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

(Suite)

Seuls les résultats obtenus avec les échantillons 2 et 3. concordent. Par contre, lorsque la méthode de STOKES donne 1 leucocyte par champ, celle de STEWART en donne 1, 5 ou 7 et l'auteur trouve par la méthode de DOANE-BUCKLEY modifiée des nombres de leucocytes variant de 3.000 à 19.000 par centimètre cube ; quant au pourcentage de sédiment obtenu par la méthode de TROMMSDORFF, il varie du simple au double (0,01 à 0,02). N'apparaît-elle pas dès maintenant exagérée cette prétention de déclarer impropre à la consommation un lait dont le nombre de leucocytes, évalué de façon aussi variable, dépasse la limite arbitrairement fixée ? Comment n'admettre aucune marge entre le lait sain et le lait déclaré inconsommable, alors que la variabilité des résultats obtenus pour en décider en suppose une assez grande ?

TABLEAU II

N° de l'échantillon	Lait cru (leucocytes par c/cube)			Lait chauffé à 70° (leucocytes par c/cube)		
	1 ^{er} examen	2 ^e examen	Variation %	1 ^{er} examen	2 ^e examen	Variation %
1	41.000	102.000	59,9	548.000	592.000	7,4
2	74.000	100.000	26	500.000	532.000	6
3	50.000	62.000	19,3	256.000	264.000	3
4	70.000	64.000	8,5	1.600.000	1.700.000	5,8
5	120.000	106.000	11,6	312.000	308.000	1,2
6	96.000	108.000	11,1	272.000	284.000	4,1
7	60.000	32.000	44,6	120.000	118.000	1,6
8	162.000	161.000	0,6	222.000	216.000	2,2

En 1908, H. L. RUSSELL et Conrad HOFFMAN signalent l'augmentation apparente du nombre de leucocytes après chauffage du lait à examiner. Sous l'action de la chaleur, l'état physique du lait subirait une modification telle que les éléments cellulaires seraient entraînés presque en totalité dans le culot de centrifugation, leur adhérence aux globules gras étant en grande partie détruite. Dans ces conditions, l'action de la centrifugation est plus complète ; aussi les numérations effectuées subissent-elles des variations moins préjudiciables. Un simple coup d'œil sur le tableau qui suit, résumant des essais de H. C. CAMPBELL par la méthode de DOANE-BUCKLEY modifiée, montre que l'écart entre deux

numérations leucocytaires, effectuées avec un même échantillon de lait, est beaucoup plus petit lorsque le lait a été chauffé à 70° que lorsque l'auteur opère avec le lait cru. La température de 70° est considérée comme limite ; au delà, la numération est gênée par la coagulation de l'albumine et les leucocytes, plus ou moins désagrégés, ne peuvent pas être aussi facilement différenciés des autres éléments figurés.

Des conclusions très nettes peuvent être tirées de ces résultats : 1° *Si on chauffe préalablement le lait à 70°, le nombre des leucocytes par centimètre cube est beaucoup plus élevé qu'en opérant avec du lait cru*, d'où la nécessité de relever le chiffre de leucocytes par centimètre cube arbitrairement choisi comme limite à la comestibilité du lait ; 2° Les écarts entre deux numérations successives effectuées avec un même échantillon de lait cru sont en moyenne de 27,1 pour cent, alors que la variation n'est que de 4,2 pour cent en moyenne pour les numérations leucocytaires effectuées avec du lait chauffé à 70°. *Si cette cause d'erreur, qu'est la centrifugation, est évidemment réduite, elle n'est cependant pas supprimée.*

Méthode de Prescott et Breed. — Dans le but d'éviter la susdite cause d'erreur, PRESCOTT et BREED ont proposé en 1910 la méthode suivante de numération des corps cellulaires du lait :

On prélève dans l'échantillon de lait, après agitation, une petite goutte de lait de 0 centimètre cube 01 qu'on étale sur une surface de 1 centimètre carré sur lame de verre ; le frottis est séché, coloré et les cellules comptées au microscope.

Les résultats obtenus par cette méthode montrent que le nombre de cellules par centimètre cube est beaucoup plus grand qu'on le supposait à la suite des numérations effectuées avec les méthodes utilisant la centrifugation. Sur 122 vaches dont le lait fut examiné en suivant cette technique, 59 des laits (lait de mélange des 4 quartiers) contenaient moins de 500.000 cellules par centimètre cube, 36 en contenaient entre 500.000 et 1 million, et 27 en contenaient plus de 1 million par centimètre cube ; le lait de tous ces animaux était d'apparence normale et fut vendu et consommé.

De toutes les méthodes d'examen quantitatif des leucocytes, celle de PRESCOTT et BREED nous paraît la plus susceptible de donner des résultats concordants et réguliers. De même, celle de TROMMSDORFF, en chauffant le lait à 60° ou 70° avant de le soumettre à la centrifugation, nous semble la plus efficace pour déceler un état *nettement purulent* de la mamelle ; mais nous croyons exagéré de prétendre par leur pratique établir entre le lait consommable et celui qui ne l'est pas une limite précise basée sur le nombre ou la proportion de leucocytes.

Critique du principe même de l'appréciation d'un lait par la quantité de leucocytes qu'il contient. — Comment en effet

fixer un chiffre limite ? Ce chiffre doit être bien au-dessus de ceux susceptibles d'être obtenus dans des conditions purement physiologiques. Mais, étant donnée l'amplitude des variations du contenu leucocytaire à l'état physiologique, il nous semble dès lors bien difficile d'établir une espèce de plafond que seuls les états pathologiques pourraient crever. En effet, tous les auteurs sont d'accord sur les constatations suivantes :

1° *Le contenu cellulaire du lait varie beaucoup au cours de la traite.* Le lait du début contient peu de leucocytes, celui de la fin, au contraire, en contient beaucoup. L'explication en est simple : la plupart des leucocytes sont collés aux parois des acini qu'ils viennent de traverser et ne sont entraînés dans le liquide que lorsque le massage de la mamelle s'exerce à son maximum, c'est-à-dire lorsque la glande n'est plus à l'état de réplétion. Il est intéressant de noter l'augmentation parallèle du pourcentage de la matière grasse, la même cause déterminant le pécèlement des globules gras, surtout les plus gros, collés aux parois des plus petits canaux excréteurs.

2° *Les quatre quartiers de la glande, absolument indépendants les uns des autres, donnent des laits dont le contenu leucocytaire est parfois aussi variable que s'il s'agissait de laits provenant d'animaux différents.*

3° Le contenu cellulaire du lait d'un seul quartier présente des *variations quotidiennes considérables sans causes apparentes.*

Nous ajouterons à ces variations quantitatives réelles du contenu cellulaire ces variations *apparentes* également physiologiques :

a) Selon le rendement laitier de l'animal, une même quantité de leucocytes sera répartie dans plus ou moins de liquide ; d'où l'augmentation apparente du nombre de cellules aussitôt que le rendement laitier diminue, comme c'est le cas à la fin de la période de lactation ou lorsque l'animal est atteint de certaines affections aiguës.

b) A l'approche du tarissement, les traites sont en général de plus en plus espacées dans le vain espoir de les rendre plus abondantes ; la rétention détermine alors à côté de cette augmentation *apparente*, due à une sécrétion de plus en plus réduite, une augmentation *réelle* du contenu leucocytaire, car la phagocytose du lait séjournant un temps anormal dans la glande ne tarde pas à s'établir. A ce moment, le nombre de leucocytes peut être aussi important que s'il s'agissait d'un lait pathologique.

c) Un contenu cellulaire également maximum caractérise le colostrum, reliquat de phagocytose d'un lait antérieurement produit et qui subit une totale rétention.

Admettons qu'on ait pu établir, compte tenu des variations physiologiques qui viennent d'être signalées, un nombre limite exact permettant de différencier un lait normal d'un lait anormal. *Lorsque l'examen leucocytaire quantitatif aura permis de déceler un lait anormal, on*

ne saura dire, en l'absence de tout renseignement sur le troupeau producteur du lait examiné, *s'il s'agit d'un lait de rétention ou d'un lait pathologique*; et c'est parce qu'ils semblent n'avoir pas suffisamment tenu compte de ce phénomène très important mis en lumière pour la première fois par le Professeur Ch. PORCHER : *la rétention*, que les différents auteurs ont souvent des résultats, contradictoires en apparence, et ne s'accordent pas toujours sur les causes de l'afflux leucocytaire dans le lait.

A la fin de la période de lactation, sur 18 examens quantitatifs des leucocytes, S. BREED obtient dans quatre cas des nombres très élevés par centimètre cube, dans onze cas des nombres inférieurs à ceux de la période de plein rendement et dans trois cas, enfin, il y eut si peu de leucocytes qu'il fut très difficile d'en trouver. Sans présumer des variations physiologiques fantaisistes, en tout point comparables à celles du pourcentage de la matière grasse étudiées par le Professeur Ch. PORCHER, il y a tout lieu de penser que quelquefois des traites ont été poussées plus à fond que les autres, c'est-à-dire que, selon les cas, il y eût ou n'y eût pas rétention. D'ailleurs l'auteur, obtenant, en l'absence de toute infection, des nombres très élevés de leucocytes par centimètre cube, en arrive à dire qu'il est probable que *d'autres raisons que l'infection* causent le passage dans le lait d'une grande quantité de leucocytes. Parmi ces autres raisons nous pensons que *la rétention*, phénomène purement physiologique provoque, tout aussi bien que l'infection, un afflux leucocytaire anormal, et c'est pourquoi nous sommes fondés à considérer comme insuffisantes *toutes ces méthodes d'examen leucocytaire quantitatif, incapables de différencier ces deux états dominants du processus de la sécrétion lactée : l'INFECTION et la RÉTENTION*.

De plus, les laits provenant de mamelles infectées n'ayant pas toujours des contenus cellulaires anormalement élevés, combien de laits impropres à la consommation et même dangereux seraient reconnus sains ? RUSSELL et HOFFMAN auraient observé, en effet, dans certains cas de mammites, que le contenu cellulaire du lait était inférieur à la moyenne de ceux des laits sains ; d'autre part, SAVAGE et S. BREED s'accordent à reconnaître qu'il n'y a pas toujours une relation entre le nombre des leucocytes et celui des microbes, et même entre le nombre de leucocytes et l'existence d'agents pathogènes. *Voilà donc toute une catégorie de laits à contenu leucocytaire normal* —, quant à la quantité du moins, — *qu'aucune des méthodes d'examen déjà décrites ne saurait déceler*.

L'évaluation *quantitative* du contenu cellulaire ne paraît donc pas susceptible de servir *seule* de base à un contrôle sanitaire des laits, puisque même si on pouvait déterminer de façon précise la quantité de leucocytes d'un lait, on ne pourrait pas en toute sûreté le reconnaître bon ou mauvais. *Il importe davantage de savoir quelles cellules il contient, que de savoir combien il en contient*. Pour cela, la distinction s'impose non seulement entre leucocytes et cellules épithéliales, *mais encore entre les*

diverses catégories de leucocytes. Toutes ces cellules n'ont pas, au point de vue sanitaire, la même importance ; aussi ne faut-il pas les considérer en bloc.

L'absence d'un examen différentiel du contenu cellulaire a permis souvent des diagnostics erronés, VARRIER JONES cite à cet égard cet exemple frappant : En faisant des observations suivies sur un troupeau attentivement surveillé, certains auteurs virent soudain se former du « pus » dans le lait d'une vache qui d'un bout à l'autre de sa période de lactation avait donné un lait contenant très peu de leucocytes. « Cette formation de pus, disent-ils, indiqua la fin de la période de lactation : soixante-quinze pour cent des animaux du troupeau, *vaches saines en parfaite santé, donnèrent du pus* à l'approche du tarissement et une analyse chimique correspondante montra que la proportion de crème était de 0,5 à 1,5 pour cent au-dessus de la normale, malgré cette particularité individuelle. » L'inexactitude d'une telle interprétation apparaît nettement. Un examen différentiel élémentaire eût montré à ces auteurs qu'il ne s'agissait pas d'une débâcle leucocytaire, mais de la desquamation épithéliale glandulaire qui caractérise la fin de la sécrétion lactée et cette constatation eût modifié, heureusement leur diagnostic. Des erreurs de ce genre pourront toujours être commises chaque fois qu'on se contentera d'examiner un lait uniquement par la méthode de TROMMSDORFF, puisque le culot, à la formation duquel participent cellules épithéliales, leucocytes, impuretés même, ne saurait représenter *exclusivement* la quantité de leucocytes.

L'échec des méthodes précitées n'est donc pas dû seulement aux *irrégularités* de numération ou d'estimation *inhérentes aux diverses techniques employées*, mais encore à la *fragilité du principe même* qui les a fait naître : la détermination de la quantité de cellules et même de la quantité de leucocytes d'un lait ne saurait suffire à sa qualification. C'est pourquoi devant la carence des méthodes d'examen QUANTITATIF des leucocytes, l'idée d'un leucocyto-diagnostic basé sur l'examen QUALITATIF ou DIFFÉRENTIEL, *a priori* plus riche en promesses, donna ces derniers temps une nouvelle orientation aux investigations en la matière.

Essai de contrôle sanitaire du lait par l'examen qualitatif de ses éléments cellulaires.

Dans l'impossibilité de se faire une opinion décisive sur l'état sanitaire d'un lait à sa sortie de la mamelle, toutes les fois que la détermination de la *quantité* de cellules ne lui avait pas apporté une preuve certaine, l'hygiéniste devait fatalement demander à l'examen *qualitatif* ou différentiel de ces cellules les renseignements susceptibles d'entraîner sa conviction.

Il est en effet logique de penser qu'étant donné un état pathologique ou physiologique spécial de la mamelle, une cellule appropriée, signature

de cet état, doit prédominer ou seulement apparaître dans le contenu cellulaire; aussi la mise en évidence de cette cellule spéciale ou de sa prédominance apparaît-elle comme le but de cet ultime examen. Pour cela, une méthode de coloration différentielle des cellules s'impose.

Pénétré de ces idées, P. C. VARRIER JONES a le premier étudié les variations cytologiques du lait sous l'influence des différents états physiologiques ou pathologiques de la mamelle.

Dans la revue médicale anglaise *The Lancet*, n° 5272 du 13 septembre 1924, au moment où nous commençons nos recherches, cet auteur décrit les différentes cellules (leucocytes et cellules épithéliales) qu'il rencontra dans le lait, reconnu qu'il était possible, en étudiant la proportion de chacune d'elles, d'obtenir des renseignements précis sur l'état du quartier de la mamelle qui avait fourni le lait et détermina les facteurs physiologiques, pathologiques et mécaniques capables d'influencer le contenu cellulaire.

Dans cette très importante étude cytologique du lait, les résultats suivants sont à retenir.

1° Dans le LAIT NORMAL, les *lymphocytes* constitueraient la presque totalité du contenu cellulaire; leur diamètre varierait avec la race de l'animal. Les *polynucléaires neutrophiles*, que l'auteur semble qualifier d'éosinophiles à fines granulations, s'y trouveraient à raison de 1 par champ; les *mononucléaires* et les *éosinophiles à grosses granulations* y seraient assez rares.

2° Dans le COLOSTRUM, les *globules du colostrum* et les *polynucléaires* seraient en grande proportion et au contraire les lymphocytes peu nombreux; puis graduellement par disparition des premiers et augmentation du nombre de ces derniers, le lait retrouverait son aspect cytologique normal, à condition toutefois qu'il ne survienne pas de complication pathologique.

3° Dans le cas de *légère RÉTENTION*, c'est-à-dire lorsque l'intervalle entre deux traites est prolongé anormalement (16 à 18 heures), l'auteur constate que le contenu cellulaire est constitué surtout par des *polynucléaires* et des *globules rouges*. Personnellement, nous voyons dans ce cas particulier beaucoup plus une réplétion exagérée avec congestion qu'une véritable rétention.

4° A la FIN DE LA PÉRIODE DE LACTATION, le tarissement serait annoncé par une augmentation progressive du contenu cellulaire constitué surtout par des *cellules épithéliales* arrondies, à protoplasma plus ou moins vacuolé, coloré en rose par la méthode de JENNER et à noyau bleu pâle simple, bi- ou trilobé, les lobes non reliés entre eux par des ponts de chromatine.

Si le tarissement était la conséquence d'un état pathologique, les polynucléaires apparaîtraient en grand nombre et seraient même plus abondants que les cellules tissulaires annonciatrices ci-dessus décrites

5° Enfin, dans les cas PATHOLOGIQUES : abcès de la glande ou mammites proprement dites, les *polynucléaires* constitueraient, presque à eux seuls, tout le contenu cellulaire.

* * *

RECHERCHES PERSONNELLES

Guidé par ces travaux qui venaient d'ouvrir le chemin à parcourir, nous avons pensé qu'il y avait quelque intérêt, par une méthode analogue et pour la race normande, une des plus répandues en France, à obtenir au point de vue leucocytaire les précisions indispensables que nécessite un contrôle sanitaire du lait à la production.

Refusant aux cellules épithéliales toute signification sanitaire, *seuls les leucocytes* ont retenu notre attention.

Dans ce travail, nous avons voulu :

1° Rechercher s'il existait des rapports leucocytaires entre le sang et le lait chez un même animal ;

2° Etablir si possible la formule leucocytaire du lait normal ;

3° Etudier les variations leucocytaires qualitatives aux différents états physiologiques depuis le vêlage jusqu'au tarissement, au cours de la traite et dans les cas de rétention ;

4° Rechercher enfin s'il était possible, par le seul examen de la formule leucocytaire, de poser le diagnostic de mammite et en particulier de mammite streptococcique.

Parallèlement à nos examens leucocytaires, nous avons, chaque fois que cela nous fût possible et par mesure de contrôle, déterminé le degré de catalase — ce qui nous a permis d'intéressantes constatations —, noté la quantité et l'aspect du culot de centrifugation, ses aptitudes à la confection de frottis et enfin nous avons tenu compte des germes nombreux rencontrés dans les champs microscopiques, à condition toutefois qu'ils fussent inclus dans le protoplasma des leucocytes, c'est-à-dire phagocytés, afin d'avoir toute chance de n'accorder aucun intérêt aux souillures microbiennes extérieures difficilement évitées.

1° Technique

A. **Prélèvement.** — Beaucoup d'auteurs s'accordent à reconnaître que les quartiers d'une même mamelle donnent *quatre laits différents* tant au point de vue de leurs constituants essentiels que de leur acidité, de leur degré de catalase, etc. ; d'autre part, nous savons que des constatations analogues ont été faites concernant l'abondance du contenu cellulaire ; enfin nous verrons plus loin que le contenu leucocytaire semble qualitativement en étroit rapport avec l'état physiologique et surtout avec l'état microbien du quartier envisagé. Pour toutes ces raisons, nous avons jugé indispensable, dans le but d'obtenir des résultats

plus nets et plus précis, de faire porter nos recherches sur les laits de chaque quartier prélevés séparément.

Pour ce faire, la mamelle est préalablement lavée à l'eau tiède savonneuse, puis séchée; le lait des premiers jets de la traite, trop microbien, est laissé de côté. Les échantillons de laits sont recueillis dans des tubes à essai ou dans des flacons très propres, rincés à l'eau distillée et séchés; de préférence des tubes à essai stérilisés sont employés. Les prélèvements sont effectués au début, au milieu ou à la fin de la traite, selon le but de l'examen. Les échantillons de lait sont utilisés dans un bref délai pour que l'intégrité morphologique des leucocytes subsiste et pour éviter la séparation spontanée de la crème, car dans ce cas beaucoup de leucocytes adhérant aux globules gras sont entraînés avec eux et échappent ainsi ultérieurement à l'examen des frottis directs de lait, si la matière grasse est préalablement rejetée, et à celui des frottis de culot de centrifugation.

Pour les *frottis directs*, une petite goutte de lait est prélevée à la pipette dès la fin de la traite et après vive agitation du liquide. Dans ces conditions, la rareté des leucocytes dans les frottis rend la numération très longue. A cause de la plus grande quantité de leucocytes qu'il contient, il est indiqué de préférer, pour la préparation des frottis directs, le lait de la fin de la traite.

Pour obtenir la richesse leucocytaire favorable, nous recommandons pour la confection des frottis le *culot de centrifugation du lait de la fin de la traite*. Nous nous hâtons de dire que nous n'avons adopté cette pratique qu'après nous être rendu compte qu'il n'y avait pas qualitativement de différences sensibles dans le contenu leucocytaire entre les échantillons prélevés au début, au milieu ou à la fin de la traite, et que, sauf pour le colostrum, les formules leucocytaires obtenues après examen de frottis directs sont très peu différentes de celles résultant de l'examen de frottis de culot de centrifugation; mais, pour cela, il est indispensable de respecter dans tous leurs détails les points essentiels de la technique qui suit.

B. Centrifugation. — Le lait fraîchement trait est versé, après agitation, dans les tubes de l'appareil centrifuge où il est porté à une température de 45 à 50° C. Ce chauffage est indispensable pour supprimer toute adhérence des leucocytes aux globules gras et obtenir la précipitation de la presque totalité des cellules dans le culot de centrifugation; la couche de crème superficielle ne contient plus alors qu'une quantité négligeable d'éléments figurés ne pouvant influencer sur la sincérité des résultats. La température de 50° ne doit pas être dépassée; au-dessus, si les leucocytes sont encore plus abondants dans les culots de centrifugation, ils sont par contre plus ou moins altérés et cet état est un obstacle à leur coloration et à leur intégrité morphologique; toute différenciation devient alors difficile, sinon impossible.

Rapidement refroidis après ce chauffage, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à la vitesse de 3.500 tours à la minute, puis retournés de façon à rejeter la crème et la presque totalité du liquide surnageant ; quelques gouttes de ce liquide (1/4 de centimètre cube environ) sont conservées pour délayer le culot afin d'obtenir une *suspension parfaitement homogène* du contenu cellulaire ; s'il n'en était pas ainsi, la matière à examiner serait trop épaisse pour se prêter à la confection de frottis et la disposition des leucocytes, trop serrés et superposés, rendrait toute numération impossible. De plus, comme les différentes cellules se déposent par couches au fond du tube selon leur volume et leur poids, les frottis offriraient en proportion très exagérée telle ou telle catégorie de cellules suivant que la matière qui aurait servi à leur confection aurait été prélevée en surface, au milieu ou à la partie inférieure du culot de centrifugation.

C. Confection des frottis. — Il est difficile d'obtenir de bons frottis. La parfaite netteté des leucocytes, qui est la règle dans les frottis de sang effectués par une personne entraînée, n'est pas toujours obtenue dans ceux de lait. La viscosité de ce liquide, et surtout celle du culot de centrifugation, est un sérieux obstacle à cette netteté. La viscosité maxima des laits de mammites nettement purulents et du colostrum rend même impossible l'usage de cette méthode ; mais dans de telles circonstances, il serait superflu d'y recourir, puisque les moyens ordinaires de diagnostic donneraient toute satisfaction. Cependant, en suivant avec exactitude dans tous ses détails la technique que nous indiquons, on peut réaliser le plus souvent des frottis satisfaisants.

Nous avons adopté pour la préparation de nos frottis la technique décrite par LANGERON dans son précis de microscopie :

La gouttelette du liquide à examiner (lait ou dilution de culot de centrifugation) est déposée à 1 centimètre de l'extrémité de la lame ; une lamelle inclinée à 45° est placée au contact de la lame au point où se trouve la gouttelette, tangentielllement à celle-ci du côté de la surface d'étalement ; on attend que la goutte ait fusé par capillarité tout le long de la lamelle et on pousse la lamelle vers l'autre extrémité de la lame ; les éléments cytologiques sont entraînés par capillarité et s'étaient *sans écrasement* sur la lame. La dessiccation immédiate du frottis par agitation rapide à l'air est indispensable à la bonne conservation de la forme des cellules ; *ne jamais chauffer* pour dessécher la préparation. Pour être parfaitement lisible, un frottis ne doit présenter qu'une seule couche de cellules et l'étalement *total* de la goutte doit être obtenue, sinon la lamelle entraîne avec l'excès la plupart des gros éléments cellulaires.

D. Dégraissage. — Le lait est un liquide gras. Cet état est nuisible à une coloration délicate de ses éléments cellulaires ; aussi un dégraissage préalable s'impose-t-il. Le chloroforme, l'éther, l'acétone ont été tour à tour recommandés ; ces différents solvants des graisses conviennent si le dégraissage est suivi d'une coloration brutale comme celle au bleu

de méthylène par exemple ; mais, pour la coloration que nous avons adoptée, ces différents solvants ne nous ont pas favorisé l'obtention de préparations avantageuses. Après de nombreux tâtonnements, le mode de dégraissage suivant nous a semblé préférable :

Après dessiccation des frottis, les lames sont placées pendant quelques heures dans des tubes Borrel, contenant le mélange :

éther, une partie,
alcool absolu, deux parties.

Elles en sont retirées pour être colorées.

E. Coloration. — La méthode panoptique de Pappenheim est la méthode de choix pour colorer les leucocytes ; c'est elle que nous avons utilisée en suivant les conseils de LANGERON.

Ce procédé est basé sur l'emploi successif du mélange de May-Grünwald (bleu de méthylène-éosine) et de celui de Giemsa ; le premier colore surtout les éléments acidophiles et les granulations neutrophiles des polynucléaires, tandis que le second colore les noyaux et les parties azurophiles ; séparément chacune de ces deux méthodes demeure insuffisante.

Le premier temps de la technique habituelle qui consiste en une fixation d'une durée de 3 minutes sous boîte de Petri bien sèche avec 10 gouttes du liquide de May-Grünwald, peut être écourté, car le mélange qui a servi au dégraissage du frottis, était en même temps fixateur. On ne fera donc que déposer le colorant sur la lame et on la recouvrira seulement le temps nécessaire à la préparation d'une pipette contenant de l'eau distillée.

La coloration proprement dite a lieu en deux temps :

1^o Découvrir le frottis, verser à sa surface 10 gouttes d'eau distillée et mélanger avec le May-Grünwald déjà employé ; laisser agir deux minutes.

2^o Rejeter le colorant utilisé et, sans laver, verser sur la lame du Giemsa dilué dans la proportion de 3 gouttes pour 2 centimètres cubes d'eau distillée. Laisser agir 15 à 20 minutes. Laver enfin au robinet sous un jet d'eau assez fort ; le lavage doit être violent pour entraîner les précipités et rapide pour ne pas nuire à la coloration (1).

F. Séchage. — Aussitôt ce lavage terminé, se hâter de sécher le frottis par compression dans un cahier de papier Joseph ; appuyer comme lorsqu'on sèche une page d'écriture avec un buvard, mais éviter que le papier glisse sur le frottis. *Ne jamais chauffer* pour obtenir la dessiccation.

¹ *Préparation du Giemsa dilué.* — La dilution de Giemsa indiquée : 3 gouttes pour 2 centimètres cubes, est maxima. Elle doit s'effectuer avec de l'eau distillée non acide ou même très légèrement alcaline. On s'en assure en additionnant à une petite quantité d'eau distillée à employer, versée dans un verre, une goutte de solution de rouge neutre à pour 1.000. Si le liquide conserve une teinte rosée, ajouter une ou deux gouttes d'une solution de carbonate de lithine à 1 pour 100 jusqu'à ce qu'une légère coloration jaune apparaisse ; l'eau peut alors être utilisée pour la dilution de Giemsa.

Le matériel employé pour faire la dilution doit être d'une propreté absolue ; de plus il ne faut pas agiter le mélange, dont la préparation doit être extemporanée. Toutes ces précautions doivent être prises pour éviter la précipitation de l'éosinate d'azur avant coloration.

G. Examen microscopique. — L'examen microscopique aura lieu à l'objectif à immersion à 1/12 dans une goutte d'huile de cèdre. Pour ne pas limiter la numération dans les pointes de frottis, ce qui donnerait des proportions trop grandes des plus gros éléments qui sont entraînés là, il est indispensable de parcourir le frottis parallèlement à sa longueur ; si l'on ne dispose pas d'une platine micrométrique (qui serait préférable) on peut, pour ne pas s'exposer à compter deux fois les mêmes leucocytes, rayer préalablement le frottis de lignes parallèles longitudinales très rapprochées avec une pointe d'épingle ; on effectue ensuite la numération dans l'espace entre deux sillons. Pour la sincérité des résultats, la proportion moyenne à retenir devra porter sur 2.000 leucocytes au moins, comptés à raison de 500 par frottis.

2° Description sommaire des principaux leucocytes

On rencontre dans le lait toutes les figures leucocytaires déjà décrites dans le sang ; nous croyons cependant utile de rappeler ici très brièvement les caractéristiques morphologiques de celles dont nous aurons à établir la proportion au cours de ce travail.

Les principaux leucocytes du lait peuvent se ranger en deux grands groupes : celui des *monocytes* ou éléments hyalins et celui des *granulocytes* ou éléments granuleux.

I. Monocytes. — Parmi les monocytes, les *lymphocytes* et les *mononucléaires*, gros et petits, retiendront particulièrement notre attention.

A. Les LYMPHOCYTES de 3 à 8 μ de diamètre, 6 μ le plus souvent, arrondis, constitués par une mince écorce d'hyaloplasma bleu clair et un volumineux noyau bleu foncé riche en chromatine, s'identifient en tous points à ceux qu'on a l'habitude de décrire dans les frottis de sang.

B. Nous classerons les MONONUCLÉAIRES en 3 catégories :

Les *mononucléaires ordinaires* ou *petits mononucléaires* ;

Les *gros mononucléaires* ;

Les *gros mononucléaires chargés de graisse*.

1° Les mononucléaires ordinaires de 9 à 12 μ de diamètre apparaissent avec un noyau violet foncé arrondi, ovale ou angulaire atteignant 8 à 9 μ dans son plus grand axe, situé le plus souvent au centre d'une protoplasma uniformément bleu très clair presque incolore.

2° Les gros mononucléaires, gros leucocytes de 10 à 15 μ de diamètre ont un noyau réniforme, excentrique, se détachant nettement en violet très foncé dans un protoplasma aréolé, lui-même assez fortement coloré en bleu.

3° Gros mononucléaires chargés de graisse : Les gros mononucléaires précédemment décrits incorporent parfois de la graisse et peuvent en être bourrés au point de présenter un aspect mûriforme d'un diamètre de 15 à 20 μ . Les globules gras apparaissent comme des cercles incolores

de diamètre variable, serrés les uns contre les autres dans le protoplasma ; par la pression qu'ils exercent sur lui, le noyau est plus ou moins déformé, déchiqueté et même partiellement détruit. C'est à ce stade ultime d'envahissement qu'on a donné le nom de *corpuscules de Donné* ou de *globules du colostrum*.

II. Granulocytes. — Parmi les granulocytes, les POLYNUCLÉAIRES NEUTROPHILES et les ÉOSINOPHILES retiendront seuls notre attention ; les *basophiles* et les *matzellen*, toujours extrêmement rares dans le lait ne nous semblent pas pour cette raison avoir d'intérêt au point de vue qui nous occupe.

A. Polynucléaires neutrophiles. — Ainsi dénommés depuis EHRlich, les polynucléaires neutrophiles, cellules arrondies de 10 à 12 μ de diamètre, ont un protoplasma incolore criblé de très fines granulations rose violacé relativement peu serrées ; ces leucocytes sont aisément reconnaissables à leur noyau très polymorphe ; il apparaît tantôt sous la forme de cordon replié en S, en anneau ou en croissant ; tantôt, et c'est le plus souvent, il est divisé en boulettes d'un violet foncé, accolées en amas ou plus ou moins séparées et reliées ou non entre elles par des filaments de chromatine.

Le nombre de fragments du noyau paraît croître avec le degré de maturation, c'est-à-dire avec l'âge de l'élément. ARNETH, comparant à ce point de vue, chez l'homme, les polynucléaires neutrophiles à l'état normal et dans la tuberculose, établit la *figure neutrophile* du sang en déterminant le pourcentage de ces granulocytes classés suivant le nombre des noyaux. Nous pensons qu'il y a dans cette pratique un moyen de préciser le diagnostic de certaines affections mammaires.

B. Eosinophiles. — Le mode de coloration employé nous permettra de différencier les éosinophiles, *mononucléaires* ou *polynucléaires*, dont nous établirons chaque fois la proportion. Ces leucocytes de 9 à 13 μ de diamètre attirent nettement l'attention par leur protoplasma bourré de grosses granulations éosinophiles (rouge orangé) ; selon qu'ils sont mono- ou polynucléaires, le noyau, toujours d'un violet très foncé, est ovale, réniforme, en bissac, souvent dédoublé en deux parties symétriques nettement séparées ou se présente sous les formes variées qu'offre celui des neutrophiles. Les éosinophiles nous ont semblé d'une grande fragilité ; souvent ils apparaissent éclatés dans les frottis, les granulations éosinophiles formant une traînée en arrière de la cellule.

Tels sont, sommairement décrits, les divers leucocytes dont nous aurons à établir la proportion dans les différents états physiologiques et pathologiques de la mamelle.

Nous croyons cependant prématuré de conclure à une relation de cause à effet entre ces différents états et la proportion des principales catégories de leucocytes ci-dessus décrites, avant d'avoir examiné quels

sont les rapports leucocytaires du sang et du lait. Si l'état leucocytaire du lait n'est qualitativement que le reflet de celui du sang, il n'y a pas lieu en effet d'attribuer les variations qualitatives qu'il présente à un état physiologique ou pathologique de la mamelle. C'est pourquoi nous avons jugé indispensable de rechercher si une telle dépendance existe et jusqu'à quel point.

3° Y a-t-il des rapports leucocytaires entre le sang et le lait?

Ces recherches ont été effectuées sur trois animaux faisant partie du troupeau de la Station d'expérimentation sur l'alimentation du bétail, dirigée par M. ALQUIER que nous tenons à remercier ici pour l'amabilité avec laquelle il mit son étable à notre entière disposition. Ces trois animaux étaient des vaches de race normande, en pleine période de lactation, en excellent état d'entretien, indemnes de tuberculose et sans autres maladies apparentes, à mamelle cliniquement saine et dont le lait semblait normal quant à ses caractères physiques; ajoutons que dans cette étable aux conditions hygiéniques parfaites, la traite mécanique était pratiquée avec la plus grande propreté après lavage du pis.

Les frottis de sang ont été effectués avec une goutte de sang prélevée à l'oreille pendant la traite du matin et les prélèvements de lait ont eu lieu après cette traite mécanique; c'est dire que les derniers centimètres cubes de lait, parce qu'ordinairement plus riches en leucocytes, ont été utilisés pour cette étude.

De l'examen comparatif des formules leucocytaires obtenues après lecture des frottis de sang et de lait, les constatations suivantes peuvent être faites: les formules leucocytaires sanguines des trois animaux sont très comparables, exception faite cependant pour les éosinophiles, dont le pourcentage serait lié à l'état parasitaire de l'organisme; le tableau III montre cette parenté.

TABLEAU III

Sang

Catégories de leucocytes	Vache N° 9	Vache N° 13	Vache N° 15
Lymphocytes	12 %	20 %	19 %
Gros mononucléaires.....	1 %	1 %	1 %
Polynucléaires neutrophiles	43 %	34 %	44 %
Eosinophiles	17 %	17 %	6 %
Petits mononucléaires	27 %	28 %	30 %

Nous croyons pouvoir avancer, sans pour cela faire une hypothèse osée, que s'il existe des rapports étroits entre les leucocytes du sang et ceux du lait, nous devons constater pour les trois animaux dont les formules leucocytaires sanguines sont semblables, des formules leuco-

cytaires lactées très voisines. Disons tout de suite qu'une telle similitude n'existe pas et, qui est plus, que les dissemblances sont aussi grandes pour les laits issus des différents quartiers d'une même mamelle que pour ceux d'animaux différents, le tableau IV le prouve.

TABLEAU IV

Lait

Catégories de leucocytes	VACHE N° 9				VACHE N° 13				VACHE N° 15			
	AG	AD	PG	PD	AG	AD	PG	PD	AG	AD	PG	PD
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Lymphocytes	13	25	2	5	7	28	10	13	5	7	12	21
Gros mono-nucléaires .	3	1	1	1	1	6	5	2	15	3	0,2	1
Petits mono-nucléaires	26	25	2,5	7	5	25	7	62,5	9	7,5	2	3
Mononucléaires chargés de graisse.	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0,2	0
Polynucléaires neutrophiles	56	45	94	86	86	34	76,5	22	70	81,5	85,6	74,5
Esinophiles .	2	4	0,5	1	1	7	0,5	0,5	0	0	0	0,5

Puisqu'à des formules leucocytaires sanguines semblables ne correspondent pas des formules leucocytaires lactées semblables, c'est que celles-ci ne dépendent pas *uniquement* de celles-là.

Des relations existent cependant : pour les vaches N° 9 et 13 dont le sang contient 17 % d'éosinophiles, ces éléments se retrouvent dans le lait à raison de 0,5 à 7 % ; tandis que pour la vache N° 15 dont le sang ne contient que 6 % d'éosinophiles, ces granulocytes ne se retrouvent pas ou très peu dans le lait (0 à 0,5 %). *Le taux des éosinophiles dans le lait semble donc sous l'étroite dépendance de celui des mêmes éléments dans le sang ; leur présence dans le lait apparaît dès lors surtout comme le résultat d'une simple filtration.*

Remarquons, en outre, que seules les formules leucocytaires du lait des quartiers antérieur-gauche et antérieur-droit de la vache N° 9 et antérieur-droit de la vache N° 13 offrent de grandes ressemblances non seulement entre elles, mais encore avec les formules leucocytaires sanguines des mêmes animaux. Si nous établissons le pourcentage moyen des différentes catégories de leucocytes dans le sang des 3 animaux

et celui des mêmes catégories de leucocytes dans le lait des trois quartiers précités, la grande parenté des formules leucocytaires sanguines et lactées ainsi obtenues apparaît très nettement dans le tableau qui suit.

TABLEAU V

Catégories de leucocytes	Pourcentage moyen des différentes catégories de leucocytes dans le sang des trois animaux (I)	Pourcentage moyen des différentes catégories de leucocytes dans le lait des trois quartiers offrant des ressemblances leucocytaires (II)	Pourcentage moyen des différentes catégories de leucocytes d'un lait normal (III)
Lymphocytes	17	22	27
Gros mononucléaires	1	3,33	4
Petits mononucléaires	28,33	25,33	20
Mononucléaires chargés de graisse	0	0	0
Polynucléaires neutrophiles.	40,33	45	47
Eosinophiles	13,33	4,33	2

Sur ce tableau, nous avons mis, pour le rendre plus suggestif, le pourcentage moyen des différents leucocytes d'un lait normal que nous avons déterminé plus loin au cours de ce travail. Cette formule leucocytaire (colonne III) est en tous points superposable à celle de la colonne qui précède (II); aussi pouvons-nous considérer comme normaux les laits des quartiers antérieur-gauche et antérieur-droit de l'animal N° 9 et du quartier antérieur-droit de l'animal N° 13 et conclure que, POUR LES LAITS NORMAUX, la formule leucocytaire est très voisine de celle du sang de l'animal; les leucocytes du lait ne sont donc, dans ce cas, que le reflet de ceux du sang, dont ils se sont échappés par filtration. Il est très logique qu'il en soit ainsi, aucun appel leucocytaire ne se justifiant dans la mamelle.

Notons toutefois que le pourcentage des lymphocytes est sensiblement plus élevé dans le lait que dans le sang; ce qui peut s'expliquer par la double origine de cette catégorie de leucocytes très abondants dans la lymphe; les lymphocytes du lait seraient donc à la fois des éléments de filtration du sang et de la lymphe.

Pour le lait des autres quartiers, il est impossible d'établir au point de vue leucocytaire le moindre rapprochement avec le sang; aussi sommes-nous en droit de dire que l'état leucocytaire du lait ne dépend pas uniquement de celui du sang de l'animal, mais aussi d'un facteur spécial à chaque quartier. Puisque tous les quartiers d'une même mamelle sont physiologiquement au même état (toute rétention partielle mise à part), seul l'« état microbien » du quartier peut être ce facteur capable d'influencer l'état leucocytaire du lait qu'il produit. Lui seul peut

expliquer les différences profondes constatées entre les formules leucocytaires des laits issus d'une même mamelle ; les microbes, selon leur nature et leur virulence, déterminent *un appel leucocytaire d'intensité et de qualité* variables dans le quartier infecté. Il n'y a plus uniquement *filtration* de leucocytes comme dans les quartiers sains, mais une véritable mobilisation des différentes classes actives des défenseurs de l'organisme ; la connaissance des mobilisés permettra d'avoir la certitude de l'attaque, c'est-à-dire l'existence d'une infection. *L'examen qualitatif des leucocytes, quartier par quartier, peut donc parfaitement servir de base à un contrôle sanitaire du lait.* (à suivre).

QUELQUES CONSIDÉRATIONS DE PHYSIOLOGIE SUR LE MÉTABOLISME DE LA GRAISSE DANS L'ORGANISME. A PROPOS DE LA LIPO-DIÉRÈSE PULMONAIRE, OU UN ESSAI DE PHYSIO-ZOOTECNIE.

par J. BLIER,

Docteur-Vétérinaire.

Dans un livre récent (1), qui a sensiblement le même titre que cette étude, j'ai été conduit à développer quelques considérations relatives au métabolisme des corps gras chez les mammifères grâce au rapprochement des deux faits suivants :

- 1° La découverte par ROGER et BINET de la lipo-diérèse pulmonaire ;
- 2° L'étonnante richesse en crème du lait des cétacés (elle atteint parfois 50 %).

La découverte de la lipo-diérèse pulmonaire contribue à éclairer le métabolisme des corps gras chez les mammifères non seulement dans le tissu du poumon, mais même dans leur organisme total.

Si ces deux chercheurs ont mis en évidence une diastase capable d'assurer dans tous les parenchymes, et surtout dans l'appareil respiratoire, la destruction des graisses, il est logique, à la lumière de leur travail, de tenter l'interprétation d'autres phénomènes jusqu'ici obscure.

Dans le cas des mammifères marins, on peut se demander si cette diastase destructrice de leurs graisses ne va pas être perturbée dans son action par des agents d'origine marine contenus dans l'air inspiré et dont certains peuvent exercer une action anti-catalysante. Ainsi s'expliquaient peut-être, à mon avis, la tendance bien connue des cétacés à l'obésité, et la non moins curieuse richesse de leur lait en graisse.

Jusqu'ici on n'a jamais pu encore pénétrer le secret qui préside à l'inégalité de la richesse des laits en matière grasse. On est d'accord

(1) Ce livre a exactement pour titre : UN NOUVEAU FACTEUR PLAUSIBLE D'OBÉSITÉ. *A propos de la lipo-diérèse pulmonaire ou un Essai de Physio-zootecnie* par Jules BLIER. L'ouvrage figure dans la *Collection des Travaux de Pathologie comparée* édités par la *Revue de Pathologie comparée et d'Hygiène générale*. En vente : 8, rue des Acacias, Paris (17^e). Prix : 15 francs.