

sibilités, soit qu'on se place au point de vue de l'hygiène, soit surtout que cette recherche ait des fins industrielles. Il faut, selon nous, pouvoir effectuer des recherches sur tous les volumes de lait compris entre 1 et 50 cm³, exceptionnellement plus. Or, si la recherche est classique et aisée sur 1 cm³, il n'en est pas de même sur de plus grands volumes.

C'est précisément cette question de la recherche du *coli* sur de grands volumes de lait que nous aurons surtout en vue dans l'étude qui va suivre et dont nous croyons avoir suffisamment démontré l'intérêt.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] Th. VASSILEFF. Recherche et numération du coli-bacille dans le lait par la méthode du rouge neutre. *Le Lait*, avril 1932, 322.
- [2] AYERS et JOHNSON. *Journal of Agricultural Research*, III (15 février 1915), 401-410.
- [3] TANNER et DUBOIS GRANVILLE. *Journal of Dairy Science*, VIII (janvier 1925), 47.
- [4] JOHNSON. *The Milk dealer*, 1926, 106.
- [5] TANNER et WINDSOR. *Journal of Dairy Science*, mai 1929, 202.
- [6] DOPTER et SACQUÉPÉE. *Précis de bactériologie*, 1321. (Baillièrè, 1927.)
- [7] DIÉNERT et ETRILLARD. Sur la recherche du *B. Coli* dans les eaux. *Annales de l'Institut Pasteur*, mars 1931, 277.

(A suivre.)

L'INFECTION LATENTE DE LA MAMELLE ET SES RÉVEILS. LES MOYENS DE LA DÉPISTER

par CH. PORCHER

Docteur ès Sciences physiques.

(Suite.)

A QUOI SONT DUS LES FLOCONS DANS L'ÉPREUVE A L'ALIZAROL SUR DES LAITS ALCALINS ? — Si l'on alcalinise un lait normal avec de la soude ou de l'ammoniaque pour le plonger si peu que ce soit par son pH dans la zone des laits *alcalins*, l'addition d'alcool à 70° ne produit pas de précipité. Or, l'emploi du réactif de Morres détermine sur les laits de rétention et sur les laits malades, laits *alcalins* comme on le sait, des précipités. Rapidement, le mélange se divise en deux couches de teintes différentes : la couche inférieure faite de flocons plus ou moins grossiers et la couche supérieure, d'un liquide plus ou moins limpide, mais dont la teinte semble indiquer toujours un pH plus marqué que celle du précipité qu'il surmonte.

A pH égal, alcalin ou virant vers l'alcalinité, un lait normal alcalinisé et un lait malade, dit alcalin, réagissent donc différemment vis-à-vis du réactif de Morres en ne considérant la réaction que du côté du précipité.

L'attaque protéolytique de la caséine dans la mamelle malade. — Il y a lieu de chercher la raison de cette différence. Sans pouvoir la donner d'une façon définitive — car bien des travaux sont à faire sur ce point —, nous nous permettons d'attirer l'attention sur la nature des processus qui, dans certaines mamelles infectées, peuvent jouer en altérant la caséine. Les phagocytes, notamment les polynucléaires, et certaines espèces de la flore des mammites sécrètent des ferments protéolytiques, tantôt du type présure, tantôt du type pepsine, lesquels transforment partiellement, sinon en totalité, la caséine en paracaséine. C. GORINI [44] est le premier qui ait appelé l'attention sur la fonction présurigène d'un certain nombre de ferments par ailleurs acidogènes.

On a beaucoup discuté sur le pouvoir protéolytique des streptocoques. Il est admis par les uns, discuté par les autres. Avec l'aide du temps — et c'est ce qui se passe dans l'infection de la mamelle —, le pouvoir protéolytique peut s'exercer partiellement sur la caséine ou les caséinates présents. *A priori*, il y a d'ailleurs lieu de l'admettre ; en raison de la teinte translucide de beaucoup de laits de rétention et de certains laits de mammites, on peut, en effet, penser à un début de digestion des protéines.

Dans la polyflore de certaines mammites, des espèces protéolytiques ne paraissent pas douteuses. Nous n'avons pas parlé du *B. pyogenes bovis*, microbe nettement protéolytique et anaérobie, assez rare dans les mammites de nos régions, plus fréquent dans celles de l'Amérique du Sud, mais que l'on perçoit surtout dans les manifestations aiguës. Nous ne voyons pas qu'il ait été signalé comme appartenant à la flore primaire de Steck, c'est-à-dire qu'il soit l'hôte normal des mamelles en état d'infection latente.

Que les protéases microbiennes de la mammite soient du type trypsine, on peut le penser, puisque le coagulum dû à l'addition de l'alizarine s'obtient avec des laits dont le pH est élevé : 7,5-7,6, c'est-à-dire à un point où la présure n'agit pour ainsi dire plus.

Il est facile de donner aux considérations dans lesquelles nous venons d'entrer un appui expérimental :

Nous avons pris un caséinate de calcium de pH égal à 6,8 et en avons fait deux parts. La première a été additionnée de présure tuée par la chaleur, la seconde de la même présure active, vivante dirons-nous. Puis au bout de quelques minutes, alors que nous pouvons supposer que l'action de la présure sur le caséinate est terminée, nous avons ajouté aux deux liqueurs leur volume de la solution d'alizarine de Morres.

Alors que le caséinate non attaqué, simplement additionné de présure préalablement tuée, donne une coloration rouge pâle,

virant légèrement vers un violet peu accentué, le caséinate attaqué, dont la réaction n'est point différente de celle du précédent et qui a été transformé par le lab en paracaséinate, donne un *précipité caille-botté* se rassemblant dans le fond du tube et laissant au-dessus de lui un liquide rouge pâle, couleur vieux vin.

Cette expérience très suggestive semble donc venir à l'appui de l'hypothèse que nous formulions plus haut sur l'attaque possible, *in vivo*, de la caséine par certaines espèces microbiennes protéolytiques de la mamelle infectée.

Alors que les indicateurs colorés dont nous avons parlé antérieurement : *bleu de bromo-thymol* et *pourpre de bromo-crésol*, *acide rosolique*, donnent des virages dont la grande pratique peut apprécier le degré de sensibilité, on ne peut pas ne pas dire que la gamme des teintes qu'ils nous offrent est, somme toute, restreinte. Ce sont des nuances pas toujours très tranchées que nous avons à apprécier.

L'avantage de l'alizarol sur les précédents indicateurs colorés et sur tout autre que l'on pourrait employer en laiterie, c'est justement de donner une gamme de virages extrêmement intéressante, puisqu'elle va du jaune franc des laits hyper-acides au violet profond des laits alcalins. Mais ce n'est pas le seul ; il faut compter également sur la formation très symptomatique d'un précipité sur les laits alcalins. Ni le *bleu de bromo-thymol* ni le *pourpre de bromo-crésol*, en raison du mode de leur emploi, ne sont susceptibles de donner un précipité sur les laits malades alcalins.

L'épreuve alcool-alizarine est effectuée en mélangeant 3 cm³ de lait et 3 cm³ de la solution.

L'épreuve au bleu de bromo-thymol est faite de la façon suivante : à 5 cm³ de lait, on ajoute 1 cm³ d'une solution orangée de bleu obtenue en dissolvant 1 gr. de matière colorante dans 1 litre d'alcool à 60°. Les laits normaux donnent une réaction jaune, à peine teintée de vert ; les laits alcalins donnent une coloration verdâtre nette ou peu verdâtre, suivant leur pH.

Ces deux épreuves peuvent être réalisées au pis de la vache.

Comme nous venons de le voir par tout ce qui précède, les modifications dans la composition chimique du lait déterminées par l'infection latente ont pu être décelées par des méthodes de caractères très différents :

a) **Méthodes chimiques** : dosage des chlorures, mesure de l'acidité par titrimétrie, mesure du pH par des indicateurs colorés possédant plusieurs zones de virage... ;

b) **Méthodes physiques et physico-chimiques** : mesure de l'acidité par potentiométrie, mesure de la résistance électrique, mesure de l'indice de réfraction du sérum ;

c) **Méthodes biologiques** : méthode du lab-ferment, qui révèle la diminution de la caséine et l'augmentation de la globuline, protéine protectrice.

LA PHAGOCYTOSE DANS LES MAMMITES.

Il nous reste maintenant à voir comment les modifications entraînées dans les ferments solubles du lait sécrétés par les éléments cellulaires : les phagocytes, vont pouvoir se mesurer.

Nous laissons de côté les autres éléments biochimiques : les vitamines, car rien n'a encore été fait sur les relations possibles entre la quantité de vitamines du lait et les altérations qu'y provoquent l'infection.

Il n'y a pas de mammites sans infection. A son tour l'infection appelle la défense phagocytaire. Mais on peut très bien admettre qu'il y ait infection sans mammite bien déclarée, et le cas de la méli-tococcie chez la chèvre vient à l'appui de cette opinion. En tout cas, si faibles que soient les lésions du parenchyme, il y a envahissement microbien et inéluctablement appel phagocytaire.

Il y a longtemps que BREED [45], dans toute une suite de travaux, et COLEDGE [46] signalèrent la grande richesse de certains échantillons de lait en phagocytes, sans qu'on en pût alors trouver l'explication dans une affection pré-existante ou concomitante. Parfois la présence du *B. abortus* ou celle de streptocoques justifiait cette abondance de leucocytes, mais dans d'autres cas on devait laisser de côté toute infection caractérisée. Une recherche microbienne soignée ne montrait pas de streptocoques.

Il n'y a pas de contradiction dans ces observations qui paraissent opposées, tout simplement parce que deux processus différents, réclamant l'un et l'autre un appel phagocytaire important, doivent être envisagés.

Le premier répond à l'infection de la glande, et l'appel phagocytaire vise alors la défense de celle-ci contre le microbe envahisseur. Le second répond à la rétention lactée ; il faut débarrasser la mamelle du lait qui stagne à son intérieur et qui dès l'instant où il n'est pas expulsé par la mulsion, n'est plus pour l'organisme qu'un corps étranger dont il doit éliminer les divers morceaux par des mécanismes différents. Nous avons insisté sur la nature de ces mécanismes dans des travaux antérieurs [47]. Nous n'y reviendrons pas. Retenons seulement que l'appel leucocytaire est indispensable pour nettoyer la mamelle de certains des morceaux du lait retenu dans la glande.

Les phagocytes vont intervenir en effet : a) pour englober la matière grasse et donner par conséquent des formes cellulaires analogues aux corpuscules de Donné du colostrum ; b) pour englober

d'autres colloïdes, tels les phosphates de calcium et le caséinate de calcium, et même pour les digérer, comme c'est le cas pour ce dernier.

La rétention et l'infection ne font pas appel précisément aux mêmes leucocytes et le travail de BOURGEOIS [48] nous fournit sur ce point des acquisitions précieuses ; mais lorsque ces deux processus s'associent — ce qui est fréquemment le cas —, nous devons noter la présence des divers phagocytes, les micro- et les macrophages.

La formule leucocytaire de l'infection n'est pas celle de la rétention. Les leucocytes qui interviennent pour combattre les microbes ne sont pas les mêmes que ceux qui jouent pour débarrasser la mamelle de la graisse et des colloïdes du lait qui s'y concentrent lorsque la sécrétion naturelle n'est pas traitée.

Il y a lieu d'abord d'apprécier quelle est l'importance de cet afflux leucocytaire dans le lait, indépendamment de sa nature cellulaire.

Puisque la rétention et l'infection déterminent le même acte défensif de l'organisme : une phagocytose de l'agent perturbateur, qui dans un cas est le lait, corps étranger, et dans l'autre, le microbe, agent d'infection, il est nécessaire d'évaluer le nombre des leucocytes et, une fois que cela sera fait, nous procéderons, avec BOURGEOIS, au classement et au dénombrement de chaque variété d'entre eux en vue d'établir des pourcentages qui nous seront nécessaires pour fixer la formule leucocytaire de tel ou tel lait.

L'ÉPREUVE DE TROMMSDORFF. — La détermination du volume des leucocytes du lait se fait par la méthode de TROMMSDORFF [49]. Elle a été imaginée par ce vétérinaire allemand dans le but de mettre à la disposition de ses confrères un procédé simple pour établir le diagnostic des mammites chroniques et subchroniques, déceler la présence d'une infection latente.

On filtre au préalable le lait sur de l'ouate, afin de le débarrasser des impuretés par trop grossières qu'il peut contenir. On remplit des tubes de 10 cm³ de lait, on bouche et on centrifuge à 1.200 tours par minute. On note alors l'importance du dépôt qui s'est ramassé dans la partie capillaire inférieure du tube. Celui-ci comprend deux divisions principales (1 et 2) divisées elles-mêmes en dixièmes. Dans le lait normal, le dépôt ne doit pas dépasser la première subdivision.

On a pu critiquer la méthode de Trommsdorff et lui dénier quelque sensibilité ; mais nous estimons qu'on a exagéré. Dans les mammites graves, la méthode de Trommsdorff n'a rien à voir. On centrifugerait un tel lait qu'on obtiendrait un culot abondant constitué de coagulats protéiniques, d'hématies et de pus qui dépasserait de

beaucoup les deux divisions principales du tube de Trommsdorff. Cette épreuve est faite pour des laits apparemment normaux ou presque, chez lesquels, en somme, l'infection déjà notable peut se traduire par un taux cellulaire important.

Des petites troussees comportant une centrifugeuse à deux tubes ou quatre tubes tout au plus, permettent au vétérinaire de procéder sur place, dans l'étable, à la centrifugation du lait qu'il vient de recueillir et d'apprécier l'importance du culot, dont il lira la hauteur dans la partie effilée des tubes.

Un autre avantage de cette méthode, c'est que derrière cette appréciation objective assez grossière mais non sans valeur de l'importance d'un précipité, il reste la possibilité d'examiner ce précipité au microscope, avec ou sans coloration, et de s'en servir pour lesensemencements.

LA FORMULE LEUCOCYTAIRE DES MAMMITES. — Nous recommanderons, avec BOURGEOIS, de chauffer le lait aux environs de 50°, afin de recueillir le plus possible de phagocytes dans le précipité et de n'en laisser passer que le minimum dans le bouchon de crème. En chauffant à 70°, comme le recommande CAMPBELL [50] on sépare mieux encore les phagocytes du lait, mais on les altère un peu. Avec la température de 50°, recommandée par BOURGEOIS, on obtient une séparation presque complète des phagocytes, qui, n'étant point altérés, pourront se colorer parfaitement.

L'établissement de la formule leucocytaire a évidemment plus de finesse que l'épreuve de Trommsdorff. Il est plus délicat, mais il a des conséquences autres. L'épreuve de Trommsdorff appartient au praticien ; l'établissement de la formule leucocytaire, au laboratoire.

BOURGEOIS insiste avec raison sur le fait que les méthodes purement quantitatives d'examen des leucocytes du lait sont incapables de différencier les deux processus à siège mammaire : l'infection et la rétention, et qu'il importe moins de savoir combien il y a de leucocytes que de déterminer leur qualité, leur pourcentage et leurs différentes variétés.

D'une façon très générale, nous dirons, avec BOURGEOIS, que dans le lait normal, la formule leucocytaire est voisine de celle du sang. Les lymphocytes sont en grande proportion par rapport aux polynucléaires ; dans les laits de mammité, au contraire, la totalité des leucocytes est constituée par des polynucléaires neutrophiles, ainsi appelés parce qu'ils fixent de préférence les colorants neutres. On en trouve de 70 à 75 % dans les infections légères par *cocci*, de 80 à 85 % dans les mammites streptococciques et jusqu'à 98 % dans certaines polyinfections mammaires.

Dans les laits de rétention et dans le colostrum, qui n'est que la

forme *in extremis* du lait de rétention, ce sont surtout les gros mononucléaires qui sont chargés du travail phagocytaire. Leur pourcentage y est de 20 à 30 %, alors que dans les laits normaux il est de 3 à 4 % ; parfois même, chez ceux-ci, on n'en rencontre pas un seul dans un certain nombre de champs. Il y a parallélisme constant entre les gros mononucléaires et les éléments phagocytaires chargés de graisse.

Lorsque le colostrum est lui-même infecté, il renferme beaucoup de polynucléaires.

L'établissement de la formule leucocytaire selon les données de Bourgeois est d'un grand intérêt au point de vue scientifique. Il nous permet d'établir une différence nette entre les laits de rétention et les laits d'infection. Nous savons qu'au point de vue chimique, il n'en est guère ; les modifications que l'on observe dans un cas comme dans l'autre sont de même sens et souvent de même ordre de grandeur.

BOURGEOIS établit également une différence intéressante dans le pouvoir catalasogène des différents phagocytes.

LES FERMENTS SOLUBLES ET LES LAITS DE MAMMITES.

La peroxydase. — Le lait normal renferme des ferments dont les propriétés chimiques sont très variables. L'un d'entre eux décompose l'eau oxygénée en libérant de l'oxygène atomique ; c'est la *peroxydase*. Il existe en dissolution dans le sérum et est thermolabile. En ayant recours à des indications qui permettent de le déceler, comme la formation d'une couleur bleue après addition de paraphénylènediamine et d'eau oxygénée, on peut distinguer le lait cru du lait cuit.

Les variations de la peroxydase au cours de l'infection latente ont été étudiées, mais nous n'avons rien à en tirer pour la prospection de l'infection latente.

Nous en dirons autant d'ailleurs de la *diastase proprement dite*, qui digère l'amidon, de la *lipase*, etc., de la *réductase de Shardingier*.

Restent deux autres diastases, dont les relations avec l'infection, latente ou déclarée, sont indiscutables : c'est la *réductase* et la *catalase*.

La réductase. — La réductase est sécrétée par les microbes et décolore le bleu de méthylène dans certaines conditions de température et de temps. Mais si un lait de mammitite s'est trouvé pollué par une traite malpropre — et c'est fréquent —, aucune distinction ne peut être faite entre les bactéries primaires et les bactéries secondaires, car les unes et les autres jouissent plus ou moins d'un pouvoir réducteur.

L'épreuve de la réductase a sa pleine valeur dans la grande indus-

trie laitière ; mais en ce qui concerne l'objet de ce travail, il ne paraît pas indiqué d'y recourir.

LA CATALASE. — Infiniment plus précieuse est l'épreuve de la catalase. La catalase est une diastase qui possède la propriété de décomposer l'eau oxygénée diluée en mettant en liberté de l'oxygène moléculaire. C'est par la mesure du volume dégagé de ce gaz qu'on appréciera la quantité de catalase présente.

Bien des appareils ont été préconisés pour faire la réaction. Le meilleur est toujours le plus simple. En voici deux : l'appareil de Lobeck, qui est tout d'une pièce, que l'on peut emporter avec soi et qui est recommandable pour des déterminations extemporanées ou isolées, et l'appareil de Koestler, bon pour les recherches en séries comme on est appelé à les faire dans certains laboratoires spécialement adonnés au dépistage de l'infection latente.

Voici quel est avec l'appareil de Koestler le *modus faciendi* à suivre :

Dans un petit flacon portant deux divisions (10 et 15), on place 10 cm³ de lait et on ajoute 5 cm³ d'eau oxygénée à 2 volumes obtenue par l'addition de 4 volumes d'eau à 1 volume d'eau oxygénée officinale — laquelle est en général à 10 volumes. On bouche rapidement avec un bouchon de caoutchouc traversé par un tube à dégagement, on agite puis on plonge le petit tube dans un bain-marie à 25° de façon que le tube soit recouvert par l'eau. On renverse sur ce tube à dégagement une éprouvette graduée et remplie d'eau. L'oxygène qui se dégage va s'accumuler à la partie supérieure de l'éprouvette et chasser l'eau de celle-ci à mesure qu'il prendra sa place. La lecture est faite au bout de 2 heures et on note le nombre de centimètres cubes qui viennent d'être dégagés. On rapporte ce volume à 100 cm³ de lait et on obtient ainsi le *chiffre de catalase* ou encore l'*indice catalasimétrique*. Cet indice ne doit pas dans les laits normaux dépasser 3 à 4. Quand il s'élève au-dessus, on commence à pénétrer dans la zone de laits d'infection latente ; mais jusqu'à 7 ou 8 cm³, quelquefois même jusqu'à 10, les laits peuvent encore être utilisés pour certaines industries laitières. Mais dès qu'on dépasse 10, il faut tenir ces laits en suspicion.

Le lait hémorragique. — Il faut savoir que le sang est riche en catalase et décompose énergiquement l'eau oxygénée. Un lait de mammite dans lequel l'épreuve de Trommsdorff — qui doit toujours être faite en même temps que celle de la catalase — nous décèlerait une zone de globules rouges, décomposerait ainsi énergiquement l'eau oxygénée en l'absence d'un dépôt notable. Tout lait hémorragique ne doit donc pas être soumis à l'épreuve de la catalase. Même

si c'est un lait d'infection, nous n'en tirerons rien de positif, car il nous sera difficile de faire la part de ce qui revient au dépôt purulent, d'un côté, au sang, de l'autre.

Origine de la catalase. — Quelle est l'origine de la catalase et pourquoi doit-on lui attribuer une grande valeur dans la question qui nous occupe. Voilà des questions qui se posent. La catalase a une double origine. Elle est généralement d'origine leucocytaire, mais elle peut être aussi d'origine microbienne. En tout cas, la quantité de catalase sécrétée par le microbe est très faible vis-à-vis de celle qui relève des leucocytes.

Laits d'infection et laits de rétention étant l'un et l'autre riches en phagocytes, vont donc décomposer énergiquement l'eau oxygénée et donner à l'épreuve de la catalase un indice élevé. Cette dernière ne semblerait donc pas être, *a priori*, choisie dans la prospection des mammites, notamment de l'infection latente. Elle est cependant de tout premier ordre, et la grande pratique l'a tout à fait consacrée.

Toutes les variétés de leucocytes ne sont pas également productrices de catalase. BOURGEOIS prend soin de bien insister sur ce point. Il a été frappé *du parallélisme constaté dans 90 % des cas entre le pourcentage élevé des polynucléaires et le chiffre important de l'indice catalasimétrique.*

Les polynucléaires et les lymphocytes s'opposent à tous points de vue. Ceux-ci sont de simples éléments de filtration sans aucun rôle défensif et ne produisent pas de catalase. Au contraire, les polynucléaires — qui sont les éléments microphages par excellence — seraient les principaux producteurs de cette diastase.

Dans les cas de rétention légère où il n'y a qu'un excès de mononucléaires, le chiffre de la catalase reste comparable à celui des laits normaux. Ce n'est que lorsque la rétention se complique d'infection, que ces deux processus s'aident l'un l'autre, que l'indice catalasimétrique s'élève considérablement.

Tous ces faits vous montrent l'intérêt qu'il y a à associer dans un même cadre de recherches les déterminations faites auprès de l'animal par des procédés simples : l'épreuve de Trommsdorff, voire la détermination catalasimétrique. L'une et l'autre n'ont pas à être éloignées de vos préoccupations ; elles rentrent dans ces petites manipulations faciles à faire et qui peuvent être réalisées chez vous.

(A suivre.)