

OBSERVATIONS SUR LA CROISSANCE DES STAPHYLOCOQUES ET LA RÉACTION LEUCOCYTAIRE AU COURS DES PREMIÈRES HEURES DE LA MAMMITE EXPÉRIMENTALE DE LA BREBIS

Anne LE GALL et M. PLOMMET

Station centrale de Microbiologie et Recherches laitières,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)

SOMMAIRE

On peut suivre l'évolution de la mammité staphylococcique expérimentale de la brebis en étudiant la multiplication bactérienne et la réaction leucocytaire *in vivo* par analyse d'échantillons successifs de lait.

Dans cette étude portant sur 81 cas de mammité, on a par ce moyen établi : 1° les caractéristiques de la multiplication bactérienne dans la mamelle ; 2° les conditions de déclenchement et les caractéristiques de la réaction leucocytaire.

La réaction leucocytaire apparaît comme le principal moyen de défense contre l'infection, mais son efficacité vis-à-vis de la croissance bactérienne ne dépend ni de sa précocité ni du titre des antitoxines α et β . La gravité de la mammité, mesurée par l'étendue et l'intensité des lésions, est fonction du nombre maximum de germes atteint par la culture *in vivo*, de la quantité de lait produite par traite, des titres des antitoxines α et β .

Lorsqu'on inocule une dizaine de staphylocoques dans la mamelle d'une brebis en lactation, on provoque dans les 24 heures une infection dont la gravité dépend du titre des antitoxines α et β et de la quantité de lait produite par cette brebis (PLOMMET, 1960 ; PLOMMET, LE GALL, 1963). L'évolution de l'infection est rapide : en 36 à 48 heures, le tableau clinique prend son caractère définitif. Ceci suppose une intense multiplication des staphylocoques et des défenses peu efficaces, au moins au cours des premières heures.

Peu de travaux ont été consacrés à la multiplication des staphylocoques *in vivo*, au cours de l'infection aiguë, en raison de la difficulté d'obtention de prélèvements successifs qui soient réellement représentatifs de l'évolution de la culture (FRAPPIER,

SONEA, 1956 ; GLADSTONE et GLENCROSS 1960 ; FOSTER et HUTT 1960). Dans la mammite expérimentale de la brebis, par contre, on peut suivre facilement par des prélèvements successifs de lait à la fois le développement bactérien *in situ* et la réaction leucocytaire consécutive à l'infection. Nous avons, dans ce travail portant sur 81 brebis, 1° établi les caractéristiques de la croissance des staphylocoques dans la mamelle au cours des 36 heures qui suivent l'inoculation ; 2° étudié les caractères généraux de la réaction leucocytaire, en particulier le moment et les conditions de son déclenchement ; 3° montré que l'efficacité de la phagocytose ne dépend ni de la précocité de la leucocytose ni du titre des antitoxines α et β ; 4° montré que la gravité de l'infection dépend du titre des antitoxines α et β , de la quantité de lait sécrétée, du nombre de germes atteint par la culture.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

81 brebis vaccinées ou non, ont été inoculées par injection de staphylocoques dans la mamelle. Les titres des anticorps résultant de la vaccination (antitoxines α et β : At α et At β) et la résistance à l'infection expérimentale ont été déjà rapportés (1963). De même le matériel et les méthodes décrits dans les publications précédentes (1960, 1963) seront simplement rappelés ici.

1. — Animaux

Les brebis, de race *Préalpes*, étaient, au moment de l'inoculation, en lactation depuis 50 (\pm 10) jours et étaient traitées, matin et soir, depuis 15 jours. À chaque traite, on mesurait à l'éprouvette, la quantité de lait produite par chaque quartier (Q : production moyenne du quartier par traite). Toutes les brebis étaient indemnes d'infection et, à 3 exceptions près, ne présentaient pas de séquelles d'inflammation de la mamelle.

2. — Inoculation

L'inoculation consistait à injecter par le canal du trayon dans la mamelle, préalablement vidée de son lait, 0,2 ml d'une suspension de staphylocoques contenant entre 8 et 97 cellules. Ce nombre était déterminé par ensemencement sur gélose de 30 inoculums identiques et numération des colonies (PLOMMET, 1960). Deux souches de staphylocoques ont été utilisées : la souche 81-26, de type hémolytique $\alpha\beta\delta$, et, sur 12 brebis, la souche 101-52 dérivée de la précédente, de type $\alpha\beta$. Les deux souches produisent de la coagulase libre et de la coagulase liée, mais pas de fibrinolysine. Elles appartiennent à un même type sérologique (5-(7)-16) (PILLET et *al.*, 1962).

3. — Prélèvements

Des échantillons de quelques ml de lait ou de sérosité inflammatoire ont été obtenus par traite aseptique, d'une part immédiatement avant l'inoculation (avant la traite du soir), d'autre part 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h et 36 h après l'inoculation (avant les traites des 12^e, 24^e et 36^e heures).

4. — Numération des staphylocoques

Les numérations ont été faites en ensemençant 0,1 ou 0,2 ml de l'échantillon ou de ses dilutions décimales successives sur boîte de gélose (*Tryptose Blood Agar Base*, additionné de 5 p. 100 de sang de mouton) et en incubant 24 h à 37°C. Les échantillons prélevés 8 h après l'inoculation étaient

ensemencés sur 3 ou sur 5 boîtes, purs et à la dilution-1. Les autres échantillons étaient ensemencés sur 2 boîtes par dilution. On comptait ensuite les colonies de staphylocoques, reconnaissables à l'hémolyse caractéristique qu'elles provoquent. En fait, on a presque toujours obtenu des cultures pures, sauf pour quelques-uns des échantillons prélevés à la 8^e heure, qui contenaient un petit nombre de microcoques.

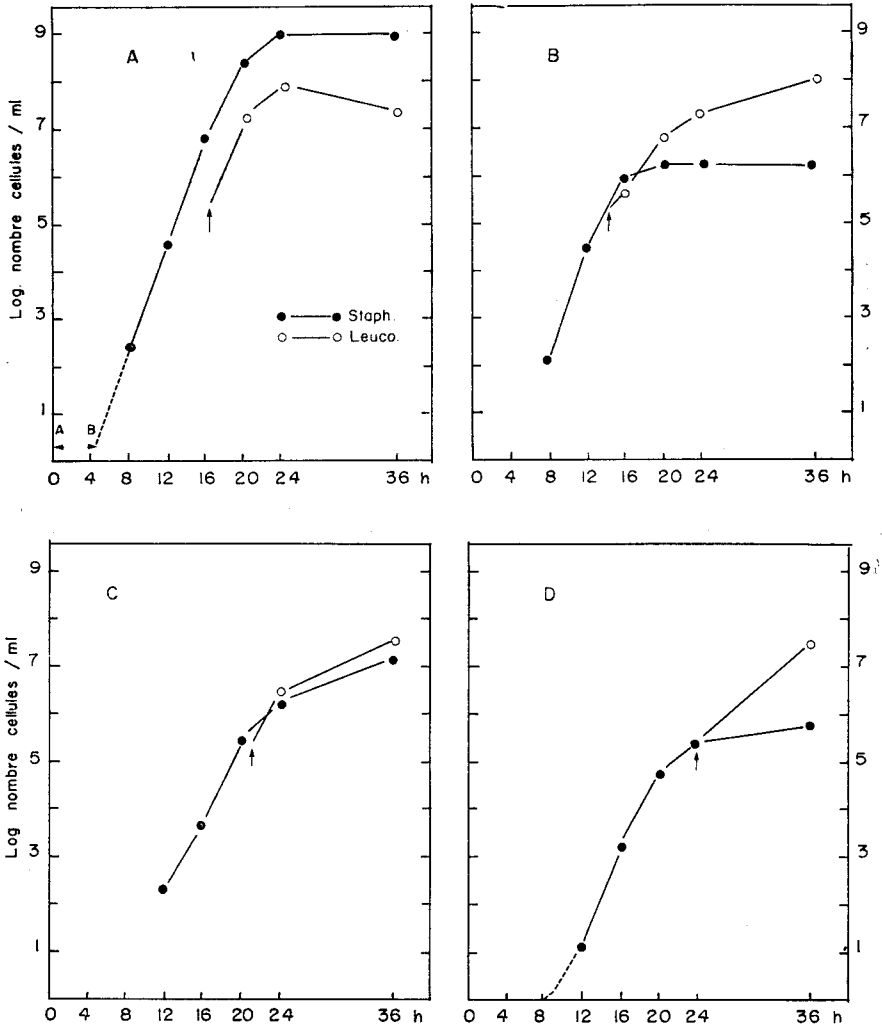


FIG. 1 et 2. — Croissance des staphylocoques et leucocytose dans la mammite expérimentale
La flèche indique le début R. I.

Les échantillons des premières heures donnent régulièrement des résultats satisfaisants, les écarts entre les doubles étant inférieurs à 20 p. 100. Par contre les échantillons prélevés à la 16^e heure et au-delà donnent parfois des écarts importants entre les doubles ou les dilutions successives : ils contiennent en effet des agglomérats de cellules et de bactéries. Pour obvier à cet inconvénient, ces échantillons ont été homogénéisés, avant numération, par agitation vigoureuse dans des tubes de dilution contenant des billes de verre. Malgré cette précaution, certaines numérations ont donné des écarts excessifs entre les doubles ; les résultats correspondants ont été considérés comme inutilisables. C'est pourquoi il manque des données correspondant à un ou plusieurs prélèvements sur certaines brebis.

5. — Numérations des cellules inflammatoires

Les cellules du lait ont été dénombrées par la méthode de BREED, colorant de NEWMAN, en utilisant une anse calibrée pour le prélèvement et l'étalement du lait sur la lame. Les cellules ont été comptées dans 5 à 30 champs (diamètre 0,07 ou 0,14 mm selon le nombre de cellules par champ) afin que les résultats soient reproductibles à ± 20 p. 100 dans les limites de 1.10^3 à 1.10^7 .

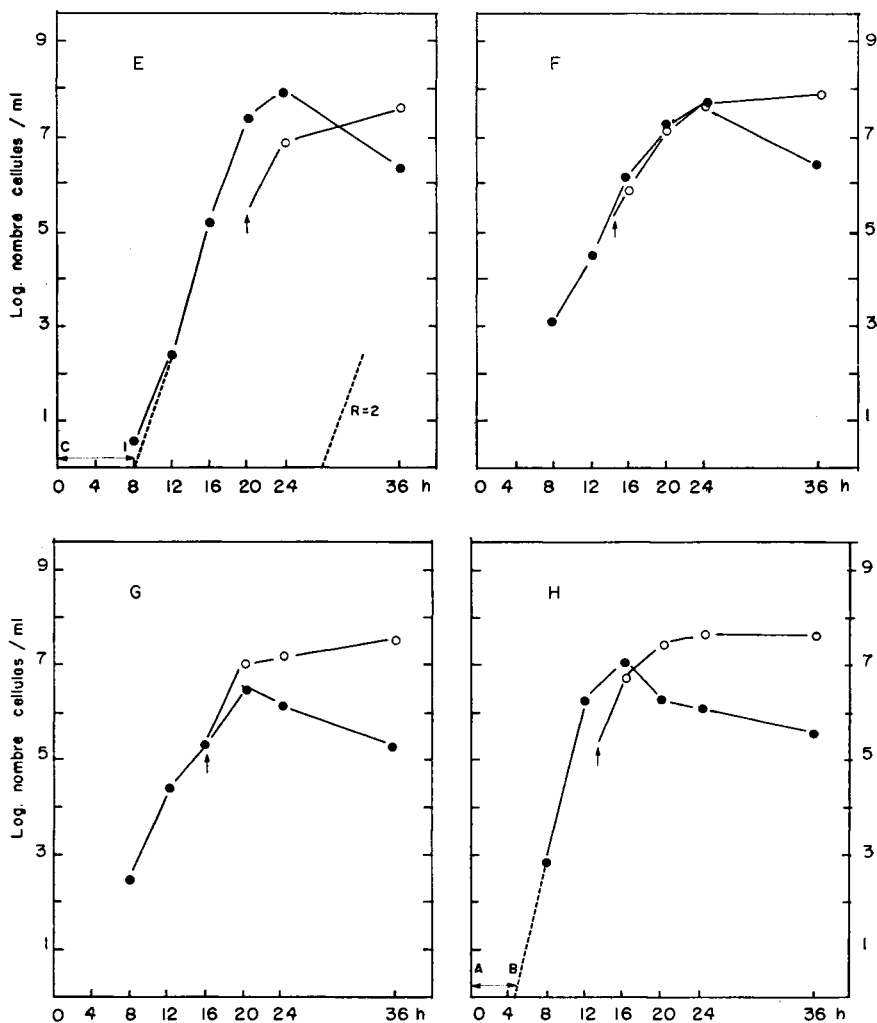


FIG. 3 et 4. Croissance des staphylocoques et leucocytose dans la mammité expérimentale.

Le nombre et la nature des cellules contenues dans le lait sont très caractéristiques de l'état de la mamelle : dans le lait de brebis, on trouve normalement moins de 50 000 cellules par ml — cellules épithéliales surtout et quelques rares polynucléaires — ce nombre peut atteindre 200 000 à l'occasion de petites perturbations de la lactation, au sevrage, en cas de rétention par exemple. Dans le lait des brebis guéries d'une infection, — même très ancienne —, il existe toujours un nombre plus important de cellules, jusqu'à 500 000 par ml comprenant une proportion de polynucléaires comprise entre 20 et 50 p. 100 du nombre total de cellules. En période d'infection, les cellules du lait sont toujours très nombreuses et la proportion des polynucléaires atteint en général 90 à 95 p. 100. Sur les

courbes représentant les variations du nombre de cellules au cours de l'infection, les résultats des numérations faites avant le début de la réaction leucocytaire (R.L.) ne sont pas figurés : ainsi les courbes représentent pratiquement la variation du nombre de leucocytes. Compte tenu de ces données, nous avons défini le début de la réaction leucocytaire comme le moment où le nombre total de cellules atteint 250 000. Il a été établi avec une bonne précision à partir des courbes représentant les numérations successives (fig. 1 à 5).

6. — Gravité des mammites

Les mammites ont été classées en 6 degrés cliniques selon l'importance de la lésion telle qu'elle apparaît à la 48^e heure. Les degrés 1 et 2 correspondent à des mammites légères, évoluant soit vers une focalisation de l'infection (1), soit vers une extension progressive (2) ; les degrés 3 et 4 correspondent à des mammites graves, affectant l'état général des brebis, et donnant une inflammation de la mamelle, moyenne (3) ou intense (4) ; les degrés 5 et 6 correspondent à des mammites très graves, avec gangrène localisée à une partie de la mamelle (5) ou affectant la totalité de l'organe (6).

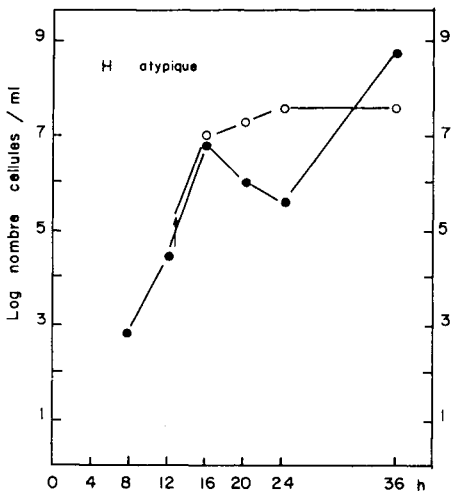


FIG. 5. Croissance des staphylocoques et leucocytose dans la mammite expérimentale

7. — Ce que représente l'échantillon

A première vue, l'échantillon de lait semblerait représenter une culture microbienne évoluant sous un volume variable : l'inoculation ayant été faite immédiatement après une traite, le volume de la culture augmente au fur et à mesure de la sécrétion de lait jusqu'à la traite suivante, 12 heures après l'inoculation.

On doit cependant rappeler les deux faits suivants : 1^o il reste dans la mamelle après la traite une quantité de lait de l'ordre de 20 p. 100 de celle recueillie à la traite ; ce lait contenu dans les acini s'écoule aussitôt vers le sinus galactophore de sorte que celui-ci, dont la capacité est de l'ordre de 25 p. 100 du volume d'une traite, se remplit très rapidement, dans les heures qui suivent la traite (RICORDEAU, MARTINET, DENAMUR, 1963) ; 2^o la culture microbienne reste localisée, dans une première phase de l'infection, au sinus et aux gros canaux galactophores. Les échantillons de la 8^e et de la 12^e heures représentent donc, en fait, une culture microbienne à volume sensiblement constant.

Après la traite de la 12^e heure une grande partie de la culture est éliminée, puis remplacée progressivement par du milieu neuf ; la 2^e phase de l'infection se développe alors, la culture s'étendant aux petits canaux, aux acini pour atteindre enfin le tissu sécrétoire lui-même.

La 2^e phase se distingue cliniquement de la première par l'interruption de la sécrétion et l'apparition d'exsudat inflammatoire dans le lait. Le passage d'une phase à l'autre a toujours lieu après la 12^e heure, en général entre la 16^e heure et la 20^e heure après l'inoculation.

Les échantillons prélevés pendant la première phase, parce qu'ils viennent d'une culture en milieu liquide, sont assez représentatifs de cette culture (quelques résultats aberrants sont dus vraisemblablement à une répartition irrégulière des germes dans le sinus). Les échantillons prélevés

pendant la 2^e phase n'ont pas la même signification. L'extension progressive de l'infection, les variations de volume de la culture, l'intervention des leucocytes ne permettent pas de considérer dans tous les cas l'échantillon comme une image exacte du processus infectieux. Si, dans les mammites graves, à extension rapide, l'échantillon est encore au début assez représentatif de l'ensemble du foyer infectieux, il n'en est certainement par la suite qu'une image très imparfaite. Dans les mammites légères, l'inflammation restant localisée à une fraction de la mamelle, l'échantillon représente une dilution de la culture dans du lait normal.

8. — Taux de croissance (R) et temps de latence (t) apparents

Selon les données précédentes, on peut considérer que la culture *in vivo* évolue à volume sensiblement constant, entre la 8^e et la 12^e heures. On peut par conséquent calculer à partir des numérations de 8 h (y_8), de 12 h (y_{12}) et en fonction de l'inoculum (y_0) le taux de croissance et la durée du temps de latence. Ces calculs supposent : 1^o que l'on néglige la phase intermédiaire, 2^o que la phase exponentielle soit atteinte au point 8 h, 3^o que les nombres y_8 et y_{12} soient connus avec une précision suffisante.

En règle générale, on a admis que la condition 2 était remplie quand la valeur y_8 était supérieure à 100 puisque cela supposait une multiplication par 100 au moins de l'inoculum ; on a admis aussi que y_8 et y_{12} étaient connus, compte tenu des résultats des numérations, avec une précision de ± 20 p. 100. Dans ces conditions on a calculé 43 valeurs de R (R calculé) et 44 valeurs de t (t calculé). L'erreur sur les déterminations de R et de t résulte : 1^o de l'erreur sur les mesures de y_8 et y_{12} , 2^o de l'erreur sur la mesure de y_0 ; cette dernière varie avec l'importance de l'inoculum (plus il est petit, plus l'erreur sur sa mesure est grande) et de l'estimation du volume du sinus galactophore. En prenant une erreur sur l'inoculum égale à 2 fois l'écart-type de la distribution des inoculums dénombrés sur boîte, et une erreur sur le volume du sinus égale à ± 10 p. 100 ($v = 0,25 Q \pm 0,10 Q$) on a calculé l'erreur : 1^o sur R : elle est égale, en valeur absolue à $\pm 0,15$, 2^o sur t : elle est inférieure à 1 h, sauf dans 6 cas se rapportant à un très petit inoculum où elle est alors comprise entre 1 h et 2 h.

Dans le cas où $y_8 < 100$ germes/ml, les conditions énoncées plus haut ne sont pas remplies. Il était alors inutile de faire des calculs précis à partir de données approximatives. On ne pouvait pas, pour autant, rejeter les résultats correspondants, qui représentent justement des cas où la phase de latence est particulièrement longue. A partir des données existantes (y_8, y_{12}) on a fait alors une estimation graphique de R (8 valeurs) ; pour t (12 valeurs), on l'a estimé en se basant sur le point y_{12} et en prenant arbitrairement $R = 2$ afin d'éviter l'introduction d'une relation artificielle entre ces valeurs de R et de t . Les résultats correspondants sont désignés par R et t estimés.

Les figures 1, 3 et 4 expliquent schématiquement les modes de calcul et d'estimation de t : le segment AB représente t « calculé » à partir de R « calculé » et de y_8 et y_0 ; le segment CI représente t « estimé » à partir de y_{12} et y_0 avec $R = 2$. Le fait que les calculs et estimations de R et de t étaient basés sur un certain nombre d'hypothèses, nous a conduits à désigner R et t sous le nom de taux de croissance et temps de latence apparents.

9. — Mesure de l'efficacité de la phagocytose

Pour mesurer l'efficacité de la phagocytose, plusieurs critères étaient utilisables. Il nous a semblé que le critère le plus intéressant était de mesurer l'activité globale de la phagocytose sur la croissance bactérienne. Cette activité a été estimée par la valeur de R' , valeur équivalente au taux de croissance (aux variations du volume de la culture près) mesurée après la R.L. R' a été calculé sur un intervalle de 4 h, le nombre de germes aux points (R.L.) et (R.L. + 4 h) étant obtenu par interpolation.

RÉSULTATS

I. — Croissance des staphylocoques dans la mamelle

Compte tenu des données imprécises ou manquantes, les résultats obtenus sur 81 brebis inoculées ont permis de tracer 68 courbes représentant les variations du nombre de staphylocoques dans la mamelle, et de calculer ou d'estimer 51 valeurs de R et 56 valeurs de t . Sur l'une des 3 brebis présentant des séquelles d'inflammation la croissance des staphylocoques a débuté 48 heures après l'inoculation, au-delà de la période d'observation.

a) *Caractères généraux de la croissance.*

Les courbes obtenues présentent, entre elles, de grandes différences ; on peut, pour schématiser, les classer en huit types principaux (fig. 1 à 5) selon la position du point m (nombre maximal de germes) et selon la pente de la courbe au-delà de m .

TABLEAU I

Répartition et caractéristiques des types de courbes, selon la position du point maximum, m , et l'évolution de la croissance au-delà

Types	Nombre	m (log)	Heure de m (1)	Évolution au-delà de m (2)
A	9	8 à 10	24	0
B	7	6 à 8	16, 20	0
C	5	7 à 10	36	
D	2	5 à 7	24	0
E	9	8 à 10	24, 20	-1 ; -2 ; -3
F	9	7 à 8	20, 24	-1 ; -2
G	11	5 à 7	16, 20, 24	-1 ; -2 ; -3
H	13*	6 à 7	16, 12, 20	-1 ; -1,5 puis 0
AE (3)	3	8 à 10	24	?

(1) En italique : heure de m pour 1, 2 ou 3 courbes dans le groupe.

(2) Différence entre m et minimum observé.

(3) Les données de la 36^e heure, qui font la distinction entre A et E manquent

(*) Une courbe atypique (voir fig. 5).

TABLEAU 2

Répartition de la gravité des mammites en fonction des types de courbes. Gravité croissante de 1 à 6 (voir méthodes)

Types	Gravité					
	1	2	3	4	5	6
A				3		6
B	1	2	1	1	2	
C			1		1	3
D	2					
E	2		3		2	2
F	3	1	2	3		
G	5	2	2	1	1	
H	3	5	4		1	
AE				1		2

Le tableau 1 rapporte ces éléments ainsi que le nombre de courbes pour chaque type : m est situé entre les valeurs 1.10^5 et 6.10^9 germes/ml et entre les points 12 h et 36 h. Au-delà du point m , les courbes présentent soit une stabilisation du nombre de germes (type A, B, D), soit une diminution nette (types E, F, G, H) suivie elle-même d'une stabilisation à un niveau inférieur au maximum (H) ou d'une nouvelle multiplication (fig. 5).

Sur certaines courbes (fig. 1, 4) on peut voir une inflexion de la pente après 12 h résultant de l'élimination d'une partie de la culture par la traite. Nous avons vérifié que le type de la courbe ne dépend pas de Q . Il y a une certaine relation entre le type de courbe et la gravité des mammites (tabl. 2).

b) Temps de latence apparent (t).

Les 56 valeurs de t calculées ou estimées sont comprises entre 0 et 10 (± 1 heure), avec une moyenne de 3,1 heures (fig. 6). Nous n'avons pas mis en évidence de relations entre t d'une part et d'autre part : 1° Q et y_0 ; 2° $At\alpha$, $At\beta$ et les différentes vaccinations auxquelles les brebis avaient été soumises ; 3° m et le type de la courbe.

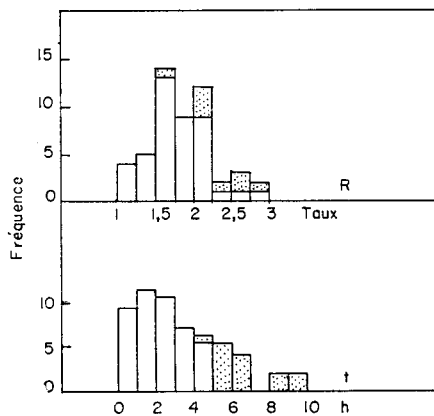


FIG. 6. — Distributions des valeurs du taux de croissance et du temps de latence apparents (Valeurs calculées, en blanc ; valeurs estimées, en hachuré)

Le premier de ces trois points est conforme à ce que l'on pouvait attendre par comparaison avec une culture *in vitro*. Le second point montre que les vaccinations n'apportent pas au milieu de culture des changements susceptibles de modifier le temps de latence. Le troisième point enfin, montre que l'évolution de la croissance *in vivo* est indépendante du temps de latence.

Il faut cependant remarquer que la variabilité de t , plus grande que celle qu'on obtient *in vitro* dans les conditions comparables, suggère l'existence d'un mécanisme d'inhibition. Le fait que deux ou trois brebis ayant des séquelles d'inflammation de la mamelle au moment de l'inoculation aient présenté des temps de latence longs (6 h) ou exceptionnels (48 h) peut faire penser qu'une phagocytose précoce n'est pas étrangère à ce phénomène ; il n'y a cependant pas de relation sur l'ensemble des animaux entre t et le nombre de cellules présentes dans le lait avant l'inoculation.

c) *Taux de croissance apparent (R).*

Les 51 valeurs de R calculées ou estimées sont comprises entre 1 et 3 ($\pm 0,15$) (fig. 6) avec une moyenne de 1,8 soit un temps de génération de 33 minutes. Ces valeurs, comparables à celles que l'on peut obtenir *in vitro*, suggèrent que l'organisme n'oppose aucune défense efficace contre l'infection à ce stade de la croissance (avant la R.L.). Il n'y a pas de relation entre R d'une part et d'autre part : 1° Q. Notons cependant que sur les médiocres laitières ($Q < 50$ ml), R est compris entre 1,2 et 1,7 (4 valeurs) ; 2° $At\alpha$, $At\beta$ et les différentes vaccinations ; 3° m et le type de la courbe.

Ces constatations, comme celles qu'expose le paragraphe précédent, montrent que R ne dépend pas des facteurs contrôlés, en particulier de la vaccination et que, d'un autre côté, R n'a pas d'influence sur l'évolution ultérieure de l'infection.

Entre les valeurs calculées ou estimées de R, et de t , il y a une relation nette ; en particulier aux phases de latence les plus longues correspondent, en moyenne, des taux de croissance élevés, comme si une culture tardive comblait une partie de son retard par une croissance plus rapide. On peut voir, par exemple, sur la figure 6 que les valeurs estimées de t , qui sont toutes plus grandes que 4, correspondent à des valeurs estimées de R généralement supérieures à la moyenne. Cette relation résulte, selon toute vraisemblance, d'erreurs systématiques en plus ou en moins sur les numérations de y_8 . Erreur par excès quand l'échantillon représente non pas une fraction d'une culture homogène mais la partie la plus dense, celle qui est située dans le canal du trayon, au lieu d'inoculation. Erreur par défaut, sur les valeurs de y_8 les plus basses, celles qu'on obtient par numération sans dilution, c'est-à-dire sans dissociation des agglutinats éventuels. Le premier type d'erreur doit s'appliquer à 5 ou 6 déterminations, pour lesquelles la valeur de t est peu vraisemblable (t voisin de zéro). Le second type doit s'appliquer, à l'inverse, aux courbes où t est anormalement long.

d) *Nombre maximum de germes (m).*

Le nombre maximum de germes est compris, selon les brebis, entre 1.10^5 et 6.10^9 germes/ml ; il est indépendant de R et de t . Il n'y a pas de relations entre m et Q (toutefois, les brebis produisant peu de lait ($Q < 50$) ont des valeurs de m inférieures à 2.10^7). Par ailleurs, comme le montre la figure 10, m est indépendant de $At\alpha$ et $At\beta$.

Les relations entre m et la gravité des mammites seront étudiées plus loin.

II. — *Réaction leucocytaire (R.L.)*a) *Caractères généraux de la R.L.*

La R.L. se traduit par l'apparition d'un nombre rapidement croissant de leucocytes (polynucléaires 90 p. 100) dans les échantillons successifs de lait ; cette réaction est très caractéristique du début de l'inflammation. Les polynucléaires restent prédominants au cours de l'évolution de l'infection, mais peuvent présenter des altérations plus ou moins prononcées, allant jusqu'à la lyse complète dans les cas de mammite gangréneuse ; les lymphocytes n'étant pas lysés restent alors les seules cellules dénombrables. La R.L. se produit en moyenne 11,2 h après le début de la croissance.

L'examen des figures 1 à 5 montre que la R.L. peut être suivie : 1° d'une inflexion de la courbe de croissance (C, F) ; 2° d'un arrêt de la croissance (B, D) ;

3° d'une décroissance précoce (G, H) ou tardive (E) ; 4° d'aucune modification (A). Ces différents résultats peuvent être interprétés comme la traduction d'une phagocytose plus ou moins efficace. Deux facteurs paraissent *a priori* susceptibles d'avoir une certaine influence sur l'efficacité de la phagocytose : 1° la précocité de la R. L. ; 2° la présence et le titre des anticorps antitoxiques.

b) *Liaisons entre la croissance bactérienne et la R.L.*

Entre la R.L. et la croissance bactérienne, deux types de liaisons réciproques existent : la croissance induit la R.L. qui agit en retour plus ou moins efficacement sur celle-là. Nous allons analyser successivement ces deux liaisons :

Si la R.L. a lieu en moyenne 11,2 h après le début de la croissance bactérienne, les écarts observés sont cependant assez grands (écart-type 2,8) pour que l'on puisse dire que la précocité de la R.L. est très variable selon les animaux. On pourrait donc supposer que les différents animaux répondent plus ou moins rapidement à un même stimulus représenté par une culture bactérienne en croissance.

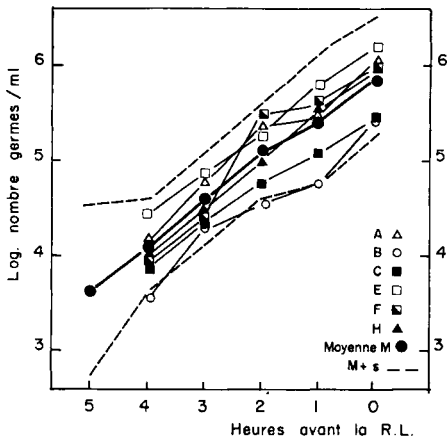


FIG. 7. — Distribution des courbes de croissance des staphylocoques par rapport au moment de la réaction cellulaire (Moyenne générale et écart-type — moyennes par types de courbe)

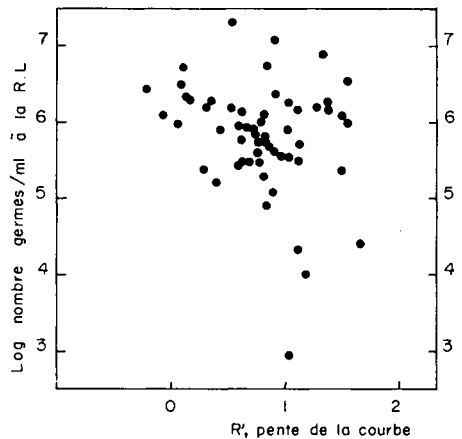


FIG. 8. — Relation entre le nombre de germes au moment de la réaction leucocytaire et la pente de la courbe (taux de croissance R') après celle-ci

Pour vérifier cette hypothèse on a comparé le stade de la croissance bactérienne sur les différents animaux dans les heures précédant la R.L. Pour cela, on a superposé les courbes de croissance après avoir effectué une translation telle que l'origine soit, pour toutes les courbes, le moment de la R.L. La figure 7 schématise cette opération en représentant d'une part les courbes moyennes calculées pour chacun des types, d'autre part des courbes symbolisant la moyenne générale et la dispersion des résultats. Cette figure montre nettement ceci : pendant la période de 2 à 4 h qui précède la R.L., le nombre de germes existant à chaque instant dans le foyer infectieux diffère peu d'une brebis à l'autre. Les moyennes et écarts-types sont, en effet, pour les points 2 h, 3 h et 4 h avant la R.L. respectivement : $5,1 \pm 0,49$; $4,6 \pm 0,47$; $4,10 \pm 0,49$. Les valeurs des points situés de part et d'autre sont nettement plus dispersées ; pour 0 h, 1 h, 5 h avant la R.L. respectivement, ce sont : $5,89 \pm 0,62$; $5,4 \pm 0,68$; $3,61 \pm 0,92$.

La conclusion de cette observation est que la R.L. est déclenchée chez toutes les brebis par un stimulus sensiblement identique, représenté par la culture en croissance à un stade donné ; on peut par exemple dire que la R.L. apparaît 3 ± 1 heures après que la culture ait atteint le niveau de 40 000 germes/ml.

Néanmoins le nombre de germes au moment de la R.L. varie dans d'assez larges limites (fig. 7 et 8) pour deux raisons : les taux de croissance sont assez différents d'une courbe à l'autre ; la phagocytose peut débiter en fait avant le moment de la R.L. : celle-ci a été définie par un nombre de 250 000 cellules par ml, ce qui n'exclut pas la présence de leucocytes efficaces avant ce moment. On peut par exemple remarquer sur la figure 7 que la courbe moyenne de type G (type de courbe correspondant à une phagocytose efficace) s'écarte nettement de la croissance moyenne une et deux heures avant la R.L.

Pour étudier les liaisons du 2^e type, il est intéressant de considérer le rapport du nombre de staphylocoques au nombre de leucocytes à un moment donné ; on peut facilement concevoir que l'efficacité de la phagocytose puisse en dépendre. Si on choisit le moment de la R.L., le rapport a les valeurs suivantes : moyenne 3,1 ; moyenne \pm écart-type 0,73 et 13 ; valeurs extrêmes observées 0,04 et 100. La figure 8 montre clairement qu'il n'y a pas de relation entre l'efficacité de la phagocytose estimée par R' et le rapport précédent, exprimé par le nombre de germes au moment de la R.L.

c) *Relations entre la phagocytose et les anticorps antitoxiques.*

La figure 9 montre que l'efficacité de la phagocytose n'est pas en relation avec le titre de l'antitoxine α . Cette absence de relation a été constatée de la même manière entre R' et le titre de l'antitoxine β , et avec les différents types de vaccination utilisés (corps microbiens, toxine δ) et aussi avec R et Q.

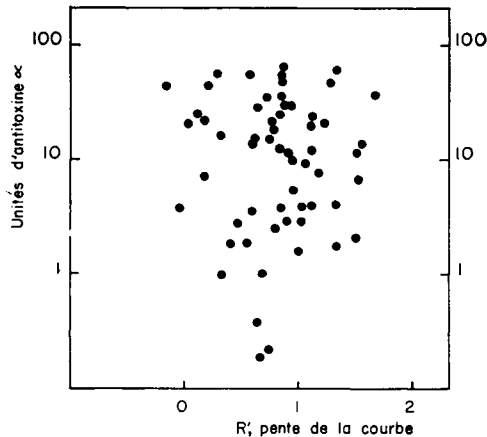


FIG. 9. — Relation entre le titre de l'antitoxine α et la pente de la courbe après la réaction leucocytaire

Ainsi, les différences d'efficacité de la phagocytose ne peuvent être expliquées ni par une différence de précocité de la R.L. par rapport à la croissance bactérienne, ni par une action leucotoxique éventuelle des toxines α et β . Les altérations des leu-

coocytes observées au cours de l'infection ne sont d'ailleurs pas en relation avec le titre des antitoxines α et β . Ces altérations prouvent cependant que l'action principale des staphylocoques, à ce stade, est dirigée vers les leucocytes. L'hypothèse selon laquelle l'efficacité de la phagocytose serait sous la dépendance d'anticorps antileucotoxines non contrôlés paraît assez vraisemblable. L'observation, faite à plusieurs reprises d'une phagocytose efficace en début d'infection, puis cédant brusquement (par exemple fig 5) s'expliquerait dans cette hypothèse par l'épuisement des anticorps intéressés.

III. — Gravité de l'infection

La gravité de l'infection, définie par l'étendue et l'intensité des lésions, résulte de la croissance bactérienne *in vivo* : il faut donc s'attendre à trouver une relation directe entre la croissance et la gravité. En effet, le coefficient de corrélation entre la gravité, définie par les 6 degrés décrits, et $\log m$ est positif ($r_m = + 0,593$ et significatif ($P \leq 0,01$ pour 63 données).

Nous avons déjà montré que la gravité dépend de $At\alpha$, de $At\beta$ et de Q . Cette dépendance pouvait être aussi être exprimée par la corrélation entre chacune de ces données prise indépendamment et la gravité. Les coefficients sont tous significatifs ($P \leq 0,01$) et ont les valeurs suivantes (données transformées en $\log(x + 1)$) :

$$r_a = - 0,479, \quad r_b = - 0,557, \quad r_Q = + 0,344.$$

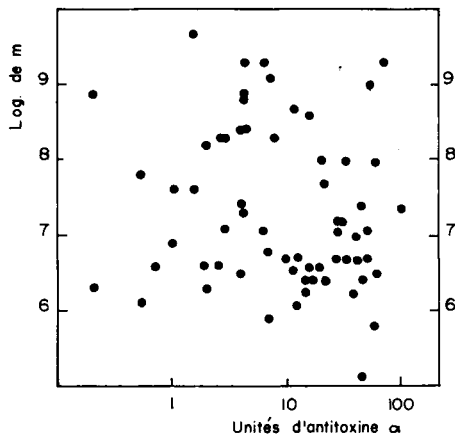


FIG. 10. --- Relation entre le nombre maximum de germes et le titre de l'antitoxine α .

Ces variables : Q , $At\alpha$, $At\beta$, m étant indépendantes entre elles (fig. 10), on peut cependant penser que leur association dans une équation de régression linéaire multiple est susceptible d'améliorer la prédiction de la gravité G . Il est à noter que, si entre $At\alpha$ et $At\beta$ il existe sur l'ensemble des valeurs une relation due au type même de l'expérience, les brebis vaccinées recevant simultanément les toxines α et β , à l'intérieur des groupes α et β sont indépendantes. D'autre part, s'il existe une certaine relation entre m et Q sur les brebis faibles laitières, ceci ne constitue que de très rares exceptions.

Ayant précédemment calculé l'équation de régression linéaire entre G et Q , $At\alpha$, $At\beta$:

$$\hat{G} = b_1Q + b_2At\alpha + b_3At\beta + b_4 \quad (1)$$

nous avons vérifié ce résultat et étudié la liaison entre les résidus $(G - \hat{G})$ et la nouvelle variable m . Le coefficient de corrélation obtenu est de $+0,52$ ($P \leq 0,01$). L'introduction de la nouvelle variable m dans une équation à 4 variables se justifie donc pleinement.

Nous donnons ci-dessous les valeurs des 2 équations de régression et des coefficients de corrélation multiple correspondants.

$$R^2 = 0,499 \quad \hat{G} = + 2,94 Q - 0,91 At\alpha - 0,89 At\beta - 2,587 \quad (1)$$

$$R^2 = 0,654 \quad \hat{G} = + 1,94 Q - 0,86 At\alpha - 0,67 At\beta + 0,69 m - 5,724 \quad (2)$$

A titre indicatif nous avons représenté schématiquement la distribution des écarts de $(G - \hat{G})$ dans les 2 cas (fig. 11). Il est clair que m apporte une amélioration de la prédiction par rapport à l'équation (1) cité précédemment. Les coefficients de régression partielle de l'équation (2) sont significatifs.

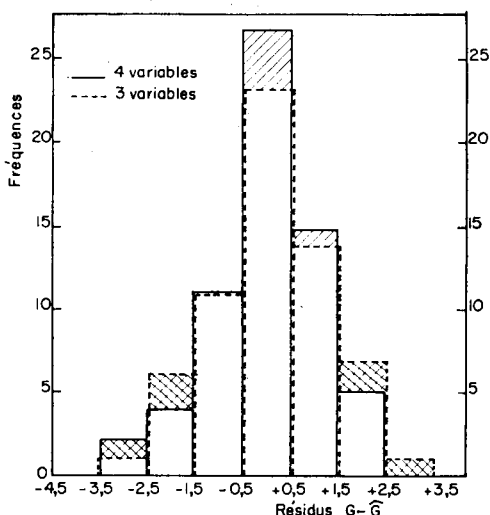


FIG. 11. — Distribution des écarts de $G - \hat{G}$ pour 3 et 4 variables

Ils sont significatifs ($P \leq 0,05$ pour Q et $P \leq 0,01$ pour m , $At\alpha$, $At\beta$ (Test T^2 : respectivement 5,874 ; 11,598 ; 8,018 ; 26,067). On peut par conséquent faire l'hypothèse suivante : la gravité des lésions est fonction de la quantité des toxines α et β produites et non neutralisées par les antitoxines ; la quantité de toxine est elle-même proportionnelle au nombre total de germes existant dans le foyer infectieux, ce nombre étant représenté par le produit $m \times Q$.

Nous admettons qu'il ne faut pas attribuer à une analyse de ce type une valeur absolue, car elle repose au départ sur certaines hypothèses et approximations ; c'est ainsi que dans l'estimation de la gravité en six degrés, il y a nécessairement un élément subjectif qui rend hasardeuse une interprétation rigoureuse et ne permet pas

en particulier d'apprécier si les résidus sont dus à un facteur non contrôlé ou sont simplement dus à des variations aléatoires. Mais les résultats sont cependant suffisamment nets pour assurer que la gravité dépend bien des 4 éléments contrôlés pris séparément.

DISCUSSION

L'évolution de la mammite staphylococique expérimentale de la brebis a lieu en 4 phases successives : une phase de latence ; une phase de croissance bactérienne sans réaction apparente de l'organisme infecté ; une phase de réaction leucocytaire ; une phase lésionnelle.

Pendant la phase de latence, les staphylocoques inoculés dans la mamelle ne se multiplient pas, au moins en apparence. Cette phase dure en moyenne 3 h ; mais elle peut quelquefois atteindre 10 h. Elle correspond naturellement au phénomène très général de latence des cultures microbiennes repiquées dans un milieu neuf. On peut toutefois se demander, en raison de la grande variabilité observée et du retard apparent présenté par certaines cultures (décélé par le taux de croissance anormalement élevé de ces mêmes cultures), si certains mécanismes de défense n'interviennent pas au cours de cette phase. On peut imaginer des phénomènes d'agglutination, des phénomènes d'inhibition, ou des phénomènes résultant de l'intervention de leucocytes préexistants. Concernant ce dernier point, on sait déjà que la présence d'un certain nombre de leucocytes retarde considérablement le développement de l'infection et peut même l'empêcher totalement (PLOMMET, 1960 ; SCHALM, LASMANIS, CARROLL, 1964). Toutefois, si de tels mécanismes existent, ils n'ont qu'un intérêt assez mince : la vaccination avec les antigènes utilisés est sans action sur eux ; les leucocytes ne sont pas normalement présents dans la mamelle saine ; enfin, même en supposant que l'on puisse allonger artificiellement la phase de latence, il ne semble pas, d'après les observations de phases de latence naturellement longues, que ceci puisse modifier l'évolution ultérieure de la croissance microbienne *in vivo*.

Pendant la phase de croissance, d'une durée moyenne de 11 h, les germes se multiplient régulièrement sans rencontrer, semble-t-il, la moindre résistance de la part de l'organisme ; le taux de croissance moyen élevé est déjà en soi un argument ; le fait que la vaccination, qui augmente considérablement la résistance des animaux à l'infection, soit sans action sur le taux de croissance, et que l'évolution ultérieure de l'infection soit sans relation avec ce taux de croissance, sont d'autres arguments de poids. Il n'est pas sans intérêt de remarquer que les brebis les plus médiocres laitières (qui ont aussi une très petite mamelle) présentent des taux de croissance relativement bas, sans que l'on puisse donner à ce fait une explication satisfaisante.

La première réaction décelable de l'organisme, l'arrivée des leucocytes dans le foyer infectieux, caractérise le début de la 3^e phase. Cette réaction a lieu 11,2 h (écart-type 2,8) après le début de la croissance et 3 h (écart-type 1) après que la culture ait atteint le nombre de 40 000 germes/ml ; la réaction leucocytaire est ainsi directement liée à la croissance bactérienne, toutes les brebis réagissant dans des délais assez voisins. Jusqu'à ce stade les animaux ne présentaient pas de différences bien nettes entre eux, qu'ils soient en définitive résistants à l'infection ou non. Par contre, dès le début de la réaction leucocytaire les différences deviennent manifestes :

sur les animaux résistants, la croissance bactérienne est ralentie ou même arrêtée ; il y a stabilisation ou diminution du nombre de germes ; sur les animaux sensibles, au contraire, la croissance des staphylocoques n'est que peu ou pas modifiée, atteignant jusqu'à 6.10^9 germes par ml de culture. Selon toute vraisemblance, la phagocytose représente le mécanisme principal, sinon exclusif, de cette action, de sorte que la résistance à l'infection découle de l'efficacité de la phagocytose. Il est très remarquable que l'efficacité de la phagocytose (mesurée par le ralentissement de la croissance bactérienne après la R.L.) ne dépende d'aucun des facteurs contrôlés dans ces expériences, en particulier du délai de la réaction leucocytaire et du titre des antitoxines α et β .

Enfin, la dernière phase débute avec les premiers signes cliniques, ce qui a lieu d'autant plus tôt par rapport à la R.L. que l'infection sera plus grave : moins de 4 h dans les mammites de gravité 6 ; jusqu'à 24 h dans les mammites de gravité 1. Dans le premier cas la lésion est une gangrène envahissante 48 h après l'inoculation ; à l'opposé, elle est limitée à un petit noyau d'induration. La gravité de l'infection, mesurée par l'importance des lésions, dépend d'une part du nombre total de germes contenus dans le foyer infectieux ($m \times Q$) et d'autre part des quantités d'anticorps anti- α et anti- β existant avant l'inoculation. Ces éléments ne sont sans doute pas les seuls ayant un rôle dans l'établissement des lésions, mais ils sont sûrement les plus importants. La relation que nous avons établie a l'avantage de regrouper en une seule formule pondérée des éléments qui, pris un à un, étaient connus pour avoir une certaine influence sur la gravité ; c'est en particulier le cas de la quantité de lait et du titre de l'antitoxine α (PLOMMET, 1960 ; PLOMMET, LE GALL, 1963). Cette relation a aussi l'avantage de mettre en évidence le rôle de l'antitoxine β ; elle souligne par là le rôle de la toxine β , qu'on avait tendance jusqu'à présent à considérer comme négligeable, à tel point que l'on n'en tenait pas toujours compte dans les travaux de recherche ; la production quasi constante de la toxine β par les souches bovines et ovines avait cependant incité les chercheurs à incorporer l'anatoxine correspondante dans les vaccins expérimentés (PILLET et *al.*, 1959 ; PLOMMET, LE GALL, 1963). Enfin, la relation ainsi formulée fait ressortir le rôle du nombre total de germes contenus dans le foyer infectieux sur l'évolution de l'infection. Ce rôle a encore été souligné récemment par les travaux de GORRILL et McNEIL (1963) sur les causes de mort de la souris inoculée par différentes voies.

L'analyse des phases successives de l'infection laisse entrevoir ou au contraire montre clairement certains des mécanismes de défense de l'organisme. Les premières phases ne semblent pas avoir à cet égard une grande importance ; il serait par ailleurs difficile, dans l'état actuel de nos connaissances, de mettre à profit les mécanismes en jeu pour augmenter la résistance des animaux. Tout au contraire, les mécanismes de la phase lésionnelle paraissent parfaitement clairs ; il y a fort longtemps que l'on met à profit la vaccination par les anatoxines α et β ; en améliorant les conditions de vaccination on peut espérer réduire les séquelles de l'infection à une très petite lésion. Mais il est vraisemblablement impossible — le nombre maximal de germes étant indépendant de $At\alpha$ et $At\beta$ — que cette vaccination puisse donner une immunité complète, telle que tous les germes soient rapidement et entièrement détruits dès le début de la réaction leucocytaire. Les observations faites au cours du développement la réaction cellulaire, en particulier le fait qu'il y a des différences très importantes dans l'efficacité de la phagocytose, bien que sur tous les animaux la R.L. se déclare

sensiblement au même moment de la croissance bactérienne, suggère que les leucocidines (au sens large du terme) ont un rôle primordial à ce stade de l'agression. Il paraît vraisemblable que l'immunité complète pourrait être obtenue par vaccination contre ces substances, sans même qu'il soit nécessaire de vacciner avec les anatoxines α et β , l'efficacité de la phagocytose ne dépendant pas des antitoxines correspondantes.

Le fait que la première réaction décelable de l'organisme apparaisse au moment où la culture atteint un nombre de germes de l'ordre de 10^5 à 10^6 par ml est lié naturellement au niveau du stimulus (40 000 germes/ml) et au délai (3 heures) nécessaires à sa manifestation. Ce fait explique les divergences d'opinion sur la dose minimale infectieuse : pour certains auteurs, il suffit d'un très petit nombre de germes pour déclencher une mammitte expérimentale ; pour d'autres, une dose élevée est nécessaire et, dans ce cas, la gravité de l'infection dépend dans une certaine mesure de cette dose (DERBYSHIRE, 1958). En effet, si l'on injecte un inoculum de 10^7 germes, réalisant dans la mamelle une concentration de l'ordre de 10^5 germes/ml, la R.L. doit se produire rapidement, en 3 heures environ ; à ce moment, l'inoculum sera resté, en raison de la longueur de la phase de latence, à un niveau très proche de 10^5 germes/ml, équivalent à celui qui aurait été obtenu au même stade par rapport à la R.L., avec un inoculum de 10 à 100 germes. De plus, dans le cas d'un fort inoculum, il s'agit de germes en phase de latence, donc sensibles à la phagocytose, alors que dans l'inoculum faible, les germes sont en croissance depuis longtemps et ont déjà produit une certaine quantité de toxines. C'est sans doute pourquoi en définitive de nombreux auteurs concluent à une dose minimale infectieuse égale ou supérieure à 10^7 germes.

Notre méthode d'étude présente un certain nombre d'avantages : inoculum faible simulant une infection naturelle, résultats reproductibles et quantitatifs, prélèvements aisés, échantillons d'un volume suffisant, contrôle de la gravité de l'infection par les anatoxines α et β sans modifications des premiers stades de l'infection. Cette méthode devrait permettre d'étudier avec précision les premières heures, décisives, de l'infection et en particulier d'aborder l'étude du rôle *in vivo* des substances ayant une action antileucocytaire. Nous ne pouvons assurer que ce type d'infection — dans un organe volumineux — peut servir de modèle aux infections staphylococciques en général, mais le rapprochement de nos résultats avec ceux de FOSTER et HUTT, en particulier le fait que ces auteurs observent, après inoculation intradermique à l'homme de quelques staphylocoques, des croissances telles que le phlegmon consécutif à l'inoculation contient 60.10^6 germes/ml après 24 h, est assez suggestif pour permettre d'imaginer une bonne similitude des phénomènes en jeu dans ces deux types d'infection staphylococcique.

Reçu pour publication en septembre 1964.

REMERCIEMENTS

Nous remercions MM. J. POLY et B. VISSAC et M^{me} L. TASSENCOURT du service de Génétique de l'INRA qui ont bien voulu discuter les résultats concernant la gravité et se charger du dépouillement statistique et de la réalisation des calculs sur ordinateurs. Nous remercions aussi M. J. PILLET et M^{me} B. ORTA de l'Institut Pasteur de Garches des discussions fructueuses que nous

avons eues sur ce sujet. Nous remercions enfin M. G. MOCQUOT, directeur de la Station centrale de Microbiologie et Recherches laitières, de l'intérêt qu'il a porté à ce travail et de la révision du manuscrit.

SUMMARY

BACTERIAL GROWTH AND LEUCOCYTOSIS IN THE EXPERIMENTAL STAPHYLOCOCCAL MASTITIS IN EWES

Lactating ewes, some of which had previously received various vaccines (α and β toxoids, δ toxin, cells) have been given intramammary injection of 10 to 100 living cells of staphylococci. All the ewes, save one, developed mastitis, within 24 h. The cases could be classified into 6 clinical categories according to their gravity. Growth of bacteria and consecutive appearance of leucocytes (R.L.) were followed in the successive samples of milk at 8, 12, 16, 20, 24, 36 hours after injection, one by enumeration on agar plates and the other by direct microscopic count. 68 graphs representing the growth of staphylococci and leucocytosis were drawn. They allow to reckon: the length of apparent lag phase (t); apparent maximum growth rate (R), number of bacteria at maximum growth (m), moment of the beginning of leucocytosis (R.L.: $> 250\ 000$ cells per ml), number of germs before and at the R.L., apparent growth rate after R.L. (R').

The evolution of infection is described on four successive phases:

1^o lag phase, average length of which is $t = 3,1$ h (minimum and maximum values 0 and 10).

2^o growth phase of bacteria without any reaction of organism, average length of which is 11,2 h (standart deviation 2,8). The average for the growth rate R is 1,8 (minimum and maximum values 1,1 and 2,9).

3^o phase of reaction characterized by leucocytosis: R.L. starts 3 hours (standart deviation 1) after the microbial growth has reached 40 000 germs per ml.

4^o a clinical phase, when the lesions occur, which takes place from 4 to 24 h after R.L. according to the gravity of infection.

The first two phases, characterized by t and R depend neither on inoculum, nor on quantity of milk at each milking (Q) nor on α and β antitoxin titres (At α , At β). Existence of an inhibitor mechanism, is suggested by variability of t : it has no influence on subsequent evolution of the culture.

During the reacting phase, bacterial growth is stopped, slackened or unaltered according to whether leucocytosis is efficient or not. Efficiency estimated by R' and m depends neither on At α and At β nor on precocity of R.L. in relation with the growth of staphylococci; besides, precocity shows among the animals variations only to a small extent (log of number of germs at the R.L.: $5,8 \pm 0,62$ — standart deviation).

Intensity of lesions in the fourth phase depends significantly on four independent factors: m , Q, At α and At β . These two latter results emphasize part played by phagocytosis in staphylococcal mastitis and the need of control of the leucotoxic substances of staphylococci to obtain complete immunity.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DERBYSHIRE J. B., 1958. The experimental production of Staphylococcal mastitis in the goat. *J. comp. Path.*, **68**, 232-241.
- FOSTER W. D., HUTT M. S., 1960. Experimental Staphylococcal infections in man. *Lancet*, (2), 1373-1374.
- FRAPPIER A., SONEA S., 1956. L'immunité dans les infections staphylococciques. Action de l'antitoxine contre une infection bactérienne expérimentale. *Canad. J. Microbiol.*, **2**, 271-280.
- GLADSTONE G. P., GLENCROSS E. J., 1960. Growth and toxin production of staphylococci in cellophane sacs *in vivo*. *Brit. J. exp. Path.*, **41**, 313-333.
- GORRILL R. H., McNEIL E. M., 1963. Staphylococcal infection in the mouse. The effect of route of injection. *Brit. J. exp. Path.*, **44**, 404-415.
- PILLET J., GIRARD O., DUTHEIL H., ORTA B., 1959. Mammite staphylococcique de la brebis et vaccination locale. *Ann. Inst. Pasteur*, **96**, 591-600.
- PILLET J., ORTA B., PERRIER M., CORRIERAS F., 1962. Étude sérologique de 289 souches de staphylocoques pathogènes isolées de laits de vaches et de brebis. *Ann. Inst. Pasteur*, **103**, 716-727.

- PLOMMET M., 1960. Mammite staphylococcique de la brebis. Infection expérimentale. *Ann. Inst. Pasteur*, **98**, 439-455.
- PLOMMET M., LE GALL A., 1963. Mammite staphylococcique de la brebis. Recherches sur l'immunité antitoxique et antimicrobienne. *Ann. Inst. Pasteur*, **104**, 779-796.
- PLOMMET M., LE GALL A., 1963. Mammite staphylococcique de la brebis. Vaccination locale. *Ann. Inst. Pasteur*, **105**, 535-543.
- RICORDEAU G., MARTINET J., DENAMUR R., 1963. Traite à la machine des brebis *Préalpes du Sud*. Importance des différentes opérations de la traite. *Ann. Zootechn.*, **12**, 203-225.
- SCHALM O. W., LASMANIS J., CARROLL E. J., 1964. Effects of pre-existing Leukocytosis on Experimental Coliform (*Aerobacter aerogenes*) mastitis in cattle. *Amer. J. vet. Res.*, **25**, 83-89.
-