peut se lier à la leucine, et quand le coefficient de solubilité de celle-ci est dépassé, elle se sépare en grains sous forme de son anhydride, celui-ci ne se dissolvant pas si facilement dans l'eau froide que la leucine. Nous savons par DESTREM que l'anhydride de la leucine se transforme très difficilement dans l'eau en leucine.

Vu que l'anhydride de la tyrosine donne des grains très semblables à ceux de l'anhydride de la leucine, on ne peut pas sans analyse dire de façon précise si tous les grains observés dans les fromages murs sont composés d'anhydride de la leucine, ou si quelques-uns sont de l'anhydride de la tyrosine ; cela dépend de la fermentation lactique, qui s'effectue dans les fromages jeunes, et de l'égouttage des fromages.

Dans le cas où la proportion d'acide lactique est plus grande que la quantité de tyrosine mise en liberté, la leucine peut s'y unir également ; la solubilité de l'anhydride de la leucine s'élève alors et on n'observe que peu de grains dans les produits de la décomposition. Dans la couche superficielle des fromages d'Olomouc, on ne voit que rarement des grains quoique ces fromages subissent des changements très profonds.

Les fromages sont préparés avec une caillebote produite par la fermentation lactique, la caséine retient alors une forte proportion d'acide lactique et elle reste liée avec les produits de la décomposition. Dans les couches superficielles où la réaction alcaline se produit, la solubilité de la tyrosine et de la leucine est plus grande et ces corps restent alors en solution.

Fig. 5. — Les grains du mélange des anhydrides de la tyrosine et de la leucine.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES LEUCOCYTES DU LAIT ET ESSAI DE LEUCOCYTO-DIAGNOSTIC DES DIFFÉRENTS ÉTATS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DE CETTE SÉCRÉTION

par E. BOURGEOIS

Docteur-Vétérinaire

Vétérinaire inspecteur sanitaire du Département de la Seine

Introduction

S'il était interdit de livrer à la consommation un lait mouillé ou partiellement écrémé, il n'existait pas jusqu'à ces dernières années, en France, de réglementation permettant d'éliminer les laits pathologiques,

anormaux et malpropres. Le décret du 25 mars 1924, concernant le commerce du lait et des produits de laiterie, est enfin venu combler cette lacune regrettable. L'article 2 de ce décret stipule en effet :

Ne peut être considéré comme lait propre à la consommation humaine :

1° *Le lait provenant d'animaux atteints de maladies dont la nomenclature sera donnée par arrêté du Ministre de l'Agriculture, pris sur avis du Comité consultatif des Epizooties ;*

2° *Le lait coloré, malpropre ou mal odorant ;*

3° *Le lait provenant d'une traite opérée moins de sept jours après le part, et, d'une manière générale, le lait contenant du colostrum ;*

4° *Le lait provenant d'animaux mal nourris et manifestement surmenés.*

L'application satisfaisante des dispositions qui précèdent nécessite tout d'abord un *contrôle sanitaire à la production* ayant pour but de vérifier l'état du lait à sa sortie de la mamelle ; ce contrôle semble ne pouvoir être exercé que par des vétérinaires, eux seuls réunissant les connaissances cliniques, physiques, chimiques et biologiques indispensables, ils sont d'ailleurs comme à pied d'œuvre, puisque familiers de l'exploitation où ils assurent déjà le traitement des animaux malades. Toute femelle laitière ayant mis bas dans la semaine, ou atteinte d'une maladie générale (tuberculose, surmenage, etc.) ou enfin présentant une affection *tapageuse* ou *insidieuse* de la mamelle, serait reconnue et son lait déclaré impropre à la consommation. *Ce contrôle, pour atteindre son maximum d'efficacité, sera basé sur l'examen du lait quartier par quartier.*

Pour satisfaire au deuxième paragraphe du décret précité, un second *contrôle*, plus justement appelé *hygiénique*, s'impose ; il aurait uniquement pour but l'obtention de laits propres, et son champ d'action porterait sur les divers points de la route parcourue par le lait, de l'étable à la maison du consommateur. Il s'adressera nécessairement à des mélanges de laits de l'examen desquels il serait téméraire d'attendre des renseignements permettant le contrôle sanitaire primitivement envisagé.

Le décret du 25 mars 1924 est un nouveau-né dont on ne prévoit pas encore les premiers pas : aucun contrôle sanitaire à la production n'est institué ; aucun contrôle hygiénique des fournitures du lait n'est encore pratiqué officiellement. Notons toutefois que sur l'heureuse initiative de M. C. ROELAND, Docteur-Vétérinaire, Conseiller municipal de Paris, Président de la *Ligue du lait*, un essai de contrôle de la propreté des laits approvisionnant Paris, encore tout à son début, est tenté par le Service vétérinaire sanitaire de la Seine. Souhaitons qu'il se développe.

Nous ne parlerons pas de la répression des fraudes en ce qui concerne le lait ; son intérêt n'a rien à voir avec le point de vue qui nous occupe, un lait très bon chimiquement pouvant être d'une hygiène détestable.

En attendant que toute garantie soit donnée au consommateur, examinons les moyens dont disposera le futur contrôleur vétérinaire à la production.

Pour juger de la qualité des laits, la science laitière s'est d'abord contentée des *données fournies par les sens*. Cela permet d'éliminer les laits physiquement anormaux : a) la *saveur salée* apparaît en effet au cours d'une mammite ; b) un goût métallique indique le séjour prolongé du lait dans des récipients inaptes à cet usage ; c) une saveur amère permet de dénoncer une alimentation défectueuse, etc.

Grâce à la matière grasse qu'il contient, le lait absorbe facilement les *odeurs*. L'odeur d'étable, ammoniacale ou fécaloïde, traduit la malpropreté de la récolte ; au cours d'une mammite grave, l'odeur fétide du pus ou de la nécrose peut être perçue.

La suspicion peut être éveillée par des *colorations variées* dues à la flore microbienne (lait bleu) ou à la présence du sang (lait rouge, rose ou jaunâtre). Une *opacité* anormale, la présence de grumeaux sont autant de constatations à la portée d'un œil facile à exercer. Une *viscosité* exagérée peut être attribuée à une parturition tout à fait récente (colostrum) ou à une mammite, le lait étant dans ces deux cas anormalement albumineux.

Puis d'autres données physiques et chimiques ont permis de déceler surtout la fraude : recherche : a) de la *densité*, b) du *point de congélation* par la méthode cryoscopique, c) de la *proportion d'extrait sec* ou du *taux de la matière grasse*.

Enfin les acquisitions *bio-chimiques* sont venues heureusement compléter les moyens de contrôle ; la connaissance de certaines diastases, notamment celle de la *catalase*, est de la plus grande importance au point de vue du contrôle sanitaire. Une quantité notable de cette diastase, secrétée par les leucocytes, est la preuve d'un *afflux leucocytaire anormal* dans les cavités glandulaires. Déjà, *en l'absence de tout signe clinique de la mamelle ou de modifications de l'état physique du lait*, la détermination de l'indice catalasimétrique permet la suspicion, mais reste néanmoins incapable d'attribuer ce phénomène à la rétention ou à l'infection. En effet, dans un lait de mélange, la constatation d'un degré catalasimétrique anormalement élevé ne permettrait même pas de savoir s'il y a dans le troupeau qui a fourni le lait examiné, une vache fraîchement vélée ou une vache atteinte de mammite, *puisque colostrum et lait de mammite sont également riches en leucocytes et par conséquent en catalase*.

Chaque fois, l'examen microscopique s'imposera donc pour établir le diagnostic différentiel.

L'épreuve de la *réductase* n'a pas autant d'intérêt que celle de la catalase au point de vue du contrôle sanitaire. Si une grande quantité de cette diastase indique un taux élevé de microbes dans le lait examiné

et entraîne son élimination, elle ne peut donner d'indication sur l'origine de ces microbes : mammites ou souillures après la traite. Là encore l'examen microscopique est une nécessité pour la différenciation étiologique.

Ces méthodes biochimiques de contrôle du lait, catalasimétrie et épreuve de la réductase, *n'établissent donc encore qu'un soupçon* sur la présence possible d'une mammite ; et cette suspicion conduit en définitive à *l'examen microscopique*, seul capable de donner les renseignements précis qui permettront de classer le lait suspect et de donner les raisons de son élimination.

Nous voilà loin de la période objective de la science laitière où le contrôle sanitaire se contentait des données fournies par les sens. Combien de laits alors reconnus propres à la consommation auraient dû pourtant être préalablement assainis ?

LANGRAND, du Service vétérinaire sanitaire du département de la Seine, dit en 1910 : « Les laits prélevés étaient quelquefois d'apparence normale et renfermaient cependant des microbes spécifiques ; il en était ainsi dans plusieurs cas de mammite streptococcique ». Nous avons eu faire une semblable constatation dans les circonstances suivantes : au début de nos recherches qui avaient d'abord pour but l'étude des variations de la formule leucocytaire du lait chez une vache saine, nous faisons des prélèvements dans une étable où s'approvisionnaient de préférence, pour avoir du lait frais et *sain*, des parents de nourrissons. Notre premier prélèvement fut effectué sur une vache hollandaise, âgée de cinq ans, au huitième mois de la lactation et dont la mamelle ne présentait rien d'anormal à l'examen clinique ; *seul le rendement laitier avait diminué*. Etant donné le moment avancé de la période de lactation, cela ne nous sembla pas extraordinaire, mais quel ne fut pas notre étonnement de trouver à l'examen des frottis la plus belle flore streptococcique qu'on puisse souhaiter !

Donc, un lait *provenant d'une mamelle apparemment saine*, d'un aspect absolument normal, peut être *impropre à la consommation*. Cette constatation suffit à **considérer l'examen microscopique comme indispensable** ; le contrôle sanitaire du lait l'exige impérieusement.

Basées sur *l'examen microscopique*, de nouvelles méthodes de contrôle des fournitures de lait sont nées en Amérique ; elles ont pour objet l'appréciation de la valeur sanitaire d'un lait par le *nombre de microbes* ou le *nombre de cellules* qu'il contient.

Le point de vue cellulaire, ou pour plus de précision, *le point de vue leucocytaire*, seul, retiendra notre attention.

Les leucocytes du lait ; leur origine, leur rôle

On a longtemps discuté sur la nature des cellules du lait. Certains auteurs prétendaient que tout le contenu cellulaire du lait venait du sang et était par conséquent uniquement constitué par des leucocytes ;

une autre école, au contraire, admettait que les cellules du lait étaient toutes d'origine épithéliale et qu'à l'état normal, aucun globule blanc ne pouvait s'y rencontrer. Depuis cette époque déjà lointaine, les travaux des histologistes et, avec eux, le remarquable traité d'hygiène du lait de notre confrère W. ERNST, publié en 1913(1), ont démontré la nature double des cellules du lait. Toutefois, on s'accorde aujourd'hui à reconnaître que *les leucocytes constituent la plus grande partie du contenu cellulaire du lait, une faible part revenant aux cellules épithéliales.*

Si l'on considère l'usure physiologique d'une glande aussi active que la mamelle et les altérations pathologiques très variables en intensité et en étendue qu'elle subit, comment ne pas admettre la présence de ces dernières dans le lait ? Ces cellules épithéliales *glandulaires* ont été détachées de la membrane hyaline des acini ou de la membrane de revêtement des canaux excréteurs et du sinus galactophore ; toutes sont des éléments immobiles, devenus inactifs, plus ou moins dégénérés, morts, et vraiment de peu d'intérêt dans la recherche de l'état sanitaire d'un lait.

Les *leucocytes*, au contraire, éléments vivants, actifs, quelques-uns mobiles, grâce à leurs prolongements amiboïdes, constants dans le lait, mais en quantité très variable, ont retenu depuis longtemps l'attention des hygiénistes pour lesquels la question de : a) leur *origine*, b) leur rôle et c) des *indications à tirer de leur examen* s'est immédiatement posée.

ORIGINE DES LEUCOCYTES DU LAIT. — Très irriguée comme toutes les glandes, grâce au réseau capillaire sanguin qui entoure la membrane basale, assise des cellules sécrétrices, la mamelle est de plus un filtre — qui sélectionne et transforme — à travers lequel passe un véritable torrent liquide. Si l'on songe à la facilité avec laquelle certains leucocytes, doués de mouvements amiboïdes, traversent un épithélium en s'infiltrant entre les cellules, *on a quelque raison de penser, qu'en dehors de tout état pathologique, des leucocytes du sang puissent être entraînés avec le liquide de sécrétion.* Les polynucléaires à granulations neutrophiles et éosinophiles, beaucoup plus abondants dans le sang que dans la lymphe, semblent surtout d'origine sanguine, et c'est uniquement par cette voie qu'ils arrivent dans le lait.

Il est possible qu'il n'en soit pas de même pour toutes les catégories de leucocytes et que la voie lymphatique soit aussi empruntée par certains pour passer dans le lait.

E. APOSTOLEANO a montré récemment la richesse et le rôle important du système lymphatique de la mamelle ; il fait voir ses rapports intimes avec les diverses parties de la glande ; il décrit le plexus sous-aréolaire, les vaisseaux lymphatiques parallèles aux canaux galactophores et aux canaux excréteurs, les capillaires lymphatiques enfin enserrant les lobules glandulaires eux-mêmes de telle façon que ceux-ci se trouvent

(1) La seconde édition vient de paraître (Voir *Le Lait*, t. VII, p. 368, 1927).

placés pour ainsi dire comme dans un sac lymphatique. D'autre part, on sait que la lymphe contient 80 % de lymphocytes et 10 à 12 % de gros mononucléaires ; aussi peut-on se demander si ces deux catégories de leucocytes passent, non seulement du sang dans le lait, mais encore directement de la lymphe dans le lait.

En résumé, il nous semble que les leucocytes du lait pourraient avoir une *double origine* : origine sanguine pour les polynucléaires granulocytes et origine à la fois sanguine et lymphatique pour les monocytes (lymphocytes, et gros mononucléaires). Les constatations que nous avons faites, et dont nous parlerons plus loin, en étudiant les rapports leucocytaires du lait normal et du sang, sont en faveur de cette manière de voir.

ROLE DES LEUCOCYTES DU LAIT. — Comme RANVIER l'avait vu depuis longtemps, le leucocyte est une véritable glande monocellulaire, mobile et polyvalente. Il peut sécréter tous les types de diastases : ferments d'oxydation ou de réduction, ferments d'hydratation ou de déshydratation, ferments de coagulation, etc (1).

Si les leucocytes ne constituent pas à eux seuls véritablement du pus, ils en sont les agents digestifs, opérant la démolition des substances protéiques qu'ils résorbent ensuite. ACHALME a très bien mis en évidence ces actions leucocytaires imputables surtout aux granulocytes (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles).

La digestion des albuminoïdes par les leucocytes a été également démontrée par H. RULOT, dans l'autolyse de la fibrine. On sait que la fibrine obtenue par battage du sang se dissout après un certain temps dans les solutions salines. Après avoir constaté dans ces solutions de fibrine la présence de peptones, DASTRE opposa à la théorie de la *dissolution simple* de la fibrine dans ces conditions, celle de la *dissolution par digestion*. Comme le ferment protéolytique déterminant cette autolyse n'était pas apporté de l'extérieur, il fallait donc le rechercher dans la fibrine elle-même. H. RULOT démontra que ce ferment était une *enzyme leucocytaire*. En effet, comme pendant le battage du sang des leucocytes sont emprisonnés dans les filaments de fibrine, la fibrine recueillie n'est pas de la fibrine pure, *mais de la fibrine avec des leucocytes*. L'auteur constate bientôt que la fibrine pure, exempte de leucocytes, est très peu soluble dans les solutions salines et qu'on n'observe pas dans ce cas la formation de peptones. Au contraire, la fibrine ordinaire, avec leucocytes, subit dans les solutions salines un début de digestion qui se traduit par l'apparition de peptones. On ne saurait mieux mettre en évidence cette aptitude des leucocytes à digérer les albuminoïdes.

Une troisième observation vient encore apporter une nouvelle preuve de cette action leucocytaire. Dans un travail récent intitulé : « La leucopédèse gastrique », G. MARCHAL a reconnu qu'il se produisait dans l'estomac après les repas une véritable diapédèse physiologique

(1) Voir N. Fiessinger — Les ferments des leucocytes. Masson & Cie, Ed., Paris, 1923.

ayant pour conséquence une action digestive et antitoxique dans la cavité gastrique : digestion des albuminoïdes grâce à un fervent protéolytique leucocytaire, début de digestion de l'amidon et enfin digestion des graisses par action *extra* et surtout *intra-cellulaire* d'une lipase cellulaire.

A notre connaissance, aucun fait analogue n'a encore été signalé en ce qui concerne l'action des leucocytes dans le lait ; mais il est probable que leur séjour dans ce liquide très favorable à leur vitalité doit se traduire par des phénomènes de cet ordre. Seul, leur rôle de phagocytes, essentiel il est vrai, a été reconnu dans la mamelle ; un rapide coup d'œil sur les deux grands processus fréquemment rencontrés au cours de la période de lactation, RÉTENTION et INFECTION, nous permettra de nous en rendre compte.

Il y a RÉTENTION lorsque le lait, une fois collecté après sa sécrétion dans les cavités mammaires, n'est pas évacué, soit par traite, soit par succion. Obstacle à une sécrétion nouvelle, le lait est alors un véritable indésirable que l'organisme va s'efforcer d'éliminer : le *lactose*, cristalloïde facilement dialysable, passe dans le sang par endosmose, remplacé molécule à molécule par le chlorure de sodium ; la lactosurie constatée dans tous les cas de rétention lactée est une preuve certaine de ce mode de résorption. Il ne saurait en être de même de la matière grasse ; les leucocytes sont nécessaires à sa disparition et c'est par *phagocytose des globules gras* que ce résultat est obtenu, car parallèlement à ce qui a été observé dans la cavité gastrique, on peut admettre que la matière grasse sera lentement digérée grâce à la lipase intracellulaire qu'ils sécrètent. On voit alors apparaître dans le lait, comme nous le préciserons plus loin, certaines variétés de leucocytes qui se gorgent progressivement de globules gras au point d'offrir dans le cas de rétention accentuée un aspect muriforme caractéristique.

Le professeur Ch. PORCHER, à qui nous devons la mise en lumière de tous ces phénomènes de rétention a de même constaté que la *caséine* de ces laits avait subi une importante modification qualitative ; si le lait écrémé ordinaire, bien que dépourvu de globules gras, présente encore une certaine opacité due au complexe colloïdal caséinate-phosphate de chaux, le lait de rétention écrémé est plus translucide encore, ce qu'on peut attribuer à une modification d'un des composants du complexe colloïdal : la caséine est susceptible d'être digérée par les leucocytes, par analogie avec ce que nous avons vu plus haut dans différents cas : action digestive du pus, autolyse de la fibrine et action leucocytaire dans la cavité gastrique.

Le colostrum, *reliquat de phagocytose* d'un lait antérieurement produit, ainsi que l'ont défini les professeurs Ch. PORCHER et L. PANISSET, offre ces particularités au suprême degré.

Dans les cas d'*infection mammaire*, la défense de l'organisme contre l'invasion microbienne est également confiée aux leucocytes ; l'examen

au microscope d'un frottis de culot de centrifugation d'un lait de mammites permettra d'observer très fréquemment l'inclusion de germes variés dans le protoplasma leucocytaire.

Aussi, pouvons-nous dire que *rétenition et infection déterminent le même acte défensif de la part de l'organisme: l'afflux leucocytaire suivi de la phagocytose du perturbateur de la sécrétion lactée*. Il est donc très rationnel que l'on ait considéré comme moyen de contrôle sanitaire du lait, d'une part, *l'évaluation de la quantité de ses leucocytes*, d'autre part, *l'établissement de sa formule leucocytaire*, qui permettrait de savoir s'il y a prédominance des éléments de pure filtration (1) (laits normaux) ou des éléments plus spécialement accourus pour la défense de l'organisme (rétenition et infection).

Des différentes méthodes de contrôle sanitaire du lait par l'examen quantitatif des éléments cellulaires

En 1897, le Docteur STOKES de Baltimore fut le premier à attirer l'attention sur la présence de cellules dans le lait. Reconnaisant parmi elles les globules blancs sanguins qu'on trouve en grande abondance dans les régions enflammées et dans les foyers purulents, il les considéra naturellement comme des « *cellules du pus* ». Dès lors l'observation de ces cellules fut interprétée comme un signe certain de mammites; mais on s'aperçut bientôt qu'un lait produit par une mamelle saine en contenait toujours en quantité plus ou moins grande, ce qui correspondait pensa-t-on, à un certain degré d'inflammation de la glande.

A l'idée qu'on pouvait ingérer de ces « *cellules du pus* », on aurait été amené par répugnance à considérer pratiquement presque tous les laits comme inacceptables. Devant cette impossibilité matérielle et la conviction bien acquise que leur ingestion était inoffensive, on résolut de fixer arbitrairement, pour un volume donné de lait, la quantité de cellules à tolérer, quantité au-delà de laquelle le lait serait considéré comme impropre à la consommation; « En d'autres termes, comme l'a dit avec une pointe d'ironie W. W. MILLER, la question se bornait à établir jusqu'à quel point le mal était acceptable. »

Dans ce but, plusieurs méthodes d'appréciation du contenu cellulaire furent proposées successivement; une nouvelle méthode naissant chaque fois de l'irrégularité des résultats obtenus avec la précédente.

a) **Méthode de Stokes.** — STOKES et WEGEFARTH tentent les premiers une numération des leucocytes du lait. La technique est la suivante :

Avec le sédiment de 10 centimètres cubes de lait, obtenu après centrifugation pendant 10 minutes, on fait sur une lame des frottais de 1 centimètre carré de

(1) Bien qu'il s'agisse ici non pas d'une véritable « *filtration* »; mais d'une diapédèse normale peu abondante, comme on en constate au niveau de toutes les assises épithéliales de l'économie, nous avons cependant adopté le terme: *filtration*, pour mieux marquer l'opposition avec les cas où un appel leucocytaire abondant est déclenché,

surface, qu'on colore pendant une minute au bleu de méthylène; on compte les cellules observées en 10 champs microscopiques avec l'objectif à immersion 1/12: le nombre moyen par champ est comparé au chiffre toléré. Le lait est considéré comme impropre à la consommation si le nombre moyen de cellules par champ dépasse 10.

STEWART apporte à cette méthode la modification suivante, de façon, pour plus d'exactitude, à utiliser la totalité du culot de centrifugation. Il n'emploie pour l'examen qu'un centimètre cube de lait, et le sédiment obtenu est étalé sur lame sur une surface de 1 centimètre carré. Même coloration au bleu de méthylène, même examen microscopique; le nombre limite acceptable est ici de 23 cellules par champ, ce qui correspondrait environ à 100.000 par centimètre cube.

Si ces méthodes de *numération cellulaire dans les frottis de culot de centrifugation* sont commodes dans la pratique, on verra plus loin que les résultats qu'elles permettent d'obtenir sont fortement critiquables; aussi la méthode suivante leur fut-elle vite préférée.

b) **Méthode de Doane et Buckley.** — Cette méthode, dite *volumétrique*, est imitée de celle qu'on emploie parfois pour la numération globulaire du sang. Voici en quoi elle consiste :

On centrifuge pendant 10 minutes 10 centimètres cubes de lait dans un tube gradué en dixièmes de centimètre cube; la crème est rejetée et le liquide surnageant est aspiré jusqu'à hauteur du dernier centimètre cube; on colore pendant 1 minute le liquide restant au fond du tube avec une solution à saturation alcoolique de bleu de méthylène en faisant un mélange homogène et on place une goutte de ce mélange dans la chambre de l'appareil à numération globulaire de Thoma-Zeiss; la numération des cellules est alors effectuée.

Le lait est déclaré impropre à la consommation si le nombre de cellules excède 500.000 par centimètre cube.

Par des lavages successifs du sédiment à l'eau distillée, suivis de nouvelles centrifugations, H. C. CAMPBELL, perfectionnant cette technique, obtient facilement un mélange dépourvu de graisse et susceptible de se prêter à des numérations cellulaires sans recourir à la coloration; ceci constitue une amélioration de la méthode de DOANE et BUCKLEY, dans laquelle la numération au microscope est parfois difficile, gênée qu'elle est trop souvent par des précipités de colorant et par des globules gras encore présents malgré la centrifugation.

c) **Méthode de Trommsdorff.** — Pensant que le culot de centrifugation représentait la totalité des leucocytes contenus dans le lait, TROMMSDORFF préconisa une méthode permettant de déterminer la *proportion de sédiment* du lait examiné. Pour cela, il utilise un tube spécial d'une contenance de 10 centimètres cubes, dont la partie inférieure effilée est graduée, ce qui permet de lire, après une centrifugation de 10 minutes, la proportion recherchée; les laits normaux ne donneraient pas plus de 1 centimètre cube de dépôt cellulaire par litre.

CRITIQUE DE CHACUNE DE CES MÉTHODES. — Lorsque STOKES

proposa sa méthode d'examen quantitatif des leucocytes dans les frottis de culot de centrifugation, il voyait en eux des cellules du pus —, c'était d'ailleurs l'idée de cette époque —, et leur présence lui apparaissait toujours comme la conséquence d'un état pathologique, plus ou moins grave il est vrai, de la mamelle ; aussi le nombre de leucocytes qu'il tolère nous semble-t-il beaucoup trop faible. Estimé de cette façon, le lait de 90 pour 100 des troupeaux serait déclaré inacceptable. Il y a là assurément une exagération due à une fâcheuse interprétation, sur laquelle nous reviendrons, de la présence des leucocytes dans le lait. De plus, la technique employée ne nous paraît pas à l'abri de toute critique. Comme l'auteur n'utilise pas la totalité du culot de centrifugation, les frottis ne sont pas la traduction fidèle du contenu cellulaire ; les différences de densité et de volume des cellules sont autant de facteurs qui les répartissent par couches dans le sédiment offrant une véritable stratification : les plus lourdes se déposent au fond et les plus légères à la surface ; aussi les frottis contiendront-ils en plus grande abondance telle ou telle catégorie de *cellules* (épithéliales ou leucocytaires) selon que la parcelle de sédiment, qui aura servi à leur préparation, aura été prélevée au fond, au milieu ou à la surface du culot de centrifugation. Comment dans ces conditions faire une numération *leucocytaire* exacte par champ ? Le travail de STOKES, s'il n'a pas abouti à une heureuse méthode d'examen en vue d'un contrôle sanitaire, a du moins eu le mérite d'attirer l'attention sur l'existence de cellules dans le lait et a soulevé la question de leur signification.

La modification de STEWART offre plus de garanties, la totalité du sédiment étant utilisée pour la numération. Mais cet examen quantitatif reste faussé par l'utilisation de la centrifugation ; nous verrons, en effet, plus loin, que *le culot ne correspond pas du tout à la totalité du contenu cellulaire*.

De même, la méthode de DOANE et BUCKLEY, malgré la modification apportée par CAMPBELL, ne peut donner de résultats satisfaisants : le nombre de leucocytes comptés dans l'appareil à numération globulaire subit également les caprices de la centrifugation ; en outre, de la grande difficulté à obtenir un mélange parfaitement homogène avec le liquide restant et le sédiment, naît une nouvelle cause d'erreur, erreur grossière encore en utilisant un facteur élevé de multiplication pour déterminer le nombre de cellules par centimètre cube.

Enfin, si la méthode de TROMMSDORFF permet dans la pratique de diagnostiquer souvent une mammite, il ne semble pas que ce soit parce que le culot décèle uniquement une quantité plus ou moins grande des seuls leucocytes, mais bien parce qu'il représente plus ou moins de *pus*, c'est-à-dire un mélange de débris cellulaires épithéliaux plus ou moins mortifiés, de microbes et de leucocytes vivants ou dégénérés, noyés dans une *masse albumineuse* qui donne au sédiment une consistance

pâteuse et un *volume plus grand* que s'il n'était constitué que par des leucocytes. En effet, si le culot de centrifugation ne déterminait qu'un pourcentage plus ou moins grand des seuls leucocytes, la méthode serait critiquable pour la même raison que les précédentes, à savoir *le peu de régularité de l'action de la force centrifuge sur le dépôt leucocytaire* ; aussi n'est-il pas exagéré de dire que la méthode de TROMMSDORFF permet à coup sûr le diagnostic des mammites déjà installées, lorsque le culot est nettement purulent, mais non pas le diagnostic d'une mammité tout à son début ou d'une mammité chronique évoluant vers la guérison, c'est-à-dire avant que le lait soit absolument purulent ou après qu'il ne l'est plus beaucoup. La méthode d'examen qualitatif, que nous proposerons, sera inapplicable, au contraire, dans la plupart des cas où la méthode de TROMMSDORFF donnera des résultats, parce que la différenciation des cellules colmatées dans une masse albumineuse ne sera pas possible ; mais elle permettra, par contre, des diagnostics de mammité alors que cette méthode d'examen quantitatif, basée sur une proportion de sédiment obtenu par centrifugation, risquerait d'être inefficace. A noter en outre que l'augmentation de volume du culot de centrifugation, due à la présence de coagulats d'albumine, est la règle chaque fois que l'examen portera sur du lait prélevé dans les 24 heures qui suivent le vêlage ; dans ces conditions, il importera de déclarer le lait impropre à la consommation, non parce qu'il provient d'un animal atteint de mammité, mais bien parce que c'est du colostrum.

En plus des causes d'erreurs relevées pour chacune de ces trois méthodes, nous avons fait entrevoir les deux critiques graves que nous leur adressons, à savoir : 1^o une interprétation regrettable de la présence dans le lait des leucocytes considérés par les premiers auteurs comme *cellules du pus*, 2^o une erreur matérielle dans la détermination quantitative des cellules due à *l'effet capricieux de la centrifugation*. Examinons successivement ces deux points :

a) **Leucocyte n'est pas obligatoirement synonyme de cellule du pus.** L'existence de globules blancs dans le lait doit être considérée comme un fait purement *physiologique* ; les leucocytes ne sont-ils pas normalement observés dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques de tous les tissus, et leur diapédèse dans le tissu conjonctif, de même que leur sortie à travers les diverses membranes de l'économie (muqueuses stomacale, intestinale, trachéale, épithélium glandulaire), ne sont-elles pas des phénomènes absolument physiologiques ?

Nous avons vu plus haut le rôle que leur attribue G. MARCHAL dans la cavité gastrique, siège d'une diapédèse physiologique au moment de la digestion ; les leucocytes affluent directement par traversée de la muqueuse stomacale et indirectement avec le suc gastrique, en dehors de tout état pathologique de l'estomac.

D'autre part, toutes les études histologiques de la mamelle en période de lactation ont montré l'abondance des globules blancs dans le tissu conjonctif entourant les acini mammaires ; connaissant leurs facultés migratrices grâce aux mouvements amiboïdes dont certains sont doués, comment considérer leur présence dans l'acinus comme anormale ?

Si on envisage les rapports intimes du système lymphatique de la mamelle avec les éléments glandulaires eux-mêmes, et si l'on songe enfin à l'énormité de l'apport sanguin qui traverse la glande, on ne saurait trouver surprenant et considérer comme pathologique l'existence dans le lait de nombreux leucocytes.

Si l'observation de leucocytes dans le lait n'indique pas qu'il y ait obligatoirement du pus, nous pensons également que l'abondance relative de cellules — *toutes considérées pendant longtemps comme des leucocytes* — ne trahit pas nécessairement un état pathologique de la mamelle. Lorsqu'il se produit à l'approche du tarissement une véritable desquamation épithéliale, le contenu *cellulaire* peut être très élevé sans pour cela qu'un état pathologique soit à invoquer ; d'autre part, un phénomène purement physiologique, la *rétenion*, dont beaucoup d'auteurs s'intéressant au lait ne semblent pas toujours suffisamment tenir compte, peut amener, en dehors de toute affection mammaire, une grande quantité de leucocytes dans les acini ; nous en avons expliqué déjà le mécanisme.

Pour toutes ces raisons, nous pensons pouvoir dire que *pas plus la seule présence de leucocytes que l'existence d'un contenu cellulaire élevé ne permettent de considérer a priori un lait comme impropre à la consommation, sous le prétexte qu'il serait purulent.*

Nous n'irons cependant pas jusqu'à prétendre, comme certains auteurs, que des laits à contenu cellulaire *extraordinairement* élevé soient normaux, parce qu'on n'y trouverait pas de streptocoques ou parce que leur ingestion ne causerait pas d'accidents. Robert S. BREED de Geneva N. Y. rapporte le cas d'un quartier de mamelle 8 jours après le vêlage, donnant un lait dont le contenu cellulaire fut évalué à 54.300.000 cellules par centimètre cube ! Ce lait était cependant d'aspect et de goût absolument normaux, et son ingestion n'eût pas de conséquences fâcheuses ; de plus, un examen bactériologique soigneux ne révéla aucune infection streptococcique. Si la *rétenion* qui se poursuit souvent jusqu'à la fin de la première semaine chez de bonnes laitières, permet d'expliquer dans une certaine mesure l'abondance de leucocytes constatée par BREED, il semble que l'infection, sa compagne trop assidue, ait ici, malgré l'absence de streptocoques, sa grosse part de responsabilité. Il est des germes très difficiles à mettre en évidence, qui ne modifient pas les caractères physiques du lait et qu'un examen très sérieux ne découvre pas toujours. Nous regrettons que, pour ce cas très particulier, l'auteur n'ait pas fait un examen leucocytaire différentiel, qui eût probablement donné d'intéressantes précisions.

b) La centrifugation, cause d'erreur dans les numérations leucocytaires.

En 1910, le Professeur PRESCOTT et Robert S. BREED montrent que dans l'écémage spontané, presque toutes les cellules du lait adhèrent aux globules de graisse, et sont emportées avec eux dans la couche de crème superficielle. Lors d'écémage par centrifugation, la séparation se faisant très brutalement, une proportion variable de ces cellules, la presque totalité, ou la moitié seulement, ou même parfois le quart, est entraînée dans le culot. Ces auteurs pensent que la quantité de cellules contenue dans le culot est influencée par la température à laquelle le lait a été porté, la vitesse de rotation de l'appareil centrifuge et d'autres facteurs insoupçonnés qui font qu'avec le même centrifugeur et dans des conditions identiques, les résultats obtenus ne sont pas uniformes. Comment dans ces conditions accorder quelque confiance aux méthodes d'examen quantitatif utilisant la centrifugation ? En effet, lorsque le nombre de leucocytes obtenu par les méthodes de STOKES ou de DOANE-BUCKLEY sera élevé, ou lorsque la proportion de sédiment obtenue avec la méthode de TROMMSDORFF sera grande, cela indiquera assurément la présence dans le lait d'un grand nombre de leucocytes, mais la réciproque peut n'être pas exacte. Lorsqu'on aura obtenu une faible proportion de sédiment avec la méthode de TROMMSDORFF ou un petit nombre de leucocytes au centimètre cube avec les deux autres méthodes, on ne saura si le faible contenu cellulaire constaté est réel ou s'il est dû à l'imperfection de l'action centrifuge sur les éléments cytologiques. Cette action variable de la force centrifuge sur le contenu cellulaire suffit à expliquer le peu de concordance des résultats obtenus avec un même échantillon de lait par les différentes méthodes. Le tableau suivant dû à H. C. CAMPBELL, est très suggestif à cet égard.

TABLEAU I

N° de l'échantillon	Nombre de leucocytes obtenu par les méthodes de			% de sédiment par la méthode TROMMSDORFF
	STOKES (par champ)	STEWART (par champ)	DOANE-BUCKLEY (par cm ³)	
1	8	3	61.000	0,03
2	1	1	19.000	0,02
3	1	1	19.000	0,02
5	1	5	8.000	0,01
10	1	7	3.000	0,01
16	1	1	14.500	0,01
17	1	1	16.000	0,01
18	2	1,5	14.000	0,02
19	4	4	81.000	0,02
20	4	3	20.000	0,02

(A suivre)