponibles contre l'infection à *Staphylococcus aureus*, le seul traitement vraiment efficace reste donc la prévention (Craven et coll., 1986; Sutra et Poutrel, 1994). Il est généralement admis que les principales pertes économiques dues à la mammite bovine sont attribuables à la diminution de la production laitière, au remplacement des vaches infectées, aux frais vétérinaires causés principalement par le pathogène contagieux *Staphylococcus aureus* (DeGraves et Fetrow, 1993). Les pertes sont de l'ordre de 90\$ à 250\$ par vache annuellement (DeGraves et Fetrow, 1993; Hoblet et coll., 1991).

Deux hypothèses principales sont susceptibles d'expliquer la chronicité et la persistance de la mammite bovine : 1) la formation d'un biofilm par les bactéries qui causent la mammite bovine; 2) la pénétration et la survie des bactéries qui causent la mammite bovine et plus particulièrement *Staphylococcus aureus* dans les cellules alvéolaires et/ou les macrophages.

La formation d'un biofilm par les différentes souches de *Staphylococcus aureus* n'a pas fait l'objet d'analyse lors de la présente étude. Conséquemment, nous ne traiterons que de la seconde hypothèse dans la discussion.

L'objectif du présent travail était de démontrer la présence ou l'absence de *Staphylococcus aureus* et/ou de son ADN dans les cellules alvéolaires et les

macrophages contenus dans le lait de vaches mammites infectées de façon naturelle à *Staphylococcus aureus* et à *Streptococcus agalactiae*.

Lors d'une première étape, notre travail a permis de démontrer, à l'aide d'amorces universelles, la présence intracellulaire d'ADN bactérien dans les cellules totales du lait en utilisant la technique de PCR (résultat non montré). L'internalisation de *Staphylococcus aureus* vivant dans les cellules du lait fut mise en évidence suite à l'étalement sur gélose de ces cellules préalablement lysées (résultat non montré).

La seconde étape a consisté à identifier des anticorps capables de réagir contre les cellules alvéolaires et les macrophages bovins provenant du lait pour des études ultérieures de cytométrie. L'anti-CD14 PE connu pour réagir avec les monocytes/macrophages et granulocytes humains a été mis en contact avec du sang humain, du sang bovin et avec la lignée cellulaire U937 (monoblastoid cell line). L'anti-CD14 PE a identifié les monocytes et les granulocytes dans le sang humain faisant ainsi office de référence positive (PharMingen). Le même anticorps s'est avéré négatif avec la lignée U937. Cette lignée est décrite dans la littérature comme étant CD14 négative et a servi de contrôle négatif (Haziot et coll., 1998). Finalement l'anti-CD14 PE a été testé avec du sang bovin et a réagi avec les monocytes et les granulocytes bovins par réaction croisée (Tableau I). L'anti-cytokératine FITC, connu pour réagir avec des cellules alvéolaires humaines, a été mis en contact avec des cellules alvéolaires humaines, mammaires bovines et avec la lignée cellulaire WI38 (lung epithelial cell line). L'anti-cytokératine a identifié les cellules alvéolaires humaines faisant ainsi office de référence positive (Becton

Dickinson). Le même anticorps s'est avéré négatif avec la lignée WI38, cette lignée ayant comme origine des cellules épithéliales du poumon. Finalement l'anti-cytokératine FITC a permis de reconnaître par réaction croisée les cellules mammaires bovines provenant de la biopsie d'une glande mammaire de vache (Tableau I). À l'aide du FACS, des sous-populations cellulaires pures provenant du lait de vache ont été séparées et isolées indépendamment. L'anti-cytokératine FITC a permis de récupérer les cellules alvéolaires tandis que l'anti-CD14 PE a permis de récupérer les macrophages (Figure 1). On n'a noté aucune réaction lors du contrôle isotypique effectué avec l'anticorps CD45RO PE (UCHL1) connu pour ne pas réagir contre les cellules bovines par réaction croisée (résultat non montré). Pour s'assurer de la plus grande pureté possible des populations cellulaires lors du tri, le FACS a été réglé à une vitesse maximale de 2000 événements par seconde et en mode sévère.

La troisième étape a permis de démontrer que l'hybridation de la sonde maison avec les produits d'amplification du PCR donnait seulement une réponse positive avec de l'ADN bactérien provenant du genre *Staphylocoque*. Nos résultats préliminaires avaient démontré que la réaction de PCR avec les amorces universelles 93a et 97ar (Van Camp et coll., 1993) amplifiait l'ADN bactérien, tandis que les témoins avec l'ADN eucaryote étaient négatifs (Tableau III). L'hybridation des produits d'amplification du PCR avec la sonde maison a confirmé la spécificité de l'ADN du genre *Staphylocoque* présent dans les cellules alvéolaires et les macrophages (Figure 2 et Tableau III).

Comme la validité de notre travail reposait entièrement sur le contrôle très rigoureux des différentes manipulations, un soin particulier a été apporté à chacune des étapes expérimentales. Lors des tests de PCR, nous avons utilisé un protocole très strict tel que décrit par Rosalind et Alasdair (1993) pour éviter l'amplification d'ADN contaminant. En bref, les différentes étapes du PCR, dont la préparation des échantillons, la préparation de la réaction, l'amplification et la détection des produits d'amplification, ont été réalisées dans quatre endroits physiques distincts. Les deux premières étapes ont été effectuées sous deux hottes à flux laminaire décontaminées à l'alcool et à l'ultraviolet avant chacune des utilisations. De plus, des pipettes différentes et des embouts avec filtre ont été utilisés pour chaque étape pour prévenir toute contamination extérieure par les aérosols. L'application de cette méthode rigoureuse, lors des étapes du PCR, a permis d'obtenir des résultats négatifs tels que démontrés par les témoins placés entre chaque série d'échantillons (Figure 2).

Une étape critique du travail a consisté à développer un traitement efficace pour les cellules isolées à partir du lait infecté. En effet, la validité du travail reposait sur l'efficacité des traitements à éliminer toute bactérie ou ADN exogènes aux cellules. Il s'agissait en effet de démontrer, hors de tout doute, que *Staphylococcus aureus* et son ADN détectés lors des tests se trouvaient seulement de façon intracellulaire. Lors des étapes préliminaires, nous avons tenté d'éliminer l'ADN bactérien et les bactéries exogènes avec divers protocoles de traitement cités dans la littérature. Certains protocoles contenaient seulement de la gentamicin (Bayles et coll., 1998; Dziejwanowska et coll., 1999; Lammers et coll.,

1999; 1987; Wesson et coll., 1998), d'autres contenaient de la lysostaphine (Hamill et coll., 1986; Vann et Proctor et coll., 1987) et le dernier contenait une combinaison de gentamicin et de lysostaphine (Almeida et coll., 1996). Suite à l'utilisation de ces traitements, de l'ADN bactérien a été retrouvé dans les surnageants cellulaires. Pour éliminer tout ADN et/ou toute bactérie exogènes, nous avons augmenté la concentration de gentamicine et de lysostaphine respectivement de 5 et 10 fois et nous avons ajouté des quantités élevées de pénicilline, de streptomycine et de DNase I avec son cofacteur divalent le magnésium (Chapitre 2). Ce protocole effectué à partir du lait contaminé a permis d'obtenir des surnageants négatifs lors des PCR et des hybridations qui ont suivi (Figure 2).

Les résultats présentés dans ce travail ont été réalisés à partir de dix échantillons de lait contaminé par *Staphylococcus aureus*, quatre échantillons de lait contaminé par *Streptococcus agalactiae* et quatre échantillons de lait négatif prélevé chez de jeunes vaches qui n'avaient jamais été infectées. Des analyses bactériologiques effectuées par un laboratoire clinique indépendant a confirmé la présence de ces bactéries dans les échantillons de lait. L'expérience d'hybridation effectuée avec les produits d'amplification du PCR et avec la sonde maison spécifique au Staphylocoque a démontré un signal avec les cinq échantillons de *Staphylococcus aureus*, alors que les échantillons de *Streptococcus agalactiae* et les témoins n'ont donné aucun signal (Tableau IV). Le fait que toutes les hybridations des surnageants cellulaires des échantillons se soient avérées négatives vient confirmer l'efficacité des traitements visant à éliminer les bactéries

et l'ADN exogènes. Lors des expériences de croissance bactérienne suite à l'étalement des cellules lysées sur gélose, tous les échantillons de *Staphylococcus aureus* provenant de cellules totales non triées et de macrophages ont permis de détecter du *Staphylococcus aureus* vivant, tandis que seulement trois échantillons sur cinq provenant de cellules alvéolaires ont permis d'isoler cette bactérie vivante (Tableau II). Un laboratoire indépendant a confirmé l'identification de *Staphylococcus aureus*. De plus, aucun échantillon de *Streptococcus agalactiae* et de lait témoin n'a permis de détecter des bactéries vivantes (Tableau II).

La démonstration, lors du présent travail, de la présence intracellulaire et de la survie de *Staphylococcus aureus* à partir de cellules alvéolaires et des macrophages provenant d'échantillons de lait de vaches mammitesuses est en corrélation avec les nombreuses études *in vitro* ayant démontré la présence intracellulaire de *Staphylococcus aureus* dans les lignées cellulaires MAC-T (Almeida et coll., 1996; Bayles et coll., 1998; Dziewanowska et coll., 1999; Hamill et coll., 1986; Lammers et coll., 1999; Vann et Proctor, 1987; Wesson et coll., 1998). Le résultat démontrant que *Staphylococcus aureus* vivant se retrouve chez un pourcentage plus élevé de macrophages comparativement aux cellules alvéolaires pourrait s'expliquer par le fait que *Staphylococcus aureus* se trouve en plus grand nombre dans les macrophages grâce à leur fonction de cellules phagocytaires. Ou bien, ce résultat pourrait indiquer que l'ingestion, par les macrophages, des corps apoptotiques alvéolaires contenant des bactéries amène davantage de protection à *Staphylococcus aureus* à l'intérieur du macrophage (Wesson et coll., 1998).

Nos résultats suggèrent que le phénomène de la présence intracellulaire de *Staphylococcus aureus* dans les cellules alvéolaires et les macrophages trouvé dans nos échantillons pourrait toucher une grande partie des vaches infectées par *Staphylococcus aureus*. Toutefois, il nous est impossible d'évaluer, à partir de notre étude, le pourcentage de cellules ainsi affectées. Ce pourcentage cependant devrait être infime car des études préliminaires effectuées en microscopie électronique à transmission (MET) n'ont pas permis de détecter ce type d'infection (résultat non montré). Il est par ailleurs reconnu qu'un événement se produisant à une fréquence égale ou inférieure à 10^3 ne peut pas être détecté par MET (Le Guellec, 1998).

Pour déterminer si *Staphylococcus aureus* est capable de survivre et de ressortir des cellules alvéolaires ou des macrophages, nous aurions pu mettre ces cellules en culture pour différents temps et vérifier si *Staphylococcus aureus* était encore capable de se multiplier.

La démonstration *in vitro* de l'invasion et de la survie de *Staphylococcus aureus* dans une niche protectrice intracellulaire peuvent expliquer la persistance à long terme de cette maladie chez la vache mammitieuse et le rôle clé joué par l'internalisation tel que suggéré par Dziewanowska et coll. (1999). L'internalisation de *Staphylococcus aureus* peut permettre de comprendre le pourquoi de l'inefficacité du système immunitaire et des traitements d'antibiotiques à éliminer ce pathogène si bien adapté à son milieu.

Notre étude confirme l'importance que l'industrie laitière devrait accorder à la prévention pour éviter la contagion par *Staphylococcus aureus*, car pour

l'instant il n'existe aucun traitement efficace. La prévention par l'utilisation de méthodes d'hygiène appropriées et le développement de nouveaux vaccins efficaces pourraient permettre d'éviter la propagation des cas de mammite bovine. Toutefois, le développement de vaccins efficaces contre *Staphylococcus aureus* reste dans le domaine du futur. Le seul vaccin (Lysigin®, Boehringer Ingelheim, 5180 South Drive Rd, Burlington, ON, Canada, L7L-5H4) disponible commercialement aux États-Unis pour lutter contre la mammite bovine possède une certaine efficacité uniquement lorsque combiné à un traitement d'antibiothérapie au tarissement. Il réduit alors la sévérité des cas de mammite à *Staphylococcus aureus* mais il n'a aucune efficacité pour prévenir l'infection (Tyler et coll., 1993).

D'autres avenues méritent d'être explorées en tenant compte de la présence de bactéries intracellulaires. Une avenue possible serait l'utilisation de liposomes-antibiotiques qui pourrait permettre de combattre les infections intracellulaires. En effet, les macrophages et les monocytes phagocytent avec avidité certains types de liposomes composés de dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC), de dimyristoyl phosphatidylglycerol (DMPG) et de polyéthylène glycol (PEG) (Wasan et Lopez-Berestein, 1996). Cette formulation donne un liposome hydrophile chargé négativement, ce qui favorise sa capture par les cellules phagocytaires (Allen, 1994). L'antibiotique pourrait alors entrer en contact avec les bactéries dans ce type de cellules. En ce qui concerne les cellules alvéolaires, c'est à dire des cellules non phagocytaires, certains liposomes pourraient fusionner avec ce type

de cellules permettant ainsi la pénétration de l'antibiotique. Il a été démontré que l'emploi d'antiviraux encapsulés dans des liposomes permet d'atteindre les virus internalisés dans les cellules T (Duzgunes et coll., 1999). Par exemple, les liposomes cationiques formés de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride (DOTMA) et de dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) fusionnent avec les membranes cellulaires permettant un transfert efficace de l'agent thérapeutique du liposome dans le cytoplasme de la cellule (Desormeaux et Bergeron, 1998). En définitive, certains moyens utilisés pour lutter contre les infections virales pourraient être adaptés aux infections bactériennes intracellulaires. Le développement de vaccins efficaces constituent le choix à privilégier.

En conclusion, ce travail a permis de démontrer, pour la première fois, la présence intracellulaire de *Staphylococcus aureus* et de son ADN dans les cellules alvéolaires et les macrophages isolés chez la vache ayant contracté de façon naturelle une mammite à *Staphylococcus aureus*. Ce travail confirme les études antérieures effectuées *in vitro* et suggère que la chronicité de telles infections qui résistent à l'antibiothérapie repose en partie sur la présence intracellulaire de *Staphylococcus aureus* dans les macrophages et cellules alvéolaires qui sécrètent le lait.

BIBLIOGRAPHIE

Alivehmas, T., Westphalen, P., Myllys, V. and Sandholm, M (1997). Binding of *Staphylococcus aureus* to milk fat globule increases resistance to penicillin-g. *J. dairy Res.* **64**, 253-260.

Allen, T.M. (1994). The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **13**, 285-309.

Almeida, R.A. and Oliver, S.P. (1995). Invasion of bovine mammary epithelial cells by *Streptococcus dysgalactae*. *J. Dairy Sci.* **78**, 1310-1317.

Almeida, R.A., Matthews, K.R., Cifrian, E., Guidry, A.J. and Oliver, S.P. (1996). *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. dairy Sci.* **79**, 1021-1026.

Almeida, R.A., Fang, W. and Oliver, S.P. (1999). Adherence and internalization of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells are mediated by host cell proteoglycans. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**, 313-317.

Almeida, R.A., Luther, D.A. and Oliver, S.P. (1999). Incubation of *Streptococcus uberis* with extracellular matrix proteins enhances adherence to and internalization into bovine mammary epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**, 81-85.

Almeida, R.A., Calvinho, L.F. and Oliver, S.P. (2000). Influence of protein kinase inhibitors on *Streptococcus uberis* internalization into bovine mammary epithelial cells. *Microb. Pathog.* **28**, 9-16.

Amorena, B., Gracia, E., Monzon, M., Leiva, J., Oteiza, C., Pérez, M., Alabart, J.L. and Hernandez-Yago, J. (1999). Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**, 43-55.

Anderson, J.C. (1976). Mechanisms of Staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis, *Br Vet J.* **132**, 229-245.

Anderson, J.C. (1982). Progressive pathology of Staphylococcal mastitis with a note on control, immunization, and therapy. *Vet. Rec.* **110**, 372-376.

Anderson, J.C. (1984). Absence of encapsulation in strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* **37**, 359-361.

Baselga, R., Albizu, I., De La Cruz, M., Del Cacho, E., Barberan, M. and Amorena, B. (1993). Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: Implications in colonization and virulence. *Infect. Immun.* **61**, 4857-4862.

Baselga, R., Albizu, I. and Amorena B. (1994). *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Vet. Microbiol.* **39**, 195-204.

Bayles, K.W., Wesson, C.A., Liou, L.E., Fox, L.K., Bohach, G.A. and Trumble, W.R. (1998). Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* **66**, 336-342.

Becker, Y. and Darai, G. (1995). PCR: protocols for diagnosis of human and animal virus diseases. Springer-Verlag, Heidelberg.

Bonavia, A., Arbour, N., Yong, V.W. and Talbot, P.J. (1997). Infection of primary cultures of human neural cells by human coronavirus 229E and OC43. *J. Virol.* **71**, 800-806.

Brown, S. (1984). Analysis and sorting of plant material by flow cytometry. *Physiol. Veget.* **22**, 341-349.

Buehring, G.C. (1990). Culture of mammary epithelial cells from bovine milk. *J. Dairy Sci.* **73**, 956-963.

Burton, J.L. and Kehrli, M.E. (1995). Regulation of neutrophil adhesion molecules and shedding of *Staphylococcus aureus* in milk of cortisol- and dexamethasone-treated cows. *Am. J. Vet. Res.* **56**, 997-1006.

Calvinho, L.F. and Oliver, S.P. (1998). Invasion and persistence of *Streptococcus dysgalactiae* within bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* **81**, 678-686.

Caputy, G.G. and Costerton, J.W. (1982). Morphological examination of the glycocalyxes of *Staphylococcus aureus* strains Wiley and Smith. *Infect. Immun.* **36**, 759-783.

Chandler, R.L., Smith, K. and Turfrey, B.A. (1980). Studies on the phagocytic potential of secretory epithelial cells in experimental mastitis. *J. Comp. Pathol.* **90**, 385-394.

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L. and Beachey, E.H. (1982). Adherence of slime-producing strains of *staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* **37**, 318-326.

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M. and Beachey, E.H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 996-1006.

Christensen, G.D., Baddour, L.M. and Simpson, W.A. (1987). Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production *in vitro* and *in vivo*. *Infect. Immun.* **55**, 2870-2877.

Cifrian, E., Guidry, A.J., O'Brien, C.N., Nickerson, S.C. and Marquardt, W.W. (1994). Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* **77**, 970-983.

Cockerill, P.N. (1988). Two methods that facilitate autoradiography of small ^{32}P -labeled DNA fragments following electrophoresis in agarose gels. *Anal. Biochem.* **168**, 451-454.

Concha, C. (1986). Cell types their immunological functions in bovine mammary tissues and secretions. *Nord Vet. Med.* **38**, 257-272.

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. and Marrie, T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**, 435-464.

Costerton, J.W. (1995). Overview of microbial biofilms. *J. Ind. Microbiol.* **15**, 137-140.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* **49**, 711-745.

Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.E., Nichols, W.W. and Götz, F. (1999). The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* **67**, 5427-5433.

Craven, N. and Anderson, J.C. (1984). Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action *in vitro* and *in vivo*. *J. Dairy Res.* **51**, 513-523.

Craven, N. and Williams, M.R. (1985). Defenses of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **10**, 71-127.

Craven, N., Anderson, J.C. and Jones, T.O. (1986). Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Res.* **118**, 290-291.

Cullen, G.A. and Hebert, C.N. (1967). Some ecological observations on micro-organisms inhabiting bovine skin, teat canals and milk. *Br. Vet. J.* **123**, 14-25.

Daley, M.J., Oldham, E.R., Williams, T.J. and Coyle, P.A. (1991). Quantitative and qualitative properties of host polymorphonuclear cells during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in cow. *Am. J. Vet. Res.* **52**, 474-479.

Dalton, H.M. and March, P.E. (1998). Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 252-255.

DeGraves, F.J. and Fetrow, J. (1993). Economics of mastitis and mastitis control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **9**, 412-434.

Desormeaux, A. and Bergeron, M. G. (1998). Liposomes as drug delivery system: a strategic approach for the treatment of HIV infection. *J. Drug Targ.* **6**, 1-15.

Dziewanowska, K., Patti, J.M., Deobald, C.F., Bayles, K.W., Trumble, W.R. and Bohach, G.A. (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**, 4673-4678.

Duzgunes, N., Pretzer, E., Simoes, S., Slepshkin, V. and Konopka, K. (1999). Liposome-mediated delivery of antiviral agents to human immunodeficiency virus-infected cells. *Mol. Memb. Biol.* **16**, 111-118.

Erskine, R.J. and Eberhart, R.J. (1990). Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control program that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **196**, 1230-1235.

Fey, P.D., Ulphani, J.S., Götz, F., Heilmann, C., Mack, D. and Rupp, M.E. (1999). Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* **179**, 1561-1564.

Fox, L.K. and Gay, J.M. (1993). Contagious mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **9**, 475-487.

Franke, W.W., Schmid, E., Freudenstein, C., Appelhans, B., Osborn, M., Weber, K. and Keenan, T.W. (1980). Intermediate-sized filaments of the prekeratin type in myoepithelial cells. *J. Cell Biol.* **84**, 633-654.

Freeman, D.J., Falkiner, F.R. and Keane, C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* **42**, 872-874.

Geha, D.J., Uhl, J.R., Gustafarro, C.A. and Persing, D.H. (1994). Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1768-1772.

Goddard, M.J., Wilson, B. and Grant, J.W. (1991). Comparison of commercially available cytokeratin antibodies in normal and neoplastic adult epithelial and non-epithelial tissues. *J. Clin. Pathol.* **44**, 660-663.

Gracia, E., Fernandez, A., Conchello, P., Alabart, J.L., Pérez, M. and Amorena, B. (1999). *In vitro* development of *Staphylococcus aureus* biofilms using slime-producing variants and ATP-bioluminescence for automated bacterial quantification. *Luminescence.* **14**, 23-31.

Gudding, R., McDonald, J.S. and Cheville N.F. (1984). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis : bacteriologic, histologic, and ultrastructural pathologic findings. *Am. J. Vet. Res.* **45**, 2525-2531.

Hamill, R.J., Van, J.M. and Proctor, R.A. (1986). Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect. Immun.* **54**, 833-836.

Haraldsson, I. and Jonsson, P. (1984). Histology and pathogenesis of mouse mastitis induced with *Staphylococcus aureus* mutants. *J. Comp. Pathol.* **94**, 183-196.

Harmon, R.J. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* **77**, 2103-2112.

Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M.G., Silder, R. and Goyert, S.M. (1988). The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J. Immunol.* **141**, 547-552.

Heilmann, C., Gerke, C., Perdreau-Remington, F. and Götz, F. (1996). Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect. Immun.* **64**, 277-282.

Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakon, N., Mack, D. and Gotz, F. (1996). Molecular basis of intracellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* **20**, 1083-1091.

Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G. and Götz, F. (1997). Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.* **24**, 1013-1024.

Hillerton, J.E., Bramley, A.J., Staker, R.T. and McKinnon, C.H. (1995). Patterns of intramammary infection and clinical mastitis over a 5 year period in a closely monitored herd applying mastitis control measures. *J. Dairy. Res.* **62**, 39-50.

Hoblet, K.H., Schnitkey, G.D., Arbaugh, D., Hogan, J.S., Smith, K.L., Schoenberger, P.S., Todhunter, D.A., Hueston, W.D., Pritchard, D.E., Bowman, G.L., Heider, L.E., Brockett, B.L. and Conrad, H.R. (1991). Costs associated with selected preventive practices and with episodes of clinical mastitis in nine herds with low somatic cell counts. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **199**, 190-196.

Hortet, P. and Seegers, H. (1998). Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cow. *Prev. Vet. Med.* **37**, 1-20.

Hussain, M., Herman, M., von Eiff, C., Perdreau-Remington, F. and Peters, G. (1997). A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect. Immun.* **65**, 519-524.

Huynh, H.T., Robitaille, G. and Turner, J.D. (1991). Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): An *in vitro* model for bovine lactation. *Exp. Cell Res.* **197**, 191-199.

Iturralde, M., Aguilar, B., Baselga, R. and Amorena, B. (1993). Adherence of ruminant mastitis *Staphylococcus aureus* to epithelial cells from ovine mammary gland primary culture and from a rat intestinal cell line. *Vet. Microbiol.* **38**, 115-127.

Jones, G.M., Pearson, R.E., Clabaugh, G.A and Heald, C.W. (1984). Relationships between somatic cell counts and milk production. *J. Dairy Sci.* **67**, 1823-1831.

Jones, M.N., Song, Y.H., Kaszuba, M. and Reboiras, M.D. (1997). The interaction of phospholipid liposomes with bacteria and their use in the delivery of bactericides. *J. Drug Target.* **5**, 25-34.

Kehrli, M.E. and Shuster, D.E. (1994). Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* **77**, 619-627.

Kitchen, B.J. (1981). Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.* **48**, 167-188.

Lam, T.J.G.M., Schukken, Y.H., Vliet, J.H.V., Grommers, F.J., Tielen, M.J.M. and Brand, A. (1997). Effect of natural infection with minor pathogens on susceptibility to natural infection with major pathogens in the bovine mammary gland. *Am. J. Vet. Res.* **58**, 17-22.

Lammers, A., Nuijten, P.J.M. and Smith, H.E. (1999). The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**, 103-109.

Lammers, A., Nuijten, P.J.M., Kruijt, E., Stockhofe-Zurwieden, N., Vecht, U., Smith, H.E. and van Zijderveld, F.G. (1999). Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell cultures. *Vet. Microbiol.* **67**, 77-89.

Langermans, J.A.M., Hazenbos, W.L.W and Furth. R.V. (1994). Antimicrobial functions of mononuclear phagocytes. *J. Immunol. Meth.* **174**. 185-194.

Le Guellec, D. (1998). Ultrastructural *in situ* hybridization : a review of technical aspects. *Bio. Cell.* **90**, 297-306.

Le Louedec, C. (1978). Efficacité des antibiotiques contre les mammites bovines staphylococciques et streptococciques. *Ann. Rech. Vet.* **9**, 63-88.

Leader, M., Patel, J., Makin, C. and Henry, K. (1986). An analysis of the sensitivity and specificity of the cytokeratin marker CAM5.2 for epithelial tumors. Results of a study of 203 sarcomas, 50 carcinomas and 28 malignant melanomas. *Histopathol.* **10**, 1315-1324.

Lescourret, F. and Coulon. J.B. (1994). Modeling the impact of mastitis on milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.* **77**, 2289-2301.

Loken, M.R., Sweet, R.G. and Herzenberg, L.A. (1976). Cell discriminating by multiangle light scattering. *J. Histochem. Cytochem.* **24**, 284-291.

Mac Faddin, J.F. (1980). *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2nd ed. Williams and Wilkins, London.

Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H. and Laufs, R. (1996). The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: Purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* **178**, 175-183.

Mack, D., Riedwald, J., Rohde, H., Magnus, T., Feucht, H.H., Elsner, H.A., Laufs, R. and Rupp, M.E. (1999). Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect. Immun.* **67**, 1004-1008.

Makin, C.A., Bobrow, L.G. and Bodner, W.F. (1984). Monoclonal antibody to cytokeratin for use in routine histopathology. *J. Clin. Pathol.* **37**, 975-983.

Matthews, K.R., Almeida, R.A. and Oliver, S.P. (1994). Bovine mammary epithelial cell invasion by *Streptococcus uberis*. *Infect. Immun.* **62**, 5641-5646.

McKenney, D., Hübner, J., Muller, E., Wang, Y., Goldman, D.A. and Pier, G.B. (1998). The *ica* of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect. Immun.* **66**, 4711-4720.

Meek, A.H., Martin, S.W., Stone, J.B., McMillan, I., Britney, J.B. and Grieve D.G. (1986). The relationship among current systems, production, disease and drug usage on Ontario dairy farms. *Can. Vet. Res.* **50**, 7-14.

Melamed, M.R., Lindmo, T. and Mendelsohn, M.L. (1990). *Flow Cytometry and Sorting*. 2nd ed. Wiley-Liss, USA.

Merritt, K., Gaiind, A. and Anderson, J.M. (1998). Detection of bacterial adherence on biomedical polymers. *J. Biomed. Mater. Res.* **39**, 415-422.

Mertz, L.M. and Rashtchian, A. (1994). Nucleotide imbalance and polymerase chain reaction: effects on DNA amplification and synthesis of high specific activity radiolabeled DNA probes. *Anal. Biochem.* **221**, 160-165.

Messier, S., Nadeau, M. and Higgins, R. (1994). Sensibilité de *Streptococcus agalactae* envers différents antibiotiques. *Le médecin vétérinaire du Québec.* **24**, 70-72.

Mittelman, M.W. (1998). Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J. Dairy. Sci.* **81**, 2760-2764.

Moldovan, A. (1934). Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. *Science.* **80**, 188-193.

Moll, R., Franke, W.W. and Schiller, D.L. (1982). The catalog of human cytokeratins: Pattern of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* **31**, 11-24.

Naglik, J.R., Newport, G., White, T.C., Fernandes-Naglik, L.L., Greenspan, J.S., Greenspan, D., Sweet, S.P., Challacombe, S.J. and Agabian, N. (1999). *In vivo* analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect. Immun.* **67**, 2482-2490.

Norcross, N.L. and Opdebeeck, J.P. (1983). Encapsulation of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Vet Microbiol.* **8**, 397-404.

Ogawa, S.K., Yurberg, E.R., Hatcher, V.B., Levitt, M.A. and Lowy, F.D. (1985). Bacterial adherence to human endothelial cells *in vitro*. *Infect. Immun.* **50**, 218-224.

Opdebeeck, J.P. and Norcross, N.L. (1983). Frequency and immunologic cross-reactivity of encapsulated *Staphylococcus aureus* in bovine milk in New York. *Am. J. Vet. Res.* **44**, 936-988.

Opdebeeck, J.P. and Frost, A.J. (1987). Effect of milk whey on adhesion of bacteria to bovine udder epithelial cells. *Aust. Vet. J.* **64**, 282-283.

Opdebeeck, J.P., Frost, A.J., O'Byle, D. and Norcross, N.L. (1987). The expression of capsule in serum-soft agar by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **13**, 225-234.

Opdebeeck, J.P., Frost, A.J. and O'boyle, D. (1988). Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. *Vet. Microbiol.* **16**, 77-86.

Owens, W.E., Ray, C.H., Watts, J.L. and Yancey, R.J. (1997). Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* **80**, 313-317.

Paape, M.J., Guidry, A.J., Jain, N.C. and Miller, R.H. (1991). Leucocytic defense mechanisms in the udder. *Flem. Vet. J.* **62**(suppl 1), 95-109.

Paul, W.E. (1993). *Fundamental Immunology*. 3rd ed. Raven Press, USA.

- Perras, P., Platanow, I., Chartrand, A. and Simard, J. (1977). *La mammite bovine*. Ministère de l'Agriculture, Québec.
- Piccini, R., Bronzo, V., Moroni, P., Luzzago, C. and Zecconi, A. (1999). Study on the relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **66**, 501-510.
- Postle, D.S., Roguinsky, M and Poutrel, B. (1978). Induced Staphylococcal infections in the bovine mammary gland. *Am. J. Vet. Res.* **39**, 29-35.
- Potera, C. (1996). Biofilms invade microbiology. *Science.* **79**, 1021-1026.
- Prescott, Harley and Klein, (1995). *Microbiologie*. DeBoeck Université, Bruxelles.
- Relman, D.A., Loutit, J.S., Schmidt, T.M., Falkow, S. and Tompkins, L.S. (1990). The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1573-1580.
- Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. (1996). *Immunology*. 4th ed. Mosby, USA.
- Rosalind, A.E., Alasdair, C.S. (1993). *Polymerase chain reaction (PCR): the technique and its applications*. Landes Company.
- Ross, G.D. (1986). *Immunobiology of the Complement System*. Academic Press, USA.
- Salyers, A.A. and Whitt, D.D. (1994). *Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach*. ASM press, USA.

Saruta, K., Hoshina, S. and Machida, K. (1995). Genetic identification of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction using base-pair mismatch in 16S ribosomal RNA gene. *Microbiol. Immunol.* **39**, 839-844.

Schalm, O.W., Carroll, E.K. and Jain, N.C. (1971). *Bovine Mastitis*. Lea & Febiger, Philadelphia.

Schiller, D.L., Franke, W.W. and Geiger, B. (1982). A subfamily of relatively large and basic cytokeratin polypeptides as defined by peptide mapping is represented by one or several polypeptides in epithelial cells. *EMBO J.* **1**, 761-769.

Schmid, E., Franke, W.W., Grund, C., Schiller, D.L., Kolb, H. and Paweletz, N. (1983). An epithelial cell line with elongated myoid morphology derived from bovine mammary gland. *Exp. Cell Res.* **146**, 309-328.

Schmid, E., Schiller, D.L., Grund, C., Stadler, J., Franke, W.W. (1983). Tissue type-specific expression of intermediate filament proteins in a cultured epithelial cell line from bovine mammary gland. *J. Cell Biol.* **96**, 37-50.

Schowalter, D.B. and Sommer, S.S. (1989). The generation of radiolabeled DNA and RNA probes with polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **177**, 90-94.

Schukken, Y.H., Leslie, K.E., Barnum, D.A., Mallard, B.A., Lumsden, J.H., Dicks, P.C., Vessie, G.H. and Kehrl, M.E. (1999). Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: Quarter and cow effects determining the probability of infection. *J. Dairy Sci.* **82**, 2393-2401.

Schumacher-Perdreau, F., Heilmann, C., Peters, G., Götz, F. and Pulverer, G. (1994). Comparative analysis of biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain and its adhesion-positive, accumulation-negative mutant M7. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**, 71-78.

Sears, P.M., Smith, B.S., English, P.B., Herper, P.S. and Gonzalez, R.N. (1990). Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.* **73**, 2785-2789.

Shapiro, H.M. (1995). *Practical Flow Cytometry*. 3rd ed. Wiley-Liss, USA

Sharpless, T., Traganos, F. and Darzynkiewicz, Z. (1975). Discrimination between single cells and cell aggregates by direct measurements. *Acta. Cytol.* **19**, 577-581.

Simmons, D.L., Tan, S., Tenen, D.G., Nicholson-Weller, A. and Seed, B. (1989). Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood.* **73**, 284-289.

Smedts, F., Ramaekers, F., Robben, H., Pruszczynski, M., Muijen, G.V., Lane, B., Leigh, I. and Vooijs, P. (1990). Changing patterns of keratin expression during progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Am. J. Pathol.* **136**, 657-668.

Smith, K.L. and Hogan, J.S. (1993). Environmental mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **9**, 489-498.

Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K. and DeRosa, D. (1997). Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* **80**, 1851-1865.

Steinert, P.M., Wantz, M.L. and Idler, W.W. (1982). *o*-Phosphoserine content of intermediate filaments subunits. *Biochemistry.* **21**, 177-183.

Stewart, J.N., Mounir, S. and Talbot, P.J. (1992). Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. *Virology*. **191**, 502-505.

Sundolf, S.F. (1989). Drug and chemical residues in livestock. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **5**, 411-449.

Sutra L, Rainard, P. and Poutrel, B. (1990). Phagocytis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2253-2258.

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

Thakker, M.J., Park, J.S., Carey, V. and Lee, J.C. (1998). *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect. Immun.* **66**, 5183-5189.

Thomas, L.H., Leigh, J.A., Bland, A.P. and Cook, R.S. (1992). Adherence and colonization by bacterial pathogens in explant cultures of bovine mammary tissue. *Vet. Res. Comm.* **16**, 87-96.

Thomas, V.L., Sanford, B.A., Moreno, R. and Ramsay, M.A. (1997). Enzyme-linked lectinsorbent assay measures N-acetyl-D-glucosamine in matrix biofilm produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Curr. Microbiol.* **35**, 249-254.

Tizard, I.R. (1996). *Veterinary Immunology*. 5th ed. W.B. Saunders company, USA.

Tojo, M., Yamashita, N., Goldmann, D.A. and Pier, G.B. (1988). Isolation and characterization of capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* **157**, 713-722.

Tyler, J.W., Cullor, J.S. and Ruffin, D.C. (1993). Immunization and immunotherapy for mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **9**, 537-549.

Vaarst, M. and Enevoldsen, C. (1997). Patterns of clinical mastitis manifestations in Danish organic dairy herds. *J. Dairy Res.* **64**, 23-37.

Van, J.M. and Proctor, R.A. (1987). Ingestion of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells results in time- and inoculum-dependant damage to endothelial cell monolayers. *Infect. Immun.* **55**, 2155-2163.

Van Camp, G., Chapelle, S. and De Wachter, R. (1993). Amplification and sequencing of variable regions in bacterial 23S ribosomal RNA genes with conserved sequences. *Curr. Microbiol.* **27**, 147-151.

Vesga, O., Groeschel, M.C., Otten, M.F., Brar, D.W. and Van, J.M. (1996). *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J. Infect. Dis.* **173**, 739-742.

Von Eiff, C., Heilmann, C., Herrmann, M. and Peters, G. (1999). Basic aspect of the pathogenesis of Staphylococcal polymer-associated infections. *Infection.* **27(suppl.1)**, 7-10.

Wasan, K.M. and Lopez-Berestein, G. (1996). Characteristics of lipid-based formulations that influence their biological behavior in the plasma of patients. *Clin. Infec. Dis.* **23**, 1126-1138.

Watson, D.L. and Prideaux, J.A. (1979). Comparisons of *Staphylococcus aureus* grown *in vitro* or *in vivo*. *Microbiol. Immunol.* **23**, 543-547.

Watson, D.L. (1982). Virulence of *Staphylococcus aureus* grown *in vitro* or *in vivo*. *Res. Vet. Sci.* **32**, 311-315.

Watson, D.L. and Watson, N.A. (1989). Expression of a pseudocapsule by *Staphylococcus aureus*: Influence of cultural conditions and relevance to mastitis. *Res. Vet. Sci.* **47**, 152-157.

Watts, J.L. (1988). Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **16**, 41-66

Wesson, C.A., Liou, L.E., Todd, K.M., Bohach, G.A., Trumble, W.R. and Bayles, K.W. (1998). *Staphylococcus aureus* agr and sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect. Immun.* **66**, 5238-5243.

Winder, S.J., Turvey, A. and Forsyth, I.A. (1992). Characteristics of ruminant mammary epithelial cells grown in primary culture in serum-free medium. *J. Dairy Sci.* **59**, 491-498.

Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.

Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. and Mathison, J.C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* **249**, 1431-1433.

Zavision, B., Bramley, A.J. and Politis, I. (1996). Cell cycle regulation of mammary epithelial cell detachment by *Staphylococcus aureus*. *J. dairy Sci.* **63**, 543-553.

Ziebuhr, W., Heilmann, C., Gotz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E. and Hacker, J. (1997). Detection of intracellular adhesion gene cluster (ica) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.* **65**, 890-896.

Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Löbner, I., Götz, F. and Hacker, J. (1999). A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol. Microbiol.* **32**, 345-352.