



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Effets de surnageants bactériens sur la phagocytose de *Staphylococcus aureus* par des PMN de bovins

Lambot, Michel

*Award date:*  
1987

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX  
NAMUR  
FACULTÉ DES SCIENCES

---

EFFETS DE SURNAGEANTS BACTERIENS SUR LA  
PHAGOCYTOSE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS PAR  
DES PMN DE BOVINS

Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences  
biologiques  
par

Michel LAMBOT  
Juin 1987

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
Faculté des Sciences  
Rue de Bruxelles, 61  
B - 5000 NAMUR

Tél. 081/22.90.61      Télex 59222 facnam-b  
Téléfax 081/23.03.91

**EFFETS DE SURNAGEANTS BACTERIENS SUR LA  
PHAGOCYTOSE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS PAR  
DES PMN DE BOVINS**

*LAMBOT Michel*

Résumé :

Un test de phagocytose de PMN de bovins en présence de surnageants de culture de cinq souches bactériennes a été mis au point. L'indice phagocytaire était déterminé par comptage de bactéries radiomarquées dans le culot cellulaire après centrifugation différentielle et lavages des cellules. Cette technique nous a permis de mettre en évidence une inhibition de la phagocytose par les surnageants staphylococciques, due à la présence de facteurs cytotoxiques. Par contre, pour les surnageants streptococciques, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer leurs effets limités sur les PMN.

**Mémoire de licence en Sciences Biologiques**

**Juin 1987**

**Laboratoire d'Immunologie**

**Promoteur : Prof. A. DEPELCHIN**

*Je remercie*

*le Docteur DEPELCHIN, Professeur de Microbiologie et d'Immunologie aux F.N.D.P. à Namur, pour son aide et ses conseils ;*

*le Docteur LETESSON, Assistant aux F.N.D.P. à Namur, pour son aide scientifique et technique ;*

*Madame LOSTRIE-TRUSSART du département d'Immunologie aux F.N.D.P. à Namur, pour son aide et ses conseils utiles ;*

*Monsieur DIDEMBOURG et Mademoiselle ALBERT, pour leur collaboration efficace ;*

*Madame VAN VYVE-GENETTE, pour ses conseils dans le traitement statistique des résultats ;*

*Madame DE BOCH KEMPER-HERPELIN, pour son aide amicale ;*

*Madame BODART, pour son aide dactylographique précieuse ;*

*Mademoiselle CULOT, pour sa disponibilité à tout moment.*

## TABLE DES MATIERES

|  | <u>Pages</u> |
|--|--------------|
| - INTRODUCTION   | 1            |
| <br>   |              |
| - GENERALITES  |              |
| 1.1. LA MAMMITE BOVINE   | 3            |
| 1.1.1. Introduction  |              |
| 1.1.2. La glande mammaire saine                                    |              |
| 1.1.3. L'infection de la glande mammaire                           |              |
| 1.2. LES POLYMORPHONUCLEAIRES                                      | 9            |
| 1.2.1. Granulopoièse   |              |
| 1.2.2. Rôle et propriétés des PMN                                  |              |
| 1°) l'infiltration leucocytaire                                    |              |
| 2°) la reconnaissance du micro-organisme par le phagocyte          |              |
| 3°) l'ingestion de la particule                                    |              |
| 4°) la dégranulation et la digestion de la particule               |              |
| 1.3. LES FACTEURS DU SERUM   | 18           |
| 1.3.1. Les anticorps naturels                                      |              |
| 1.3.2. Le complément   |              |
| 1.3.3. Les bactéricidines  |              |
| 1.3.4. La conglutinine   |              |
| 1.4. LA BACTERIE UTILISEE DANS LE TEST DE PHAGOCYTOSE              | 21           |
| 1.4.1. Description   |              |
| 1.4.2. Les caractères généraux                                     |              |
| 1.5. LES SURNAGEANTS BACTERIENS ETUDIES                            | 23           |
| 1.5.1. Staphylococcus aureus                                       |              |
| 1.5.1.1. Description   |              |
| 1.5.1.2. Caractères généraux                                       |              |
| 1.5.1.3. Toxines et enzymes  |              |
| 1.5.2. Les deux espèces de streptocoques                           |              |
| 1.5.2.1. Description   |              |
| 1.5.2.2. Les caractères généraux                                   |              |
| 1.5.2.3. Les substances toxiques et enzymatiques des streptocoques |              |
| 1.5.3. Les impédines   |              |

## - MATERIEL ET METHODES

|   |    |
|---|----|
| 1.1. PRELEVEMENT ET ISOLEMENT DES CELLULES DU SANG                | 29 |
| 1.1.1. Récolte du sang  |    |
| 1.1.2. Préparation des PMN  |    |
| 1.2. CULTURE ET COMPTAGE DES BACTERIES                            | 31 |
| 1.3. PREPARATION DES SURNAGEANTS BACTERIENS ETUDIES               | 32 |
| 1.4. MESURE DE LA RADIOACTIVITE $\beta$ PAR SCINTILLATION LIQUIDE | 33 |
| 1.4.1. Comptage   |    |
| 1.4.2. Principe de la scintillation liquide                       |    |

## - RESULTATS ET DISCUSSION

|  |    |
|--|----|
| 1. MISE AU POINT DU TEST DE PHAGOCYTOSE  | 36 |
| 1.1. Principe de base  |    |
| 1.2. La méthode  |    |
| 1.3. Les conditions du test  |    |
| 1.4. Le temps d'incubation nécessaire pour une incorporation optimale de l'isotope par Staphylococcus aureus |    |
| 1.5. La fiabilité du test  |    |
| 1.6. Exocytose de débris bactériens radioactifs  |    |
| 1.7. La phagocytose avec les bactéries radioactives vivantes ou mortes                                       |    |
| 2. PHAGOCYTOSE EN PRESENCE DE SURNAGEANTS BACTERIENS   | 46 |
| 2.1. Principe général  |    |
| 2.2. Test préalable  |    |
| 2.3. Incubation avec les surnageants streptococciques  |    |
| 2.3.1. Résultats   |    |
| 2.3.2. Discussion  |    |
| 2.4. Incubation avec les surnageants de cultures staphylococciques   |    |
| 2.4.1. Résultats   |    |
| 2.4.2. Discussion  |    |
| 2.4.3. L'effet des surnageants staphylococciques sur la viabilité des PMN                                    |    |
| 2.4.4. L'effet des surnageants staphylococciques sur les bactéries   |    |
| 2.4.5. Neutralisation de la leucotoxicité des surnageants par la chaleur et par l'action d'enzymes           |    |
| 2.4.6. Incubation avec un surnageant traité à la pronase   |    |

## - CONCLUSION FINALE

68

## - BIBLIOGRAPHIE

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

Le polymorphonucléaire neutrophile (PMN) du sang circulant fut découvert il y a plus de deux siècles, par William Hewson (1770), et son rôle dans la défense de l'organisme contre une invasion microbienne fut établi, il y a à peu près un siècle, par Elie Metchnikoff (1890) (Jain N.C., 1976).

Dans le lait, la présence de leucocytes fut reconnue, dès la première partie de ce siècle.

Et c'est seulement depuis peu que son importance dans les mammites, à la fois comme une mesure du degré d'inflammation de la glande mammaire et comme un agent de résistance à l'infection, a été appréciée.

Il constitue avec le macrophage, les phagocytes fonctionnels de la glande mammaire chez le ruminant.

Ensemble, ils représentent 80 à 90 % des cellules présentes dans le lait normal.

Les mamelles de vache, qui ne sont pas infectées par des bactéries pathogènes, contiennent en moyenne 200.000 de ces cellules/ml de lait.

Cependant, puisque ces cellules ont une réduction de leurs capacités phagocytaires quand elles sont présentes dans le lait, plus de 500.000 cellules/ml de lait sont nécessaires pour protéger la glande mammaire contre l'établissement d'une infection bactérienne.

Ce nombre peut être atteint après l'entrée de quelques bactéries pathogènes dans la glande mammaire.

Cependant, un laps de temps de 24 heures est nécessaire avant que de telles concentrations cellulaires soient atteintes.

Malheureusement, ce délai est suffisant pour que les bactéries s'installent et y établissent une mammite infectieuse.

Les défenses non-spécifiques auxquelles les bactéries sont confrontées dans le tissu mammaire peuvent être reproduites in vitro.

Plusieurs techniques efficaces in vitro ont été développées pour évaluer les capacités phagocytaires et bactéricides des PMN :

- examen au microscope optique - de monolayers (Jain et Lasmanis, 1978),
  - d'étalements de phagocytes colorés au Giemsa après incubation avec des bactéries (Van Furth et Van Zwet, 1978)
- estimation de la disparition des bactéries vivantes du milieu d'incubation (Cohn et Morse, 1959)
- spectrofluorimétrie cellulaire après phagocytose de bactéries spécifiquement opsonisées par des anticorps fluorescents (Vray et coll., 1980)
- production de chemiluminescence par des PMN au cours de la phagocytose de bactéries opsonisées (Stjernholm et coll., 1973).



Le test, que nous nous proposons d'utiliser, se base sur le comptage de Staphylocoques ingérés marqués à la thymidine tritiée (Michell et coll., 1969).

Ce mémoire se divisera en trois parties :

- la première partie sera un exposé théorique sur les différents "partenaires" en présence dans le test de phagocytose : PMN, facteurs sériques, bactéries utilisées et surnageants bactériens étudiés,
- la seconde partie décrira la mise au point du test de phagocytose avec des bactéries radiomarquées,
- la troisième partie donnera les résultats de la phagocytose en présence de surnageants bactériens, ainsi que leur interprétation.

Une conclusion finale clôturera ce mémoire.

# GENERALITES

## GENERALITES

Nous allons, dans cette première partie, décrire l'évolution de la mammite bovine. Puis, nous décrirons les différents "facteurs" en présence (cellulaire, bactérien et sérique), dans le test de phagocytose.

### 1.1. LA MAMMITE BOVINE

#### 1.1.1. INTRODUCTION

Le terme générique "mammite" se rapporte à l'inflammation de la glande mammaire quelle qu'en soit la cause.

Il existe plusieurs types de mammite selon le germe infectant :

- la mammite provoquée par *Streptococcus agalactiae* ;
- la mammite staphylococcique ;
- la mammite à *Klebsiella* ; la mammite nocardique ; etc...

Elle se caractérise par des changements physiques, chimiques et habituellement bactériologiques du lait et par des lésions pathologiques du tissu glandulaire.

La mammite apparaît sporadiquement dans toutes les espèces, mais c'est sur le bétail laitier qu'elle acquiert sa véritable importance économique.

Du point de vue des pertes qu'elle engendre, c'est la maladie la plus importante à laquelle est affrontée l'industrie laitière.

Les pertes sont constituées beaucoup moins par une mortalité que par la réduction de la production de lait des quartiers touchés.

La plupart des estimations montrent qu'en moyenne un quartier atteint voit baisser sa production de 30 % (Janzen, J.J., 1970).

En plus de cela, la contamination bactérienne du lait des vaches affectées le rend impropre à la consommation par l'homme.

La fréquence de la maladie, quelle qu'en soit la cause, se situe aux alentours de 40 % de morbidité par rapport au nombre de vaches.

L'importance des bactéries, en tant que cause primitive de la mammite chez les bovins, est encore l'objet de controverses, notamment du fait de leur absence dans pas mal de cas cliniques et de leur présence dans nombre de glandes saines. Cependant, elles sont considérées comme un des facteurs prédisposants à la maladie (comme les conditions de l'environnement par exemple).

Les germes infectants principaux de la glande mammaire sont par ordre d'importance : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* et d'autres streptocoques (Blood et Henderson, 1976).

### 1.1.2. LA GLANDE MAMMAIRE SAINTE

Les PMN et les macrophages représentent environ 80 à 90 % des cellules du lait provenant de mamelles non infectées (Paape et al, 1981).

Ces deux types de cellules, compte tenu de leurs capacités phagocytaires, jouent un rôle important dans la défense de la glande contre une invasion de micro-organismes pathogènes.

Pendant la période de lactation, ce sont les PMN qui sont les plus nombreux tandis qu'en période de tarissement, les macrophages sont les cellules prédominantes.

Ces cellules sont d'origine leucocytaire et donc sont issues de la moelle osseuse.

Au niveau du système vasculaire, les PMN sont distribués en deux pools :

- un pool circulant avec un potentiel de  $100 \cdot 10^9$  PMN matures apte à combattre l'infection (Schalm et al, 1975) et
- un pool marginal de PMN matures de l'ordre de  $68 \cdot 10^9$  PMN qui adhèrent aux parois des vaisseaux sanguins.

Le nombre de PMN matures des deux pools est largement suffisant pour mobiliser des PMN fonctionnels dans le lait et l'importance de cette mobilisation est fonction de l'intensité de l'inflammation et de la force de l'agent chimiotactique.

Cette "compartimentalisation" des PMN est dynamique et les PMN peuvent passer d'un pool à l'autre (Boggs et al, 1975).

A côté de ces deux réservoirs de PMN, un troisième pool de PMN matures et immatures existe au niveau de la moelle osseuse (N.C. Jain, 1976).

### 1.1.3. L'INFECTION DE LA GLANDE MAMMAIRE (VOIR FIGURE NO. 1)

*Streptococcus agalactiae* et *Staphylococcus aureus* pénètrent, dans la glande, par l'orifice d'un des trayons.

Une fois le sphincter du trayon franchi, par l'acte de la mulsion, une bonne partie des bactéries, qui ont pu s'introduire, sont rejetées au-dehors.

Néanmoins, celles qui en réchappent, se multiplient et s'installent rapidement dans le canal du trayon infecté.

Etant donné que les PMN du lait sont de moins bons phagocytes que les PMN du sang, ils ont une tendance amoindrie à empêcher la prolifération des bactéries dans le lait.

Différentes suggestions ont été proposées pour expliquer cette réduction de leurs capacités : une déficience en glycogène (Naidu et Newbould, 1974) ; un pouvoir opsonisant réduit du lait (Wisniowski et al, 1969 - Russel et Reiter, 1975) ; la perte de pseudopodes (Wergin et al, 1977) ; l'interféren-

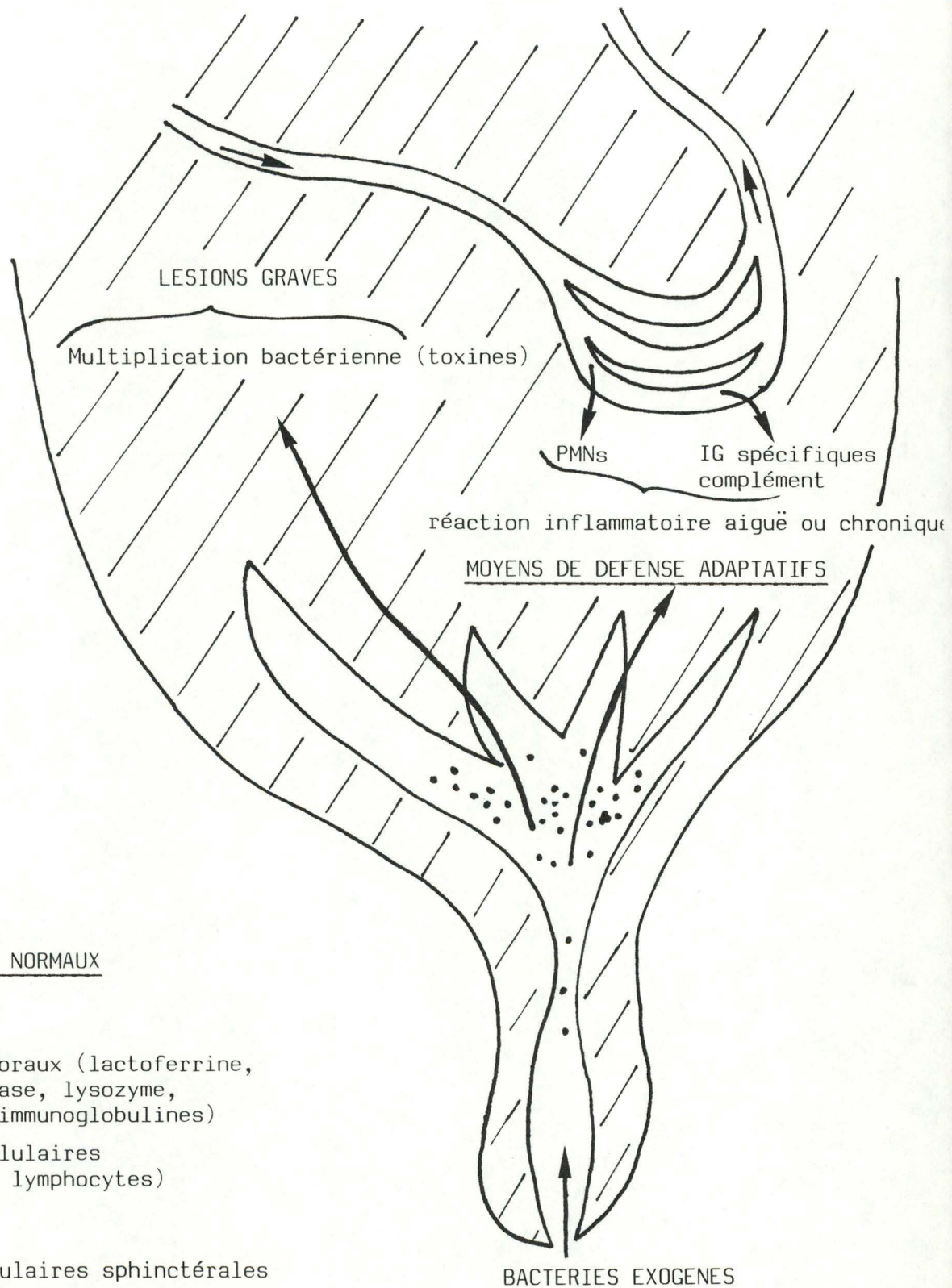


FIGURE NO. 1 :  
MOYENS DE DEFENSE NORMAUX

1. MAMELLE

- . facteurs humoraux (lactoferrine, lactoperoxydase, lysozyme, complément, immunoglobulines)
- . éléments cellulaires (phagocytes, lymphocytes)

2. TRAYON

- . fibres musculaires sphinctérales
- . effet de la traite (desquamation épithéliale, discontinuité de la cloque de lait)
- . lymphocytes sub- et inter-épithélium

ce de certains constituants du lait dans la phagocytose (caséine ou globules graisseux par exemple) (Paape et al, 1977 - Russel et Reiter, 1975) et aussi une moindre activité des enzymes hydrolytiques résultant d'une diminution du pH dans le phagosome (Reinitz et Paape, 1979).

Partant de cette population bactérienne installée, quelques rares germes passent au-travers de l'épithélium aux endroits lésés, par exemple suite à une infection virale, ou suite à l'action mécanique excessive de la machine à traire ou encore suite à une variation de la température et de l'humidité (J.C. Anderson, 1982).

Donc, cette pénétration est à la fois fonction de la capacité du germe à traverser la couche des cellules épithéliales et de la présence d'un défaut dans la membrane basale qui joue le rôle de filtre.

Il existe de grandes différences entre les sujets quant à ce qui se passe ensuite ; on ne connaît qu'imparfaitement les raisons de ces différences, mais il semble qu'elles proviennent de l'état d'intégrité de la muqueuse interne du canal du trayon (Murphy, J.M., 1959).

En général, une fois dans les tissus sous-épithéliaux, ils vont se trouver confrontés aux défenses de l'hôte, qui sont :

- des substances solubles : anticorps, complément lactoferrine, lactoperoxydase, B-lysines ...
- des cellules phagocytaires : PMN et macrophages
- le système lymphatique et le ganglion rétromammaire via lequel les germes non détruits engageront la réponse immunitaire spécifique.

Pour l'heure, celles-ci (les défenses) interviennent dans la réaction inflammatoire qui fait suite à la multiplication des micro-organismes au sein même du tissu glandulaire. Dans certains cas, il se produit un équilibre entre la virulence des germes et les mécanismes de défense de l'hôte, en sorte qu'il n'apparaît qu'une inflammation infraclinique malgré la persistance d'une flore pathogène qui devient permanente.

Elle commence par la dilatation des artérioles et capillaires locaux avec extravasation du plasma ; le liquide d'oedème s'accumule dans la région de la lésion ; la fibrine forme un réseau et occlut les canaux lymphatiques, tendant à limiter la diffusion des germes. Les PMN sortent des capillaires, artérioles par diapédèse, et migrent vers l'agent responsable de la réaction inflammatoire par un chimiotactisme positif créé par divers produits bactériens solubles, de même que par des facteurs activés du complément ( $C_{3a}$  et  $C_{5a}$ ).

En raison du pouvoir phagocytaire réduit des PMN dans le lait, au moins 500.000 cellules/ml de lait (au lieu de 200.000 cellules) sont nécessaires pour prévenir l'établissement d'une infection bactérienne (Schalm et al, 1964 et 1966).

Cependant, un délai d'environ 24 heures est nécessaire entre l'initiation de l'inflammation et l'apparition de cette concentration cellulaire dans le lait (Newbould et al, 1965 - Murphy et al, 1953).

Pendant ce temps, les bactéries y établissent une infection.

Les variations, dans le type de mammite produite (aiguë, chronique, ...), résultent à la fois - de la résistance +/- forte de la mamelle selon l'individu, selon la période de lactation, et  
- de la virulence de la bactérie infectante (Schalm, O.W., 1944).

En général, l'installation d'une mammite apparaît comme une succession de crises constituant le processus d'invasion et d'inflammation de différents lobules de la glande.

Ces crises se situent surtout au cours du premier mois après l'infection initiale et adoptent toujours le même schéma, à savoir : une multiplication bactérienne dans les canalicules lactifères, suivie par un passage des bactéries dans le tissu sous-épithélial, et finalement en réponse, un afflux de PMN dans ces canaux (Pattison, I.H., 1958).

A chaque fois, on observe une réduction de la production de lait car de plus en plus de lobules mammaires sont atteints, et une fibrose plus importante du quartier infecté, aboutissant parfois à l'atrophie.

La majeure partie du bénéfice défensif de la réaction inflammatoire repose sur la phagocytose des bactéries par les PMN du lait. En effet, ils ont un rôle protecteur essentiel contre l'invasion bactérienne au niveau de la glande mammaire.

Cependant, malgré l'abondance cellulaire qui fait suite à l'invasion bactérienne du tissu mammaire et malgré la multitude d'espèces bactériennes potentiellement pathogènes au voisinage de la glande mammaire, l'infection persiste à un degré plus ou moins élevé pendant plusieurs lactations et elle est habituellement le fait d'un petit nombre de souches bactériennes.

Celles-ci (les souches) persistent-elles dans la glande grâce à leur capacité à contrer les défenses de la glande, principalement la phagocytose, par la production de substances chimiques ?

C'est cette hypothèse que nous étudierons dans ce mémoire.

Pour ce faire, nous utiliserons une méthode quantitative, sensible qui a été mise au point au département d'Immunologie des F.N.D.P. (Gallez, 1981). Les conditions optimales de ce test ont été déterminées par la suite et son utilisation sur des PMN de bovins isolés a déjà permis de détecter des différences d'ordre physiologique et d'ordre génétique entre animaux sains (Letesson et al, 1982).



## 1.2. LES POLYMORPHONUCLEAIRES NEUTROPHILES

### 1.2.1. GRANULOPOIÈSE

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) sont produits exclusivement par la moelle osseuse hématopoïétique. La cellule souche médullaire subit, sous l'influence d'un stimulus granulopoïétique (encore mal connu), une différenciation durant laquelle elle donne naissance successivement aux myéloblastes, promyélocytes, myélocytes et finalement aux métamyélocytes.

Ceux-ci, incapables de se diviser, subissent une maturation intramédullaire, au cours de laquelle ils se transforment en PMN.

Durant ce temps de préparation (6 jours pour la différenciation et 6 jours pour la période de maturation), le PMN acquiert la machinerie qui lui permettra d'accomplir les fonctions de la phagocytose.

Un des aspects de cette machinerie est la présence de granules dans le cytoplasme des cellules myéloïdes.

Les protéines synthétisées, au cours des premiers stades de la différenciation (promyélocyte et myélocyte), sont réunies en granules au niveau du Golgi. Ces granules, dits primaires, sont de grande taille, azurophiles (MO) et denses aux électrons (TEM) ; ils contiennent des phosphatases alcalines, une série d'enzymes hydrolytiques typiques des lysosomes, des protéines cationiques de faible poids moléculaire, de grandes quantités de myéloperoxydase et du lysozyme (Fedorko et al, 1966 ; Bainton, 1972).

Dans les derniers stades de la différenciation, la production de granules primaires cesse et des granules, plus petits, moins denses aux électrons, apparaissent. Ce sont les granules secondaires ou spécifiques ; ils contiennent la lactoferrine (une protéine antibactérienne), de la phosphatase alcaline associée à la membrane du granule et du lysozyme (Baggiolini et al, 1970). Si les cellules précurseurs contiennent de nombreuses mitochondries, au cours de la différenciation en PMN matures, leur nombre diminue fortement, les dépôts de glycogène s'accumulent et la glycolyse anaérobie devient la principale source d'énergie. Ceci permet aux PMN d'agir dans les tissus infectés et les exsudats qui sont des milieux hypoxiques (Scott RE et al, 1970).

### 1.2.2. ROLE ET PROPRIETES DES PMN

La principale fonction des PMN est de débarrasser le sang, la lymphe et surtout les tissus, des particules (bactéries, par exemple) et des cellules vieillies. Pour remplir ce rôle, ils sont mobiles et peuvent migrer hors des vaisseaux vers les endroits lésés où ils absorbent et détruisent les débris cellulaires et micro-organismes, par phagocytose.

La phagocytose, prise globalement comme le processus de défense cellulaire non spécifique de l'organisme, peut être subdivisée en plusieurs étapes :

- 1<sup>o</sup>) l'infiltration leucocytaire (PMN et monocytes) vers le foyer inflammatoire en réponse à certains facteurs chimiotactiques ;
- 2<sup>o</sup>) la reconnaissance du micro-organisme pathogène par les phagocytes (phase d'adhérence) ;
- 3<sup>o</sup>) l'ingestion de la particule à l'intérieur du cytoplasme ;
- 4<sup>o</sup>) la dégradation et la digestion de la particule.

Examinons en détail ces différentes étapes :

1<sup>o</sup>) L'infiltration leucocytaire :

La phagocytose nécessite la migration des cellules phagocytaires vers le foyer inflammatoire. L'orientation de ce déplacement résulte d'un gradient de concentration de facteurs chimiotactiques dont certains sont d'origine bactériens (polyosides, par exemple) et d'autres proviennent de l'hôte, citons :

- des facteurs dérivés du complément (C<sub>3a</sub>, C<sub>5a</sub>, etc...)
- des substances libérées de tissus endommagés ou de cellules activées (leucotriènes, lymphokines)
- la kallikréine et le plasminogène - activateur provenant de l'activation du facteur de Hageman.

Du point de vue cellulaire, la réponse migratoire des phagocytes à une inflammation se passe comme suit :

D'abord, les phagocytes circulants s'accolent le long de la surface endothéliale des capillaires ou des veinules postcapillaires qui avoisinent le tissu atteint. Les facteurs responsables de cet accolement restent imprécis.

Ensuite, il y a passage des cellules adhérentes dans le tissu en s'infiltrant au niveau des jonctions interépithéliales.

L'insinuation des cellules polynucléaires entre les cellules endothéliales est facilitée par leur plasticité, due en grande partie à l'aspect plurilobé de leur noyau, avantage que ne possèdent pas les monocytes. C'est pourquoi, les PMN sont, de loin, les cellules majoritaires dans un foyer inflammatoire.

Vus en microscopie optique, les PMN en migration possèdent une frange de cytoplasme périphérique vitreux ou hyalin en apparence et dépourvu d'organelle.

Cet "ectoplasme hyalin" est particulièrement développé dans la direction du mouvement cellulaire où il forme un voile large et fin appelé lamellipode.

Le reste du cytoplasme apparaît plus fluide et les organelles qu'il contient présentent de rapides mouvements vibrationnels (Zigmond et al, 1973)

Observé en TEM, l'ectoplasme hyalin s'avère être composé de fins filaments de 6 nm de diamètre et de particules de glycogène.

Ces microfilaments sont constitués de molécules d'actine et de myosine comparables à celles rencontrées dans le muscle squelettique, ainsi que d'autres protéines contractiles.

Cette constatation a amené l'hypothèse que le coulissage relatif des filaments d'actine et de ceux de myosine à activité ATP asique pourrait être à la base de la motilité cellulaire, et ce sous le contrôle d'ions bivalents ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ) (Pollard TD et al, 1974).

Selon une autre hypothèse, la polymérisation réversible de l'actine pourrait être responsable de l'émission et de la rétraction des pseudopodes (Boxer et al, 1974).

Mais, de toute façon, l'intervention d'un de ces deux systèmes hypothétiques requiert ce que l'on appelle un transducteur pour la transmission des signaux reçus au niveau de la membrane plasmique vers le système contractile.

In vitro, on a constaté qu'une protéine de haut PM appelée "actin-binding protein" joue ce rôle. Cette protéine catalyse l'assemblage des monomères d'actine en filaments et le passage de ceux-ci à l'état hyalin (Stossel et Hartwig, 1976).

Une autre structure cytoplasmique qui semble être importante dans la motilité du phagocyte est le microtubule. Celui-ci est un filament creux de large diamètre (24 nm), composé de dimères de tubuline avec lesquels il est en équilibre dynamique.

Ces microtubules sont localisés dans l'endoplasme des phagocytes mais il a été observé qu'ils s'insèrent dans la région des filaments d'actine à la périphérie cellulaire, particulièrement aux points d'attache de la cellule à la surface d'une particule.

De plus, il a été suggéré que les microtubules, en glissant parallèlement les uns aux autres, pourraient créer une impulsion pour le mouvement cellulaire ; mais également que cette formation de microtubules en des endroits stratégiques de la cellule pourrait fournir une asymétrie et un support à des systèmes acto-myosine (Olmstead et Borisy, 1973).

Pour résumer, aucun modèle définitif ne peut être avancé, expliquant comment l'assemblage, l'arrangement et les mouvements des éléments du cytosquelette peuvent produire le mouvement des phagocytes, ni comment les agents chimiotactiques organisent ce mouvement.

Cependant, l'utilisation de divers traitements tels que :

- . des inhibiteurs de la polymérisation des microfilaments ou des microtubules (cytochalasine ou colchicine),
  - . le C5a, activateur des microtubules,
  - . des agents interférant avec la production d'ATP,
  - . des ions bivalents à différentes concentrations,
- via leurs effets activateurs ou perturbateurs des mouvements cellulaires, ne laissent aucun doute sur l'importance de l'intervention de ces deux structures dans la migration des phagocytes.

## 2°) La reconnaissance du micro-organisme par le phagocyte :

Arrivé au site d'invasion, le phagocyte doit reconnaître et adhérer à la particule avant de la phagocyter. Deux mécanismes ont été proposés pour l'attachement du micro-organisme à la cellule phagocytaire :

- a) l'adhérence non-spécifique
- b) l'adhérence spécifique.

### a) L'adhérence non-spécifique :

Elle est basée sur les caractéristiques physico-chimiques des surfaces de la particule et du phagocyte, telles que structure, charge, hydrophobicité. C'est ainsi qu'un PMN et une bactérie, tous les deux chargés électronégativement, peuvent entrer en contact à condition que leurs charges électriques globales soient différentes et que le premier adhère au second au moyen de prolongements membranaires dont le rayon de courbure est inférieur à 0,1 nm, conditions réalisées par l'émission de pseudopodes (Fenn, 1921).

La température joue un rôle important dans le phénomène d'adhésion. Sa valeur optimale coïncide avec la température normale de l'animal, d'où proviennent les phagocytes.

Par contre, l'adhérence non-spécifique peut avoir lieu dans des limites de PH assez larges : 6,5 à 7,2 ; ce qui explique que les phagocytes continuent à exercer leur fonction dans les foyers inflammatoires où le PH est toujours acide.

b) L'adhérence spécifique :

Elle est basée sur la reconnaissance antigénique du micro-organisme par des anticorps (Ac) spécifiques ou par des facteurs activés du complément.

Cette reconnaissance spécifique comprend deux aspects :

- l'action du sérum sur la particule (bactérie par exemple) et
- l'action de la particule opsonisée sur le phagocyte.

- L'action du sérum sur la particule :

Quand ils sont en concentration suffisante, les Ac se lient directement à la surface de la particule et préparent celle-ci ("opsonisent") à l'ingestion par les PMN et macrophages.

Parmi les Immunoglobulines (Igs), seules les IgG (de classes 1 et 3) sont opsoniquement actives, et tant la portion Fab qui s'attache à la particule que le fragment Fe qui se fixe sur le récepteur membranaire correspondant sont nécessaires.

Ces Ac constituent la fraction résistante à la chaleur (56°C 30 minutes) du pouvoir opsonique du sérum.

En plus de cette fraction, le sérum normal possède une activité opsonique qui est détruite par chauffage à 56°C.

Celle-ci est identifiée aux protéines du complément.

La protéine C<sub>3</sub> est l'opsonine majeure du système complémentaire et elle possède une double voie d'activation (voir 1.3.) au bout de laquelle est clivée en C<sub>3a</sub> (agent chimiotactique) et en C<sub>3b</sub>, fragment peptidique qui opsonise activement la particule en s'y attachant fermement par un lien hydrophobe (Stossel TP et al, 1974).

Les IgG et le C<sub>3</sub> activé sont les opsonines les plus importantes du sérum.

- L'action de la particule opsonisée sur le phagocyte :

Il est maintenant clair que la phagocytose inclut l'encerclement de la particule par la membrane plasmique du phagocyte.

La rigoureuse spécificité qui préside à l'expression de l'activité opsonique (seuls C<sub>3b</sub> et les IgG 1 et 3 sont actifs) suggère que l'ingestion de particules opsonisées met en jeu des molécules situées à la surface des phagocytes et réceptrices pour les opsonines fixées à la particule, quelle que soit la nature du réactant initial sur la surface du phagocyte, son contact avec la particule appropriée a pour conséquence la transmission d'un signal au cytoplasme périphérique.

Celui-ci, de nature encore mal connue, pourrait bien comprendre des nucléotides de purine cyclique tels que l'AMP cyclique ou encore des ions  $Mg^{++}$  et  $Ca^{++}$  dont la présence dans le milieu extérieur est indispensable à l'ingestion de nombre de particules (Sandler et al, 1975 ; Stossel et al, 1970).

### 3°) L'ingestion de la particule :

A de rares exceptions près, l'ingestion est la conséquence normale de la reconnaissance de la particule par la cellule phagocytaire.

Ce processus d'ingestion correspond à l'encerclement de la particule par la membrane cellulaire.

Il présente une similitude avec la migration cellulaire : en effet, au contact de la particule et sous l'action d'un réseau sous-jacent de microfilaments d'acto-myosine, l'ectoplasme hyalin s'étend pour former des pseudopodes. Ces pseudopodes fusionnent du côté distal de la particule, enfermant celle-ci dans une vacuole au sein du cytoplasme (phagosome). Cette étape dépend de la température : de 4°C à 21°C, la fixation n'est pas suivie de l'ingestion et cette inhibition réversible est indépendante du temps de contact entre les particules et la cellule phagocytaire.

De plus, elle requiert de l'énergie qui lui est fournie par l'ATP provenant essentiellement de la glycolyse et de la glycogénolyse chez les neutrophiles et de la phosphorylation oxydative chez les macrophages (Karnovsky, 1962).

### 4°) La dégranulation et la digestion de la particule :

Après la formation du phagosome, les granules primaires et secondaires, guidés par les systèmes de microfilaments et de microtubules, fusionnent avec la vacuole et y libèrent leur contenu. On obtient finalement le phagolysosome à l'intérieur duquel s'accomplit la bactéricidie.

Par des techniques histiochimiques, on a pu montrer que la dégranulation est séquentielle : les premiers granules qui fusionnent avec les phagosomes sont les granules secondaires ou spécifiques (lactoferrine, collagénase, lysozyme et phosphatase alcaline) ; ils sont suivis par les granules primaires (hydrolases, myéloperoxydase, protéines cationiques) (Bainton DF 1973 ; R. PARIDAENS, 1977).

Parfois, on observe une dégranulation extracellulaire du contenu des phagolysosomes qui peut avoir lieu dans le cas d'une fusion incomplète du phagosome ou lorsque la proie n'est pas phagocytée (du fait de sa grande taille, par exemple).

Certaines de ces substances libérées, douées d'une activité chimiotactique, attirent d'autres granulocytes et monocytes, et participent ainsi à la réponse inflammatoire.

Bien que les enzymes hydrolasiques puissent dégrader de nombreux matériaux, y compris ceux des cadavres bactériens, elles ne semblent pas être directement responsables de la mort bactérienne. Celle-ci résulte de divers principes bactéricides contenus aussi dans les lysosomes (Depelchin, 1985 ; Klebanoff, 1980) :

a) le peroxyde d'hydrogène, qui est un agent bactéricide puissant aussi bien par son action directe que par l'intermédiaire du système décrit par Klebanoff (voir figure no. 2).

Sa production débute par la réduction de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde ( $O_2^-$ ). Certains pensent que c'est le  $NADH_2$ , régénéré à partir du  $NADPH_2$  par une transhydrogénase, qui est le donneur d'hydrogène pour l'oxydase qui réduit l'oxygène moléculaire.

D'autres pensent que le  $NADPH_2$  est le donneur direct d'hydrogène pour l'oxydase ; mais dans les deux cas, le  $NADPH_2$  est régénéré via le shunt de l'hexose monophosphate par oxydation du glucose (R. PARIDAENS, 1977).

L'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), qui est bactéricide par lui-même, peut ensuite être réduit par une superoxyde dismutase en  $H_2O_2$  ( $2 O_2^- + 2 H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$ ) ou peut réagir avec de l' $H_2O_2$  déjà formé pour fournir des radicaux hydroxyles  $OH^\bullet$  très réactifs ( $O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^- + OH^\bullet$ ).

Cette dernière réaction se déroule plus souvent en deux étapes en présence de trace métallique ( $Fe^{++}$ ) (Haber et Weiss, 1981).

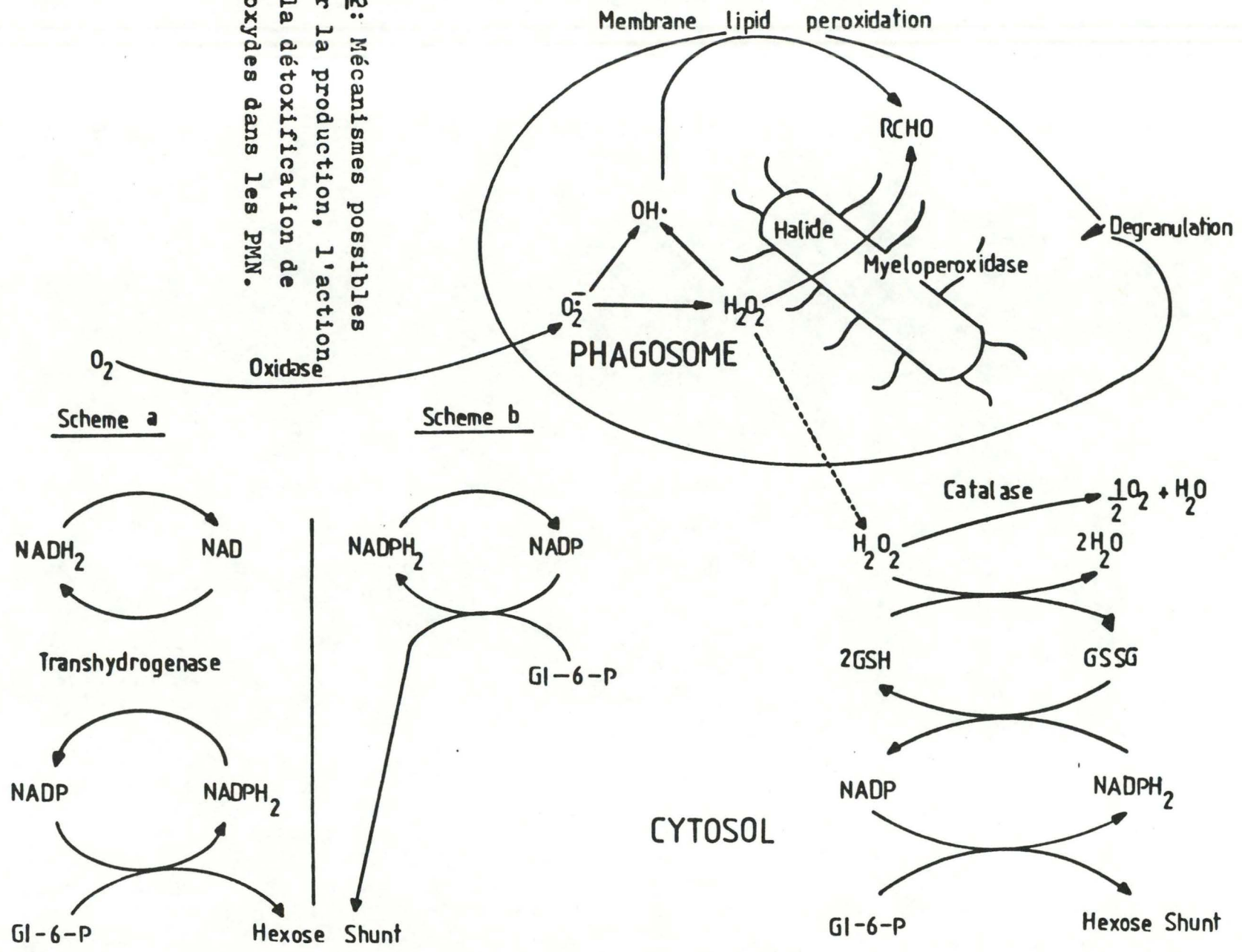
La toxicité d' $H_2O_2$  est nettement accrue en présence de myéloperoxydase (MPO) et d'un halogène (chlore ou iode) parvenant au phagolysosome par simple diffusion.

En effet, l'interaction  $H_2O_2$  - MPO - halogène - bactérie fournit des aldéhydes réactifs, doués d'activités bactéricides propres.

Ce système décrit par Klebanoff (1972) aboutit à une dénaturation protéique irréversible provoquant une inactivation métabolique des micro-organismes phagocytés.

Le peroxyde d'hydrogène et le radical-hydroxyle ( $OH^\bullet$ ) produits, étant capables de peroxyder les lipides membranaires du phagosome ou de diffuser dans le cytoplasme cellulaire, le PMN possède au moins deux mécanismes cytoplasmiques de détoxification, représentés par la catalase et le glutathion (GSH) réduit, dont la régénération est également assurée par la

**FIG. 2:** Mécanismes possibles pour la production, l'action et la détoxification de peroxydes dans les PMN.





voie du shunt de l'hexose monophosphate (Reed PW, 1969 ; Paridaens, 1977).

b) les systèmes oxygène - indépendant (Masson et al, 1969 ; Depelchin, 1985)

- le lysozyme, enzyme cationique de faible PM, attaque les mucopeptides des parois bactériennes gram positives
- la lactoferrine, une protéine possédant un coefficient de liaison au fer très élevé et jouant un rôle ferriprive pour les bactéries
- les protéines cationiques, en s'attachant à la membrane externe de la bactérie, augmentent sa perméabilité et donc sa vulnérabilité.

Finalement, dans le phagolysosome, les corps bactériens morts, comme toute autre cellule ou particule ingérée, pourront alors être digérés par les diverses hydrolases.

### 1.3. LES FACTEURS DU SERUM

#### 1.3.1. LES ANTICORPS NATURELS

Ce sont des anticorps qui sont présents dans le sérum d'individus normaux, en dehors de toute immunisation spécifique post-infectieuse ou post-vaccinale, et qui participeront au pouvoir bactéricide de ce sérum contre des bactéries de la flore commensale et même contre des bactéries pathogènes. Ces anticorps sont présents dès la naissance, par transmission transplacentaire ou colostrale en provenance de la mère.

Leur synthèse par l'individu lui-même résulte d'une stimulation antigénique par les antigènes présents dans la flore bactérienne intestinale ou dans la nourriture.

La présence d'antigènes croisés entre de nombreuses bactéries explique que ces anticorps naturels soient bactéricides pour des bactéries pathogènes auxquelles l'individu n'a jamais été confronté.

#### 1.3.2. LE COMPLEMENT (Hirsh, R.L., 1982)

Le complément est un système biologique complexe, composé de protéines distinctes présentes dans le sang sous forme inactive et qui s'activent en chaîne les unes les autres.

L'activation de ces protéines emprunte deux voies différentes (la voie classique et la voie alterne), qui mettent en oeuvre des facteurs différents, mais qui aboutissent toutes deux au facteur  $C_3$  activé qui est responsable de l'activation d'un tronçon commun à ces deux voies débouchant sur la lyse bactérienne (voir figure no. 3) :

- La voie classique, est activée par des complexes ag-Ac spécifiques ; elle fait intervenir 11 protéines ( $C_{1q}$ ,  $C_{1s}$ ,  $C_{1r}$ ,  $C_2$  ...  $C_9$ ) que l'on peut classer dans trois unités fonctionnelles :
  - . l'unité de reconnaissance composée de  $C_1$  qui alerte le système
  - . l'unité d'activation composée de  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$  qui assure l'activation de l'unité lytique
  - . l'unité lytique composée de  $C_5$ ,  $C_6$ ,  $C_7$ ,  $C_8$ ,  $C_9$  qui débouche sur la lyse bactérienne en agissant sur la membrane cellulaire.
- La voie alterne, ne nécessite pas la présence d'anticorps; elle est activée par des LPS de paroi bactérienne gram négative
  - des PS de membranes de levures et d'érythrocytes de certaines espèces animales
  - des agrégats non spécifiques d'Ig.

Elle fait intervenir un ensemble de protéines qui forme le système de la properdine (d'après le nom d'un de ses éléments).

. La modulation de la voie alterne :

Plusieurs facteurs jouent un rôle inhibiteur et modulateur de la voie alterne, en inactivant les complexes actifs, tels C<sub>3</sub>b.Bb.

Deux inhibiteurs sont connus, le facteur H et le facteur I.

Le facteur H déplace Bb du complexe C<sub>3</sub>b.Bb et le stabilise dans une configuration qui le rend sensible au facteur I.

Le facteur I ou C<sub>3</sub>b.INA est inactivateur de C<sub>3</sub>b, dont il modifie la conformation par rupture d'un lien peptidique interne.

Le C<sub>3</sub>b ainsi modifié est rendu incapable de participer à une nouvelle association avec Bb : on le dénomme iC<sub>3</sub>b

De plus, la constitution de la membrane où se trouve l'inducteur initial, peut aussi intervenir dans la régulation de la voie alterne ; en effet, les acides neuraminiques de la membrane favorisent la liaison des facteurs H et I au C<sub>3</sub>b.Bb fixé sur la membrane, tandis que les surfaces activatrices du système offriraient au C<sub>3</sub>b un site protégé contre l'action de ces deux facteurs inhibiteurs.

- Les effets de facteurs activés du complément sur la cellule peuvent être résumés comme suit (Hirsch, 1982) :

- . un effet chimiotactique du C<sub>3</sub>a, C<sub>5</sub>a et C<sub>5</sub>b<sub>67</sub> pour les leucocytes et un pouvoir de dégranulation des basophiles (libération d'un vasodilatateur, l'histamine) pour les deux premiers facteurs
- . un effet du C<sub>3</sub>b et dans une moindre mesure du C<sub>4</sub>b comme opsonines pour faciliter la liaison du micro-organisme à la cellule phagocytaire
- . un effet sur la mobilité du macrophage par le fragment Bb et Ba du facteur B de la voie alterne
- . une agrégation des PMN in vitro par le C<sub>5</sub>a
- . une libération des enzymes lysosomiaux par le C<sub>5</sub>a qui induit la fusion des lysosomes entre eux, puis avec la membrane cellulaire des PMN, et donc la libération de leur contenu à l'extérieur de la cellule.

### 1.3.3. LES BACTERICIDINES

Ce sont des facteurs trouvés dans le sérum normal, qui exercent une activité bactéricide contre certaines bactéries.

Ces facteurs sont : 1<sup>o</sup>) Le lysozyme, qui a une fonction enzymatique mucolytique pour le mucopolypeptide basal de la paroi bactérienne (la muréine).

Il est produit par les PMN et les macrophages, et est stocké dans les granules lysosomiaux de ces cellules ;

il est actif sur les bactéries gram positives mais pas sur les gram négatives du fait de l'inaccessibilité de la muréine par le lysozyme.

2°) Bêta-lysine d'origine plaquettaire (DM. Donaldson, 1977 ; Depelchin, 1985). C'est une protéine basique de PM 6.000 qui a un effet lytique sur les parois des bactéries gram positives. Elle est stockée dans les granules lysosomiaux des plaquettes sanguines, qui la libèrent au cours de la coagulation.

#### 1.3.4. LA CONGLUTININE (uniquement chez les bovins)

C'est une protéine non immunoglobulinique de PM 750.000. Elle agrège les complexes immuns par l'intermédiaire du complément qu'ils ont fixés.

## 1.4. LA BACTERIE UTILISEE DANS LE TEST DE PHAGOCYTOSE : STAPHYLOCOCCUS AUREUS

### 1.4.1. DESCRIPTION

Le staphylocoque doré est une petite cellule sphéroïde de 1 micron de diamètre disposées en grappes irrégulières. A l'intérieur du cytoplasme finement granuleux, le TEM révèle un réseau compliqué de fibres connectées à des granules denses, identifiés à des microsomes.

Comme tout procaryote, il possède un DNA circulaire sans membrane nucléaire. La bactérie est gram positive.

La paroi caractéristique des gram positives est constituée d'une couche externe et d'une couche interne (voir figure no. 4) :

1°) La couche interne est formée d'un peptidoglycane basal appelé "muréine".

Il s'agit d'un polymère dont les sous-unités sont :

- deux sucres aminés : ac. N acétyl glucosamine (NAcG1)  
                                  ac. N acétyl muramique (NAcM)
- un peptide de 4 ac. aminés : L- alanine  
  ac. D-glutamique  
  L-lysine  
  D-alanine.

La "muréine" forme un réseau en 3 dimensions dont chaque chaîne est formée de l'alternance de NAcG1 et NAcM, avec une liaison amide entre la fonction acide (COOH) libre et le tétrapeptide ; les chaînes étant reliées entre elles par des ponts transversaux de glycyl-glycine aux tétrapeptides respectifs.

La rigidité de cette couche basale est renforcée par la présence d'une couche d'acides téichoïques qui sont des polymères de ribitol-phosphate.

2°) La couche externe est formée d'une simple couche de protéines ou de glycoprotéines, qui agit comme une barrière fonctionnelle contrôlant l'entrée d'éléments extérieurs et la sortie de produits cellulaires internes.

### 1.4.2. LES CARACTERES GENERAUX

Germe ubiquiste, présent dans le milieu extérieur et sur le revêtement cutané-muqueux de l'homme et des animaux, Staphylococcus aureus est l'agent de nombreuses infections, dont les manifestations cliniques en dehors des septicémies sont très polymorphes, à localisations multiples.

Il est capable de fermenter lentement de nombreux sucres (glucose, maltose, mannitol, ...), produisant de l'acide lactique et peu de gaz.

Il a de larges capacités synthétiques, ce qui explique qu'il croît facilement sur milieux usuels, sous conditions aérobies ou micro-aérophiles.

En outre, il est souvent producteur de pénicillinase, qui le protège contre l'action de cet antibiotique. Ce gène de résistance comme beaucoup d'autres est porté par un plasmide qui peut se transmettre par des bactériophages (transduction).

*Staphylococcus aureus* produit un pigment jaune de nature caroténoïde (Zéaxanthine) mais la pigmentation des colonies est extrêmement variable selon la variété de *Staphylococcus aureus* et selon les conditions de croissance (allant du blanc au jaune orangé).

Enfin, il possède une catalase qui le différencie des streptocoques et qui est produite en aérobiose.

L'identification des *Staphylococcus aureus* se fait généralement par des tests de typage phagique.

Les différentes souches de *Staphylococcus aureus* sont classées en variétés,

- sur base :
- de leurs différences dans la susceptibilité aux phages
  - de leurs composants antigéniques de la paroi cellulaire
  - de leurs caractéristiques biochimiques (telle que la coagulation du plasma bovin)
  - de leur exigence nutritionnelle.

## 1.5. LES SURNAGEANTS BACTERIENS ETUDIES

De nombreux micro-organismes voient leur virulence liée au fait qu'ils sont capables de contrer les défenses de l'hôte par la production de substances chimiques. Ces substances peuvent soit agir au niveau de l'hôte en provoquant des dommages cellulaires ou humoraux dont profitent les bactéries pour s'installer (ces substances sont appelées agressines), soit inhiber les défenses de l'hôte en agissant principalement sur les différentes étapes de la phagocytose (impédines).

Dans le premier cas, ce sont principalement des enzymes bactériennes (coagulase, hyaluronidase ...).

Cependant, les troubles pathologiques faisant suite à une infection sont en majeure partie le résultat de l'action sur l'organisme de "poisons" bactériens spécifiques (appelés toxines).

On distingue deux types de toxines :

- celles qui diffusent dans le milieu (exotoxines) et
- celles qui sont liées au corps bactérien lui-même (endotoxine).

L'importance des exotoxines bactériennes dans la virulence est variable : en effet, pour certaines bactéries, la pathogénicité repose entièrement sur une exotoxine unique sans laquelle il n'y aurait pas de maladie (pour le tétanos, par exemple).

Tandis que dans les cas les plus nombreux, la pathogénicité est supportée à la fois par le caractère invasif de l'agent pathogène et par sa production de toxines et d'agressines dans les foyers de l'invasion bactérienne. C'est le cas des infections pyogènes causées par des Staphylocoques et des Streptocoques.

De plus, quelques exotoxines bactériennes ont un mode d'action intracytoplasmique. Ces toxines sont constituées de deux chaînes peptidiques, associées par des liaisons covalentes.

Ces deux chaînes sont fonctionnellement différentes :

- l'une se lie à un récepteur sur la cellule-cible et est appelée composant B (Binding component) et
- l'autre catalyse dans le cytoplasme certains événements métaboliques dommageables pour la cellule et est appelée composant A (Active component).

D'autres exotoxines bactériennes ont une action enzymatique sur la membrane cellulaire même, qu'elles désorganisent ; c'est le cas des hémolysines staphylococciques et streptococciques. Signalons qu'à part chez les Streptocoques B-hémolytique (Streptococcus pyogènes, par exemple) dont les hémolysines ont un pouvoir cytopathogène important, les hémolysines d'autres bactéries ne jouent qu'un rôle incertain dans leur pathogénicité.

D'autres encore se fixent spécifiquement sur des récepteurs de cellules bien précises sans entraîner d'altération membranaire, ni cytoplasmique de ces cellules-cibles. C'est le cas de la toxine botulinique sur la plaque motrice des fibres musculaires.

En guise de conclusion, on peut dire qu'une souche bactérienne sera d'autant plus virulente qu'elle possèdera de facteurs essentiels pour son invasivité.

Les différentes souches étudiées font partie de la famille des Micrococcaceae à gram positive ; ce sont trois variétés de *Staphylococcus aureus* (Human écovar, Ovine écovar et Bovine écovar) et deux espèces de *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae* et pyogènes) que nous passerons successivement en revue.

#### 1.5.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

##### 1.5.1.1. DESCRIPTION (voir 1.4.1.)

##### 1.5.1.2. CARACTERES GENERAUX (voir 1.4.2.)

##### 1.5.1.3. TOXINES ET ENZYMES

*Staphylococcus aureus* représente un pathogène potentiel, entraînant des affections à allure pyogène multiformes : abcès, méningites, mammite staphylococcique de la vache, etc...

Elle peut produire des maladies à la fois, par son aptitude de multiplication et de grande diffusion dans les tissus, et par la production d'une trentaine de substances extracellulaires dont la plupart sont des toxines et des enzymes.

Ci-dessous, nous décrirons brièvement quelques facteurs pathogènes les plus communément rencontrés chez les trois variétés de *Staphylococcus aureus* étudiées :

- la coagulase, sécrétée par les Staphylocoques pathogènes qui, en conjonction avec des facteurs accessoires plasmatiques, provoque la coagulation du plasma, ce qui constitue une barrière contre la phagocytose ;
- l'hémolysine Alpha qui est produite par les Staphylocoques d'origine humaine ; il s'agit d'une exotoxine douée d'un triple pouvoir : hémolytique, dermonécrotique et léthal ;
- l'hémolysine Bêta qui est élaborée principalement par les souches bovines ; elle possède un effet hémolytique et toxique ; d'autres hémolysines (Gamma et Delta) ont été isolées mais sont d'un intérêt secondaire ;



- la leucocidine non-hémolytique qui provoque la décharge du contenu lysosomal dans le cytoplasme du leucocyte, entraînant la mort de la cellule ; notons que les hémolysines Alpha et Bêta ont aussi une action toxique sur les leucocytes ;
- l'entérotoxine qui est la cause principale de symptômes observés (diarrhées, vomissements ...) chez l'homme au cours des intoxications alimentaires dues au Staphylocoque ;
- autres substances extracellulaires produites par les Staphylocoques : une hyaluronidase ou facteur de diffusion ; une staphylokinase responsable de fibrinolyse ; des protéinases, des lipases et une pénicillinase.

## 1.5.2. LES 2 ESPECES DE STREPTOCOQUES

### 1.5.2.1. DESCRIPTION

Le Streptocoque est une petite cellule sphéroïde de 0,6 à 1,2 micron de diamètre, immobile (comme le Staphylocoque).

Ce sont des coques se disposant selon le cas en paires, en tétrades ou en chaînettes de longueur variable, mais jamais en amas.

La majorité des variétés des groupes A et C produisent des capsules composées d'acide hyaluronique ; elles empêchent la phagocytose.

Il possède une paroi analogue à celle décrite pour les Staphylocoques puisqu'il est aussi gram positive ; cependant, il y a plusieurs facteurs antigéniques au niveau de cette paroi, qui sont caractéristiques des Streptocoques, notamment :

- une substance "C" de nature polysidique, thermostable, située dans la paroi et qui est l'antigène spécifique du groupe ; ce polyside est à la base de la classification sérologique des Streptocoques (classification de Lancefield)
- une substance "M" de nature protéique, thermostable, située plus en surface et qui est l'antigène spécifique de type
- une substance "T" de nature protéique, thermolabile, située en surface et commune à plusieurs types
- une substance "R" de nature protéique, située également en surface et que l'on trouve chez certains Streptocoques du groupe A
- et, finalement, une substance "P" de nature nucléoprotéique.

#### 1.5.2.2. LES CARACTERES GENERAUX

Les Streptocoques font partie de la flore commensale normale de la bouche et du rhinopharynx.

Etant moins résistants dans le milieu extérieur que les Staphylocoques, ils sont surtout disséminés par les particules de salive d'animaux porteurs, et rarement par des aliments contaminés.

La plupart de ces germes se cultivent difficilement sur milieux usuels car ils sont exigeants en facteurs de croissance (acides aminés, vitamines du groupe B, CO<sub>2</sub> 5 %).

Ils sont caractérisés par le fait qu'ils n'ont que la fermentation des sucres comme système métabolique producteur d'énergie. La respiration aérobie leur est impossible puisqu'ils ne possèdent pas d'enzymes contenant de l'hème (cytochromes, catalase ou peroxydase). Aussi, même en aérobiose, tirent-ils leur énergie de la fermentation des carbohydrates.

Les trois espèces étudiées dans ce travail font partie du genre Streptococcus. Ce genre est très hétérogène et se subdivise en d'assez nombreuses espèces qui peuvent être classées en quelques groupes, d'après leurs caractères communs.

La méthode de classification la plus précise est celle qui se base sur leurs antigènes pariétaux.

Ainsi, Streptococcus pyogènes, qui est l'agent pathogène responsable d'un grand nombre d'infections humaines, fait partie du groupe A car il a l'antigène "C" spécifique de ce groupe ; en outre, dans ce groupe, on distingue 60 types différents sur base de la protéine "M" qui varie au sein du groupe A.

Streptococcus agalactiae (d'origine animale), qui lui est connu depuis longtemps comme l'agent principal de la mammite streptococcique, est inclus dans le groupe B ; ce groupe comprend 5 types différents sur base du polysaccharide pariétal "S".

#### 1.5.2.3. LES SUBSTANCES TOXIQUES ET ENZYMATIQUES DES STREPTOCOQUES

Elles sont au nombre d'une vingtaine.

Nous allons passer en revue les principaux facteurs de virulence des Streptocoques en général, comme nous l'avons fait pour les Staphylocoques :

- les hémolysines streptococciques ou streptolysines :

- . d'abord, la streptolysine O (neutralisée par oxydation) est une hémolysine active sur les globules rouges de l'homme et du mou-

ton aussi mais elle exerce ses activités bactéricides et bactériolytiques sur d'autres cellules, notamment les granulocytes et les macrophages ; elle est sécrétée par des Streptocoques des groupes A, C et G ;

- . ensuite, la streptolysine S (stable en présence d'oxygène) est une hémolysine très active et très toxique sur les globules rouges mais aussi sur divers types cellulaires ; elle semble aussi être responsable de l'effet leucotoxique après phagocytose des Streptocoques en question (des groupes A, C et G) ;
- une NADase, qui libère le nicotinamide du NAD ; elle possède un effet marqué sur le métabolisme mitochondrial et peut être leucotoxique ;
- autres substances extracellulaires produites par les Streptocoques : une hyaluronidase ou facteur de diffusion ; une streptokinase responsable de fibrinolyse, la protéinase streptococcique, la streptodornase qui dépolymérise l'ADN dans les exsudats purulents, et une toxine (la toxine érythrogène) responsable de l'éruption qui apparaît dans la fièvre scarlatine.

1.5.3. A côté de ces substances entraînant au niveau de l'hôte un dommage dont profitent les bactéries pour l'envahir, des facteurs bactériens, sans effet toxique pour l'hôte, inhibent ses défenses en agissant principalement sur les différentes étapes de la phagocytose. Le Professeur Alan Glynn les a appelés des Impédines.

Certaines peuvent inhiber le chimiotactisme des polynucléaires vers le foyer inflammatoire ; par exemple, les streptolysines streptococciques lytiques pour les phagocytes qui inhibent à très faible concentration l'afflux massif de leucocytes dans le site d'infection sans effet sur la viabilité de ces cellules (Cedric A. Mims, 1977).

D'autres, portées à la surface de la bactérie, contrarient l'absorption et/ou la digestion de celle-ci par le phagocyte. Il peut s'agir de composants de la paroi bactérienne elle-même ; par exemple, la protéine M des Streptocoques ; ou encore la protéine A de *Staphylococcus aureus* qui, en s'attachant au fragment Fc des IgG, empêche de ce fait la fixation de ces IgG sur leur récepteur au niveau de la membrane du phagocyte.

Dans d'autres cas, il s'agira de capsules qui entourent la paroi bactérienne ; par exemple, les polysaccharides capsulaires des pneumocoques.

Mentionnons également la coagulase liée ou "clumping factor" qui précipite la fibrine en une mince couche à la périphérie de la bactérie, perdant ainsi son caractère étranger pour les phagocytes.

Enfin, une fois phagocytées, certaines bactéries évitent leur destruction intracellulaire. La nature de leur résistance est souvent inconnue, si ce n'est qu'elle dépend de constituants de leur surface externe. Dans ce cas, non seulement elles survivront dans le phagocyte, mais souvent elles s'y multiplieront.

THE  
MUSEUM  
OF  
ART  
AND  
ARCHITECTURE

STUDY  
OF  
THE  
ART  
AND  
ARCHITECTURE

## MATERIEL ET METHODES

### 1.1. PRELEVEMENT ET ISOLEMENT DES CELLULES DU SANG

#### 1.1.1. RECOLTE DU SANG

Le sang veineux utilisé provient de vaches appartenant à la race bleu blanc belge. Il est récolté à la veine jugulaire, soit à l'abattoir de Namur au moment de leur abattage, soit à l'étable de deux exploitations agricoles privées de l'agglomération namuroise.

45 ml de sang sont récoltés dans des tubes stériles contenant 5 ml de Tp P04 0,0132 M NaCl 0,7 % pH 6,8 + EDTA 1,5 %.

L'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) est un sel bisodique chélateur de calcium, élément indispensable au processus de coagulation.

#### 1.1.2. PREPARATION DES PMN

La méthode utilisée est empruntée à Carlson et Kancko (1973) :

- centrifuger le sang à 3.200 rpm pendant 15 minutes
- écarter le surnageant (plasma), le buffy-coat (cellules monoclueées) et la partie supérieure du culot (GR uniquement)
- soumettre le culot (PMN + GR) à un choc osmotique en y ajoutant 20 ml d'eau distillée stérile pour lyser les GR ; agiter modérément pendant 45 secondes
- restaurer l'isotonicité par 10 ml de PBS 10 fois concentré
- centrifuger à 1.200 rpm pendant 10 minutes et éliminer le surnageant par aspiration
- laver le culot deux fois par 40 ml de PBS stérile pour éliminer tous les restes de la lyse des GR
- après numération des PMN sur plaque de Thoma, ajuster la concentration cellulaire à  $1,5 \cdot 10^7$  PMN/ml de PBS ; ensuite, prélever un aliquot et diluer le volume/volume avec une solution d'éthidium bromide - acridine orange (dont la préparation est décrite ci-contre, tableau no. 1) ; déterminer la viabilité, par comptage, des cellules vivantes (qui apparaissent vertes) et des cellules mortes (qui apparaissent rouges) au microscope à fluorescence.

On obtient, avec cette méthode, plus de 90 % de PMN avec une viabilité comprise entre 95 et 100 %.

Le temps de cette manipulation (lyse, lavage, comptage) est d'environ 90 minutes.

Toutes les solutions employées sont rendues stériles par autoclavage à 121°C, pendant 20 minutes, sous deux atmosphères.

Toute la verrerie l'est, après passage au four à 180°C, pendant cinq heures. Les pipettes possèdent en plus un embout en ouate pour éviter toute contamination lors de leur utilisation.

## 1.2. CULTURE ET COMPTAGE DES BACTERIES

Une souche de *Staphylococcus aureus*, conservée à 4°C, est réensemencée tous les mois sur milieu 869 gélosé en boîte de Petri.

Dix-huit heures avant le test de phagocytose, un repiquage se fait stérilement dans 50 ml de 869 liquide (voir ci-contre, tableau no. 2) en bain agité à 37°C. Ce repiquage se fait à l'aide d'un fil de platine qui sert à prélever un fragment d'une colonie bactérienne et à le transférer en milieu liquide.

Après dix-huit heures, on examine au microscope optique, par coloration au bleu de méthylène, la pureté de la culture.

On vérifie la densité bactérienne par une mesure de DO à 650 nm au spectrophotomètre.

Ensuite, on ajoute 2 ml de la suspension bactérienne dans 10 ml de bouillon glucosé avec 50  $\mu$ l de <sup>3</sup>H-méthyl thymidine (activité spécifique = 2,0 Ci/mmol.)

Pour favoriser l'incorporation de l'élément radioactif par les bactéries, on utilise un bouillon glucosé à la place d'un milieu 869 liquide qui lui contient des bases pyrimidiques froides.

La suspension est incubée deux heures à l'étuve à 37°C, sur agitateur rotatif (20 rpm).

Ensuite, elle est centrifugée à 4.500 rpm, pendant 15 minutes, à 4°C.

Le culot bactérien est lavé deux fois en PBS stérile à la même vitesse pour éliminer toute trace de milieu nutritif et de radioactivité résiduelle.

Les bactéries sont alors resuspendues dans du PBS froid jusqu'à la densité optique de 0,248 au spectrophotomètre (à 650 nm). Un étalonnage préalable de celui-ci a indiqué que cette densité optique correspondait à +/- 1,5 10<sup>8</sup> bactéries/ml. Cette suspension bactérienne est gardée à 4°C jusqu'au moment du test proprement dit. Un contrôle de cette densité bactérienne est chaque fois effectué par numération bactérienne.

Celle-ci est réalisée par Plate Count sur gélose nutritive (869 solide) en boîte de Petri,ensemencée à l'aide d'un râteau, après avoir dilué 10<sup>5</sup> fois la suspension bactérienne à déterminer.

Le râteau est gardé stérile par trempage et flamage dans l'alcool, juste avant son emploi.

Après une incubation de 18 heures à 37°C, on compte le nombre de colonies formées sur l'entièreté de la boîte de Petri.

Ce nombre, tenant compte des différentes dilution, donne le chiffre exact de bactéries vivantes dans la suspension considérée.

Le tableau ci-contre donne la composition du PBS, du 869 utilisé et du bouillon glucosé.



### 1.3. PREPARATION DES SURNAGEANTS BACTERIENS ETUDIES

Les différentes souches de bactéries utilisées nous ont été données par le Professeur Peeters de Gand (R.U.G.).

Pour chacune de ces souches, nous procédons de la même façon excepté pour les conditions d'incubation : ainsi, nous utilisons un bain agité à 37°C en condition aérobie pour les trois variétés de Staphylocoques, tandis que pour les deux espèces de Streptocoques, l'incubation se fait à 37°C sous CO<sub>2</sub> 5 % sans agitation.

A partir d'un isolement sur boîte de Petri, une culture de 18 heures s'effectue dans 50 ml de milieu RPMI (dont la composition est décrite ci-contre, tableau no. 3). Nous choisissons le milieu RPMI car il contient suffisamment d'éléments nutritifs pour satisfaire l'ensemble des souches bactériennes utilisées et aussi parce qu'il est connu pour son inocuité sur les cellules.

Après 18 heures, nous examinons au microscope optique, par coloration au bleu de méthylène, la pureté de la culture. Il ne peut exister de contamination.

Ensuite, un aliquot de 1 ml de cette suspension bactérienne est ajouté à +/- 300 ml de milieu RPMI.

A différents temps d'incubation (24, 48 et 72 heures), nous prélevons et centrifugeons à 4.500 rpm, pendant 15 minutes à 4°C, +/- 90 ml du milieu de culture, pour éliminer les bactéries du milieu. Ensuite, nous filtrons (filtre disque durapore de Millipore - 0,22  $\mu$ ) le surnageant pour la même raison.

Avant de le conserver à -25°C, nous mesurons le pH et, pour l'ensemble des surnageants bactériens étudiés, il varie entre 6,8 et 7.

## 1.4. MESURE DE LA RADIOACTIVITE $\beta$ PAR SCINTILLATION LIQUIDE

### 1.4.1. COMPTAGE

Au cours du test de phagocytose, les aliquots des différents temps sont placés dans des fioles milli-6 (Lumac).

Ensuite, nous ajoutons 4 ml d'Aqua luma (solvant + scintillant) de la firme Lumac.

Nous passons alors les fioles au compteur  $\beta$  (Beckman LS-1801) après vortexage.

### 1.4.2. PRINCIPE DE LA SCINTILLATION LIQUIDE

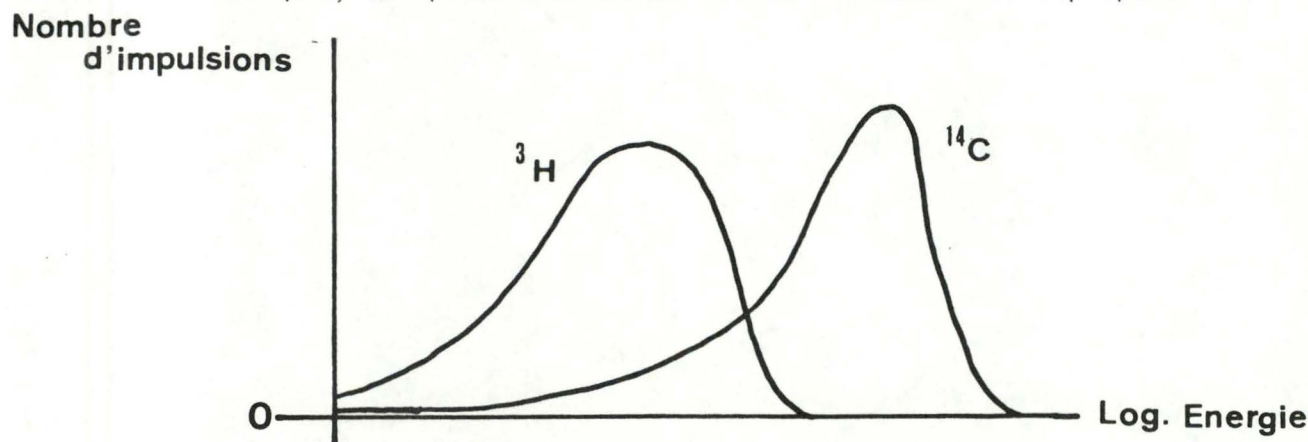
Le comptage à scintillation liquide se base sur la mesure de la lumière émise par des photons provenant d'atomes qui ont été excités directement ou indirectement par les rayonnements Bêta, c'est-à-dire par des électrons.

Chaque isotope  $\beta$  émet des électrons qui ont des énergies cinétiques différentes.

Ainsi, la distribution de ces différentes énergies donne naissance à un spectre d'émission des électrons.

Ce spectre a une énergie maximale et une énergie moyenne caractéristiques de l'isotope utilisé.

Exemple, le spectre du Tritium et du  $^{14}\text{C}$  (en superposition)



| Isotope         | Energie maximale | Energie moyenne |
|-----------------|------------------|-----------------|
| $^3\text{H}$    | 18 Kev           | 55 Kev          |
| $^{14}\text{C}$ | 159 Kev          | 49 Kev          |

Le Tritium et le  $^{14}\text{C}$  sont les isotopes radioactifs de l'Hydrogène et du Carbone, éléments de base pour tous les composés organiques.

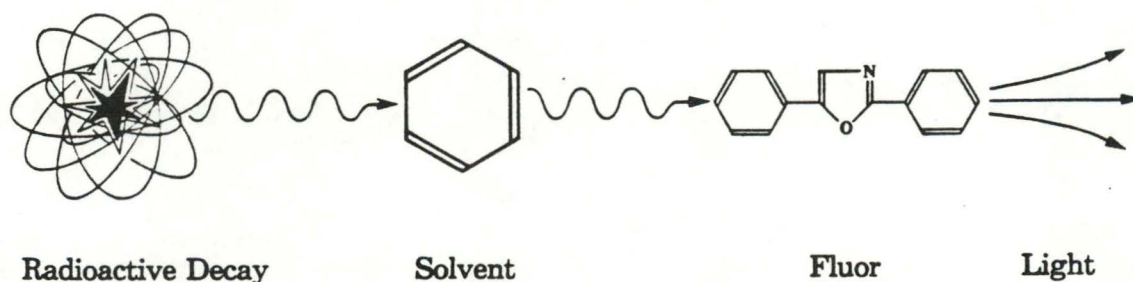
Une fois, la substitution de l'Hydrogène, par le Tritium réalisée, et du fait d'un faible pouvoir pénétrant de la radiation  $\beta$ , la détection et la quantification de cet isotope est impossible.

L'échantillon radioactif est alors combiné avec un "cocktail à scintillation", qui habituellement contient un solvant, un émulsifiant et un scintillant primaire (2,5 - Diphenyloxazole, par exemple).

Ce cocktail sert à convertir l'énergie cinétique des électrons émis par l'isotope  $\beta$  en énergie lumineuse qui est détectée par le compteur à scintillation liquide.

Cette lumière est le résultat d'interactions décrites ci-dessous :

- . Une partie de l'énergie des électrons est absorbée par les molécules du solvant (toluène ou xylène, par exemple), qui sont à leur tour dans un état d'excitation.
- . Cette énergie d'excitation est transférée aux autres molécules du solvant pour finalement aboutir aux molécules du scintillant qui émettent des photons en retournant à leur état initial.



Si la lumière émise à partir du premier scintillant n'est pas dans la bonne gamme de longueur d'onde pour le photomultiplicateur, un second scintillant peut être ajouté au cocktail. Il absorbera l'énergie venant du premier scintillant et la réémettra sous forme de photons de longueur d'onde plus élevée.

Ceux-ci sont collectés par une cellule photoélectrique appelée photomultiplicateur qui convertit cette mesure du photon en une mesure électrique.

Il fonctionne comme suit :

Sous l'action des photons, une photocathode émet de  $e^-$  ; ces  $e^-$  sont attirés par la dynode suivante (ou électrode intermédiaire) qui se trouve à un potentiel plus positif que la photocathode. Les  $e^-$  ainsi accélérés vont frapper la dynode et être réémis en plus grand nombre. Ils sont attirés par la dynode suivante et ainsi de suite jusqu'à l'anode.

Enfin, les impulsions provenant des photomultiplicateurs sont additionnées puis amplifiées afin d'être comptées comme coups par l'appareil.

On constate que du rayonnement  $\beta$  initial à l'impulsion électrique mesurée, de nombreuses pertes interviennent à différents niveaux.

On appelle dès lors :

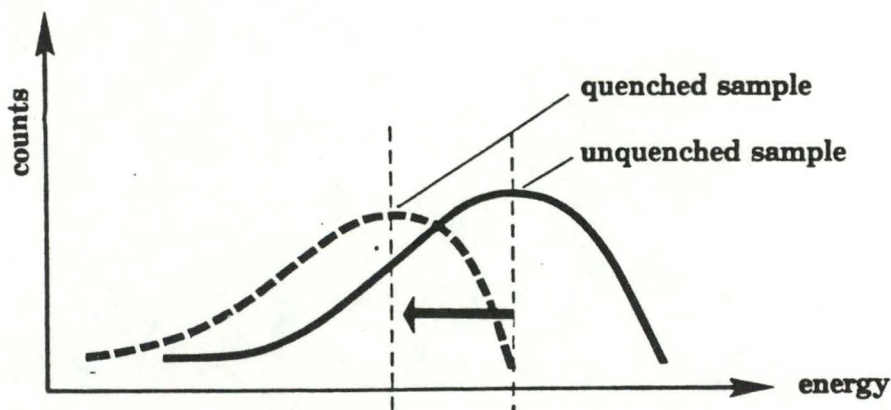
- cpm, le nombre de coups par minute indiqué par l'appareil de comptage
- dpm, le nombre de désintégrations par minute des atomes radioactifs
- l'efficacité d'un comptage, le rapport  $\frac{\text{cpm}}{\text{dpm}}$

Tous les phénomènes qui tendent à affaiblir l'efficacité portent le nom de "quenching".

Par exemple, l'énergie d'excitation électronique, plutôt que d'être réémise sous forme de photons, est convertie en énergie de vibration qui se dissipe en chaleur, soit spontanément, soit au cours de collisions ou de réactions avec des molécules voisines.

Le "quenching" peut aussi provenir de la présence de substances étrangères au sein de la solution scintillante. Certaines impuretés du solvant ou des substances scintillantes, de même que certains éléments de l'échantillon à compter, désactivent les molécules excitées du solvant, captent l'énergie à leur profit et la réémettent sous une forme non radioactive et dégradée, souvent sous forme de chaleur.

Les conséquences des différentes formes de "quenching" sont à la fois une réduction du nombre d'impulsions enregistrées à la sortie du photomultiplicateur, et une diminution de l'amplitude de ces impulsions.



Notons que tous les échantillons radioactifs sont "quenchés" à des degrés variables.

---

DISCUSSION

---

PRESENTATIONS

---

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. MISE AU POINT DU TEST DE PHAGOCYTOSE

#### 1.1. PRINCIPE DE BASE

Le taux de phagocytosé dans un mélange connu de PMN + bactéries + sérum est déterminé indirectement par comptage du nombre de bactéries radiomarquées présentes dans les PMN après un temps d'incubation (tx).

Pour chaque test, ce mélange est centrifugé immédiatement après sa préparation et le surnageant indique le nombre de cpm initial (to).

Le % de bactéries phagocytées au temps tx est égal à :

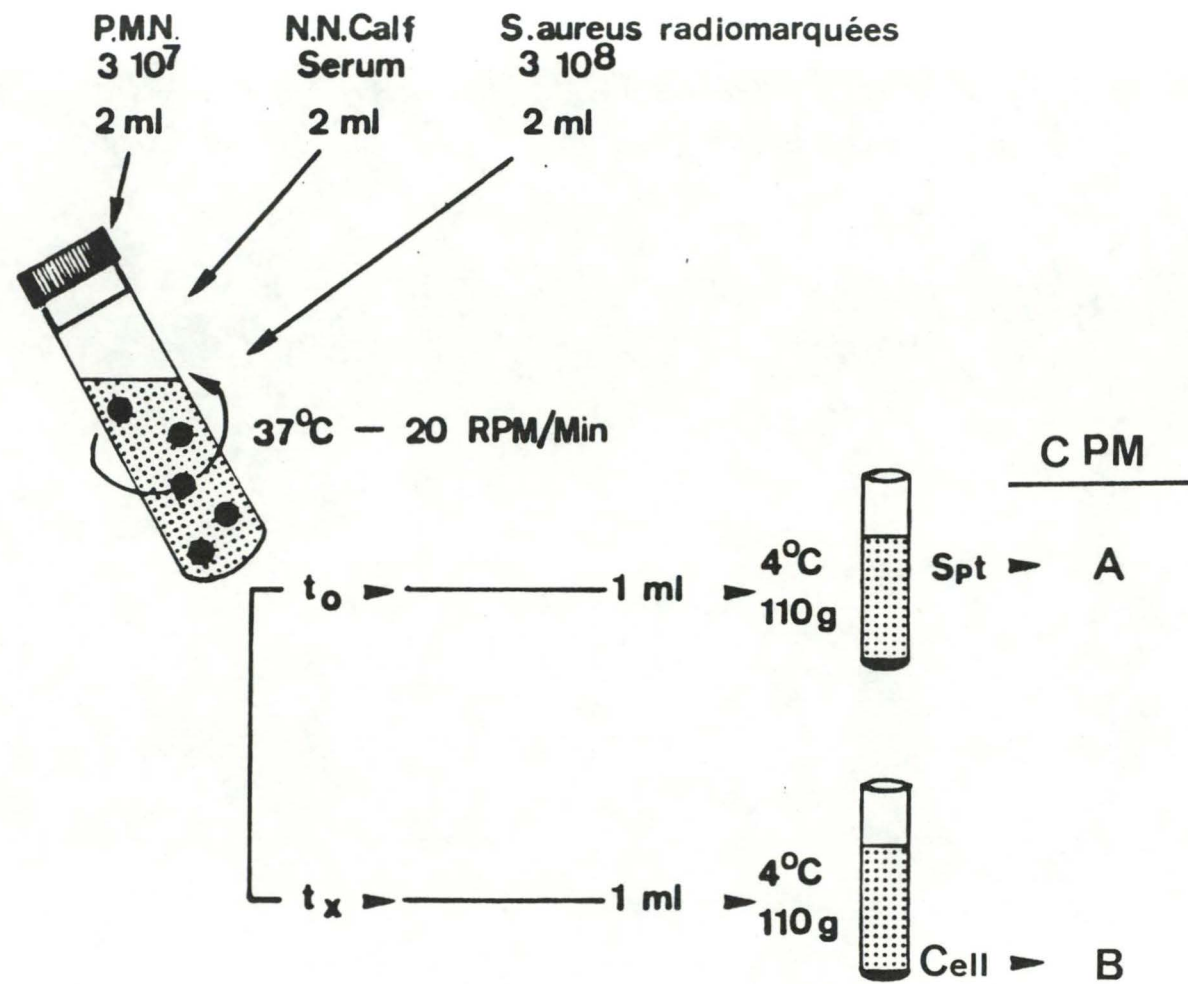
$$\text{l'indice phagocytaire (P)} = \frac{\text{cpm dans le culot PMN}}{\text{cpm dans le surnageant to}} \times 100$$

et, le nombre de bactéries phagocytées par minute entre 2 temps successifs est calculé par la formule :

$$\text{la pente (K}^P\text{)} = \frac{\text{indice pt2} - \text{indice pt1}}{t2 - t1}$$

#### 1.2. LA METHODE (FIGURE NO. 5)

- Dans un tube stérile en plastique de 12 ml contenant 2 ml de sérum de veau nouveau-né décomplémenté (Neonate calf serum, Gibco ; 30 minutes à 56°C), ajouter 2 ml de la suspension cellulaire ( $3 \cdot 10^7$  PMN) et 2 ml de la suspension bactérienne (+/-  $3 \cdot 10^8$  Staphylococcus aureus) radioactive.
- Incuber le tube à 37°C sur agitateur rotatif (20 rpm).
- Aux différents temps d'incubation (0, 5, 15, 30 et 60 minutes), prélever un aliquot de 1 ml du mélange et l'ajouter immédiatement à 2 ml de PBS glacé pour stopper la phagocytose.
- Centrifuger ce tube à 1.200 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
- Laver deux fois le culot cellulaire à la même vitesse avec du PBS froid pour enlever les bactéries extracellulaires non phagocytées.
- Resuspendre le culot dans 3 ml de PBS froid.
- Prendre des aliquots (3 fois) de 750  $\mu$ l et les ajouter à 4 ml d'aqua luma (liquide scintillant) dans des fioles milli-6 (Lumac).
- Passer alors les fioles au compteur  $\beta$  (Beckman LS - 1801) après "vortexage".



"P" INDEX =  $\frac{B}{A} \times 100$

FIGURE NO. 5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ETAPES DU TEST DE PHAGOCYTOSE

### 1.3. LES CONDITIONS DU TEST

Nous avons repris les conditions optimales d'un précédent travail (Letesson et al, 1982), à savoir :

- l'utilisation d'un sérum opsonisant dénué de pouvoir bactéricide propre
- l'agitation lente et permanente du mélange est indispensable pour éviter la sédimentation des cellules et maintenir ainsi un contact permanent entre les cellules et les bactéries
- le transfert immédiat de chaque échantillon dans du tampon glacé et son traitement ultérieur à 4°C permet l'arrêt de toute activité cellulaire
- un rapport bactérie/cellule égal à 10 ; chez l'espèce bovine, ce rapport permet une cinétique phagocytaire maximale.

### 1.4. LE TEMPS D'INCUBATION NECESSAIRE POUR UNE INCORPORATION OPTIMALE DE L'ISOTOPE PAR STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Dans le but de "marquer" les bactéries suffisamment pour permettre une mesure précise de l'activité phagocytaire par détection au compteur  $\beta$ , nous avons suivi l'incorporation de la  $^3\text{H}$ -thymidine par les bactéries, pendant 4 heures à 37°C. La méthode est décrite ci-dessous :

- une culture bactérienne de 18 heures est effectuée dans 50 ml de 869 liquide à 37°C sous agitation (150 rpm)
- prendre 2 ml de la suspension bactérienne et les mettre dans 10 ml de bouillon glucosé avec 50  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -thymidine
- incuber ce tube à 37°C sous agitation (20 rpm)
- aux différents temps (1, 2, 3 et 4 heures), prélever 2 ml et les centrifuger à 4°C, pendant 15 minutes, à 4.500 rpm
- laver le culot bactérien 2 fois avec du PBS froid, pour éliminer toute trace de milieu nutritif et de radioactivité résiduelle
- resuspendre les bactéries radiomarquées dans 2 ml de PBS froid
- prendre un aliquot et l'incuber sur milieu 869 gélosé pendant 18 heures à 37°C, avant de compter le CFU (unités formant colonie)
- prendre un deuxième aliquot et l'ajouter à 4 ml d'aqua luma (liquide scintillant) dans des fioles milli-6 (Lumac)
- les passer alors au comptage  $\beta$  après avoir vortexé.

Les résultats sont repris dans le tableau de la page suivante et dans la figure no. 6.



| Temps    | Nombre de cpm | CFU $10^8$ bactéries/ml |
|----------|---------------|-------------------------|
| 1 heure  | 21.018        | 0,5                     |
| 2 heures | 48.008        | 4,5                     |
| 3 heures | 51.257        | 6,5                     |
| 4 heures | 59.565        | 5,8                     |

Sur base de ces résultats, nous pouvons dire que deux heures d'incubation est le temps nécessaire pour une incorporation suffisante d'isotope par des bactéries en fin de phase exponentielle (comme vu par le nombre de CFU).

#### 1.5. LA FIABILITE DU TEST

Les premiers tests de phagocytose, réalisés suivant la méthode décrite plus haut, avaient pour but de répondre à deux questions :

- la phagocytose des cellules prélevées chez le même animal dans des tubes différents est-elle semblable ou variable ?
- en cas de variation, le test utilisé est-il suffisamment fiable et sensible que pour détecter des différences dues à la présence, dans le milieu, de substances anti-phagocytaires ?

Pour répondre à ces deux questions, nous avons réalisé trois tests de phagocytose avec des bactéries marquées de la même façon et des PMN isolés du même prélèvement veineux.

Les valeurs moyennes de l'indice phagocytaire pour chaque expérience aux différents temps du test, dans le tableau ci-dessous.

| Temps (en minutes) | Expérience 1 | Expérience 2 | Expérience 3 |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|
| 05                 | 9,3          | 8,2          | 7,6          |
| 15                 | 34,4         | 33,1         | 32,9         |
| 30                 | 53,9         | 52,3         | 51,8         |
| 60                 | 54,9         | 53,9         | 51,3         |

Les écarts-types de ces moyennes sont très faibles puisqu'ils varient de 0,1 à 2,3.

La cinétique de la phagocytose pour les trois expériences est représentée graphiquement à la figure no. 7.

On observe un indice phagocytaire non constant au cours du temps. La phagocytose est plus rapide au cours des 15 premières minutes ; ensuite, elle ralentit fortement pour être constante entre 30 et 60 minutes.

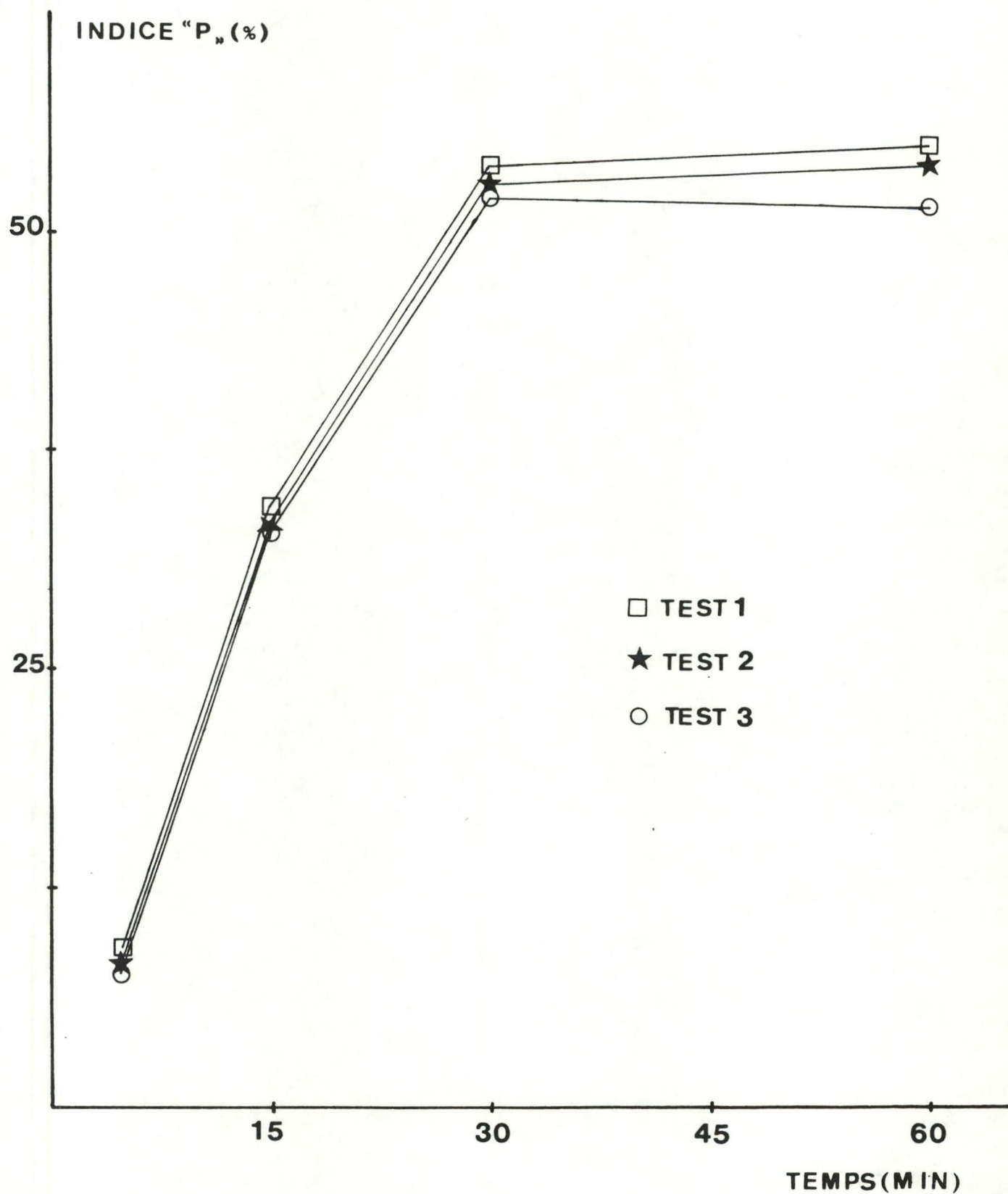


FIGURE NO. 7 : EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE L'INDICE PHAGOCYTAIRE DE PMN INCUBES DANS DU PBS

Nous avons réalisé une analyse de la variance à deux critères croisés selon le modèle suivant :

l'expérience : critère aléatoire à 3 niveaux : E

le temps : critère fixe à 5 niveaux : T

le critère expérience et le critère temps sont croisés

par temps et par expérience, 3 répétitions, qui sont hiérarchisées aux temps et aux expériences.

Les résultats de l'ANOVA sont repris dans le tableau ci-dessous.

|                | SCE         | dl | CM        | F       | Rejet ou non |
|----------------|-------------|----|-----------|---------|--------------|
| Expérience     | 0,002613510 | 2  | 0,0013068 | 18.54   | HS           |
| Temps          | 2,081334397 | 4  | 0,5203336 | 4051.75 | HS           |
| Interaction ET | 0,001027376 | 8  | 0,0001284 | 1.82    | NS           |
| R (ET)         | 0,002113997 | 30 | 0,0000705 |         |              |

Sur base du graphique, nous serions tentés de dire qu'il n'y a pas de différence entre les expériences puisqu'elles sont très proches l'une de l'autre. Mais du point de vue statistique, du fait d'une très faible variabilité résiduelle, l'effet expérience est hautement significatif ; ce qui veut dire que les différences entre les moyennes des trois expériences sont trop grandes que pour être seulement dues au hasard.

Vu la faible variabilité des répétitions, de petites différences entre les moyennes sortent significatives. Remarquons que les répétitions ne sont pas à proprement parler des répétitions aléatoires reflétant la distribution de l'activité phagocytaire dans le tube.

Il aurait été plus intéressant mais difficilement réalisable techniquement de prendre deux aliquots au même moment dans la même expérience, afin de savoir si la phagocytose se fait de la même manière dans tout le tube.

L'interaction expérience - temps est NS ; ce qui veut dire que l'allure de la courbe de phagocytose dans les trois expériences est semblable ou encore que le temps agit de la même façon sur la phagocytose d'une expérience à l'autre.

Ainsi, on peut utiliser cette technique pour mettre en évidence des cinétiques différentes dues à l'effet de substances présentes dans le surnageant bactérien étudié (voir § 2).

### 1.6. EXOCYTOSE DE DEBRIS BACTERIENS RADIOACTIFS

Dans le test mis au point par Gallez B. (1981), le % de phagocytose était calculé à partir de la différence entre le nombre de bactéries dans le surnageant initial ( $t_0$ ) et le nombre de bactéries subsistant dans le surnageant au temps  $t_x$ .

Notre technique se base non pas sur le nombre de bactéries vivantes mais sur la mesure de la radioactivité. Dès lors, il est apparu intéressant d'établir la proportion de la radioactivité due à l'exocytose de débris provenant de bactéries ingérées.

#### PROTOCOLE :

- Dans un tube stérile en plastique de 12 ml, on introduit successivement 2 ml de la suspension de PMN ( $3 \cdot 10^7$  PMN), 2 ml de SVNN décomplémenté et 2 ml de la suspension bactérienne ( $3 \cdot 10^8$  Staphylococcus aureus) marquée.
- Le tube est incubé à 37°C sur agitateur rotatif (20 rpm).
- Après 3 minutes d'incubation, on arrête la phagocytose en centrifugeant le tube à 1.200 rpm, pendant 10 minutes, à 4°C ; ensuite, 2 lavages au PBS glacé sont nécessaires pour éliminer les bactéries marquées non phagocytées. Ce temps d'incubation (3 minutes) est un compromis entre la nécessité d'avoir un nombre de bactéries ingérées suffisamment important que pour avoir une mesure de la phagocytose et l'obligation de commencer le test avant que les premières bactéries ingérées ne soient "digérées" par le PMN.
- On resuspend le culot cellulaire dans 4 ml de PBS glacé + 2 ml de SVNN décomplémenté ; le tube est incubé à 37°C sur agitateur rotatif dans le but de mesurer l'importance du relargage de la  $^3\text{H}$ -thymidine dans le milieu.
- Aux différents temps de l'incubation (0, 5, 15, 30 et 60 minutes), un aliquot de 1 ml du mélange est prélevé et est transféré sans délai dans un tube contenant 2 ml de PBS glacé.

Ensuite, nous réalisons les mêmes manipulations que dans le test de phagocytose décrit plus haut.

RESULTAT :

| Temps             | Quantité de radioactivité dans le surnageant au temps $t_x$ |        |
|-------------------|---|--------|
|                   | en cpm  | en %   |
| t 5 <sup>s</sup>  | 22,60 +/- 1,3   | 12,5 % |
| t 15 <sup>s</sup> | 89,20 +/- 6,8   | 49,2 % |
| t 30 <sup>s</sup> | 140,95 +/- 6,6  | 77,7 % |
| t 60 <sup>s</sup> | 150,26 +/- 10,1   | 82,8 % |

Le nombre de cpm initialement dans les  $3 \cdot 10^7$  PMN est égal au nombre de cpm dans le culot au temps  $t_0$  (cpm  $t_0^c$ ), à savoir 181,40 +/- 3,4.

Le % de radioactivité relargée dans le milieu =  $\frac{\text{cpm } t_x^s}{\text{cpm } t_0^c} \times 100$ .

Après une heure d'incubation, nous avons plus de 80 % de la radioactivité ingérée par les PMN en 3 minutes qui est libérée. Ces 80 % ne reflètent qu'en partie l'activité bactéricide des PMN car celle-ci est composée à la fois de ces 80 % mais aussi de la radioactivité intracellulaire correspondant aux débris bactériens non encore libérés dans le milieu.

Etant donné que la radioactivité dans le milieu extracellulaire correspond à la fois à la radioactivité des bactéries libres et à celle libérée par les PMN, nous mesurerons, à l'avenir, la radioactivité du culot cellulaire pour calculer l'indice phagocytaire au cours du temps.

Cependant, cette mesure de radioactivité correspondra à une partie seulement de la radioactivité réellement ingérée depuis le temps  $t_0$ , puisque nous avons montré une exocytose de débris bactériens radioactifs importante (plus de 80 % après une heure).

### 1.7. LA PHAGOCYTOSE AVEC LES BACTERIES RADIOACTIVES VIVANTES OU MORTES

Le marquage des bactéries se base sur l'incorporation au niveau du DNA bactérien de polynucléotides synthétisés à partir de la thymidine tritiée.

Etant donné que le mélange bactéries + PMN + sérum est incubé à 37°C, on pourrait se demander s'il n'y a pas de variation dans la quantité d'isotope par bactérie au cours du temps, les bactéries non ingérées pouvant encore se multiplier. En effet, les bactéries ingérées par les PMN au début du test ne seraient-elles pas plus radioactives que celles ingérées en fin du test ?

Si oui, l'indice phagocytaire au début du test serait alors plus élevé que celui à la fin du test, non pas suite à une activité phagocytaire plus grande, mais suite à une diminution de la quantité d'isotope dans les bactéries au cours du temps.

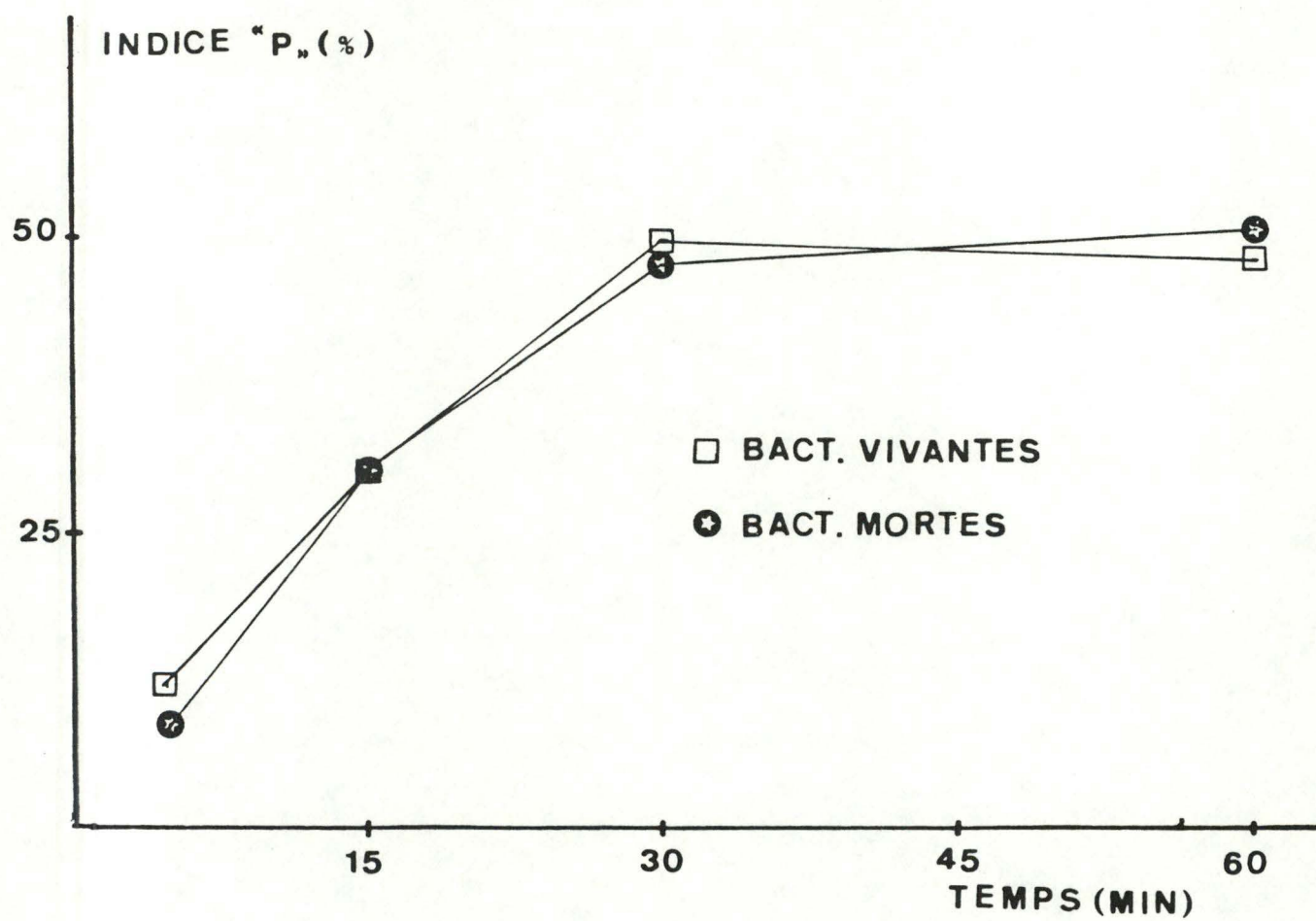
Pour vérifier cette hypothèse, nous avons fait, en parallèle, deux tests de phagocytose : dans l'un, les bactéries marquées ont été utilisées immédiatement après l'incorporation de l'isotope radioactif ; et dans l'autre test, les bactéries marquées ont été d'abord autoclavées (20 minutes à 121°C) avant de réaliser la cinétique de la phagocytose.

| Temps   | Phagocytose avec   |                  |
|---------|--------------------|------------------|
|         | bactéries vivantes | bactéries mortes |
| 5 min.  | 11,2 +/- 0,2       | 8,7 +/- 0,4      |
| 15 min. | 30,7 +/- 0,3       | 31,6 +/- 1,0     |
| 30 min. | 50,1 +/- 0,7       | 47,5 +/- 0,8     |
| 60 min. | 48,3 +/- 0,9       | 51,3 +/- 0,9     |

Les résultats obtenus dans les deux cas sont fort semblables (figure no. 8). Les deux cinétiques étant fort proches l'une de l'autre, nous pouvons en conclure que le fait de mettre des *Staphylococcus aureus* vivantes à 37°C ne change en rien la quantité de radioactivité par bactérie au cours du temps.

Dès lors, nous utiliserons des *Staphylococcus aureus* vivants pour être plus proches des conditions expérimentales précédemment établies.

FIGURE NO. 8 : CINETIQUES DES INDICES PHAGOCYTAIRES DE PMN INCUBES AVEC DES BACTERIES VIVANTES OU MORTES



## 2. PHAGOCYTOSE EN PRESENCE DE SURNAGEANTS BACTERIENS

### 2.1. PRINCIPE GENERAL

Après avoir amené les PMN à bonne concentration ( $1,5 \cdot 10^7$  PMN/ml), on les répartit dans des tubes stériles à raison de 2 ml de suspension cellulaire par tube. On centrifuge les tubes, pendant 10 minutes, à 1.200 rpm et on resuspend les culots cellulaires dans 2 ml de surnageant bactérien étudié.

Ensuite, on démarre le test de phagocytose comme précédemment décrit (1.2.).

### 2.2. TEST PREALABLE : CONTROLE DE L'EFFET DU MILIEU RPMI SUR L'ACTIVITE PHAGOCYTAIRE

Le surnageant bactérien étudié résulte de la croissance d'une souche bactérienne spécifique dans un milieu RPMI (dont la composition est donnée en détail dans Matériel et Méthodes).

Dès lors, il est possible que le milieu RPMI dans le test puisse avoir un quelconque effet sur la phagocytose. Celui-ci doit être connu, si on veut discerner cet effet de celui dû à des éléments bactériens solubles.

Pour réaliser cette étude, nous avons placé  $3 \cdot 10^7$  PMN dans 2 ml de RPMI. A cela, nous avons ajouté 2 ml de SVNN décomplémenté et 2 ml de bactéries marquées ( $3 \cdot 10^8$  Staphylococcus aureus).

Ensuite, nous avons réalisé les mêmes conditions et les mêmes manipulations que dans le test de phagocytose décrit plus haut.

La figure no. 9 montre l'évolution de l'indice phagocytaire au cours du temps. Les résultats sont rapportés dans le tableau ci-dessous.

Influence du milieu RPMI sur le pouvoir phagocytaire des PMN :

| Incubation des cellules dans | Indice phagocytaire à |              |              |              |
|------------------------------|-----------------------|--------------|--------------|--------------|
|                              | 5 min.                | 15 min.      | 30 min.      | 60 min.      |
| PBS                          | 19,4 +/- 0,1          | 49,6 +/- 0,9 | 64,9 +/- 2,5 | 57,9 +/- 1,9 |
| RPMI                         | 24,8 +/- 0,3          | 53,9 +/- 2,0 | 65,1 +/- 2,4 | 59,9 +/- 0,4 |

Le milieu RPMI n'a donc pas d'effet puisqu'il n'y a pas de différence avec le témoin PBS. L'allure de la courbe est semblable dans les deux cas.



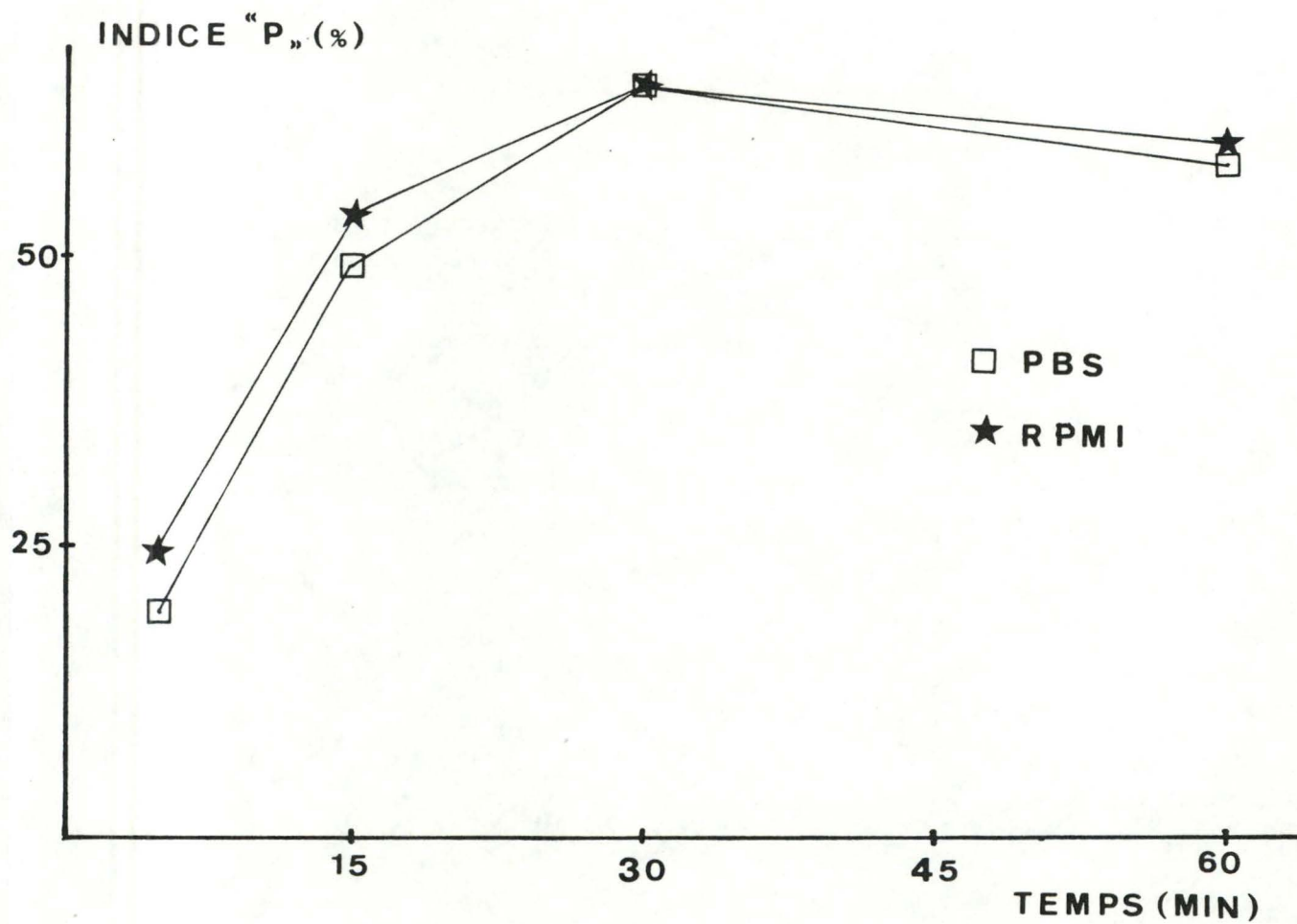


FIGURE NO. 9 : EVOLUTION DE L'INDICE PHAGOCYTAIRE AU COURS DU TEMPS

## 2.3. INCUBATION AVEC LES SURNAGEANTS STREPTOCOCCIQUES

### 2.3.1. Résultats

- Les cinétiques de phagocytose pour les divers surnageants streptococciques sont représentées graphiquement aux figures nos. 10 et 11.
- Les valeurs moyennes de la phagocytose, au cours du temps, sont rapportées dans le tableau ci-dessous :

Incubation avec les surnageants de deux espèces streptococciques :

| L'espèce et le % de viabilité en fin de test | Temps (en minutes) |      |      |      |
|--|--------------------|------|------|------|
|  | 5'                 | 15'  | 30'  | 60'  |
| <b>Streptococcus agalactiae</b>              |                    |      |      |      |
| 95 % viabilité témoin                        | 5,3                | 28,7 | 52,5 | 54,0 |
| 94 % viabilité S 24h                         | 10,1               | 34,8 | 47,3 | 44,9 |
| 91 % viabilité S 48h                         | 10,6               | 32,3 | 47,9 | 42,8 |
| 93 % viabilité S 72h                         | 10,6               | 32,3 | 46,6 | 42,5 |
| <b>Streptococcus pyogènes</b>                |                    |      |      |      |
| 95 % viabilité témoin                        | 12,6               | 36,3 | 54,1 | 50,4 |
| 90 % viabilité S 24h                         | 18,1               | 39,4 | 50,5 | 50,9 |
| 90 % viabilité S 48h                         | 19,7               | 40,1 | 51,8 | 48,0 |
| 90 % viabilité S 72h                         | 18,7               | 40,6 | 53,4 | 52,7 |

Les écarts-types de ces moyennes varient de 0,1 à 2,3.

### 2.3.2. Discussion

#### - Streptococcus pyogènes

Etant donné que les cinétiques de l'indice phagocytaire dans les trois cas sont fort proches l'une de l'autre, nous avons pour la clarté du graphique représenté l'indice phagocytaire moyen obtenu à partir des trois surnageants au cours du temps (figure no. 10).

Nous observons que l'allure de la courbe de phagocytose avec ces surnageants est proche de celle obtenue avec le contrôle PBS.

De plus, l'observation microscopique de ces cellules ne montre aucune différence morphologique avec celles incubées dans du PBS.

Et, le pourcentage de viabilité, à la fin du test de phagocytose, est de 95 % pour le contrôle PBS et de +/- 90 % pour les cellules incubées avec les surnageants streptococciques.

Dès lors, nous pouvons dire que l'incubation des PMN avec les trois surnageants de culture de *Streptococcus pyogènes* n'altère pas la capacité phagocytaire de ces cellules, ni leur viabilité.

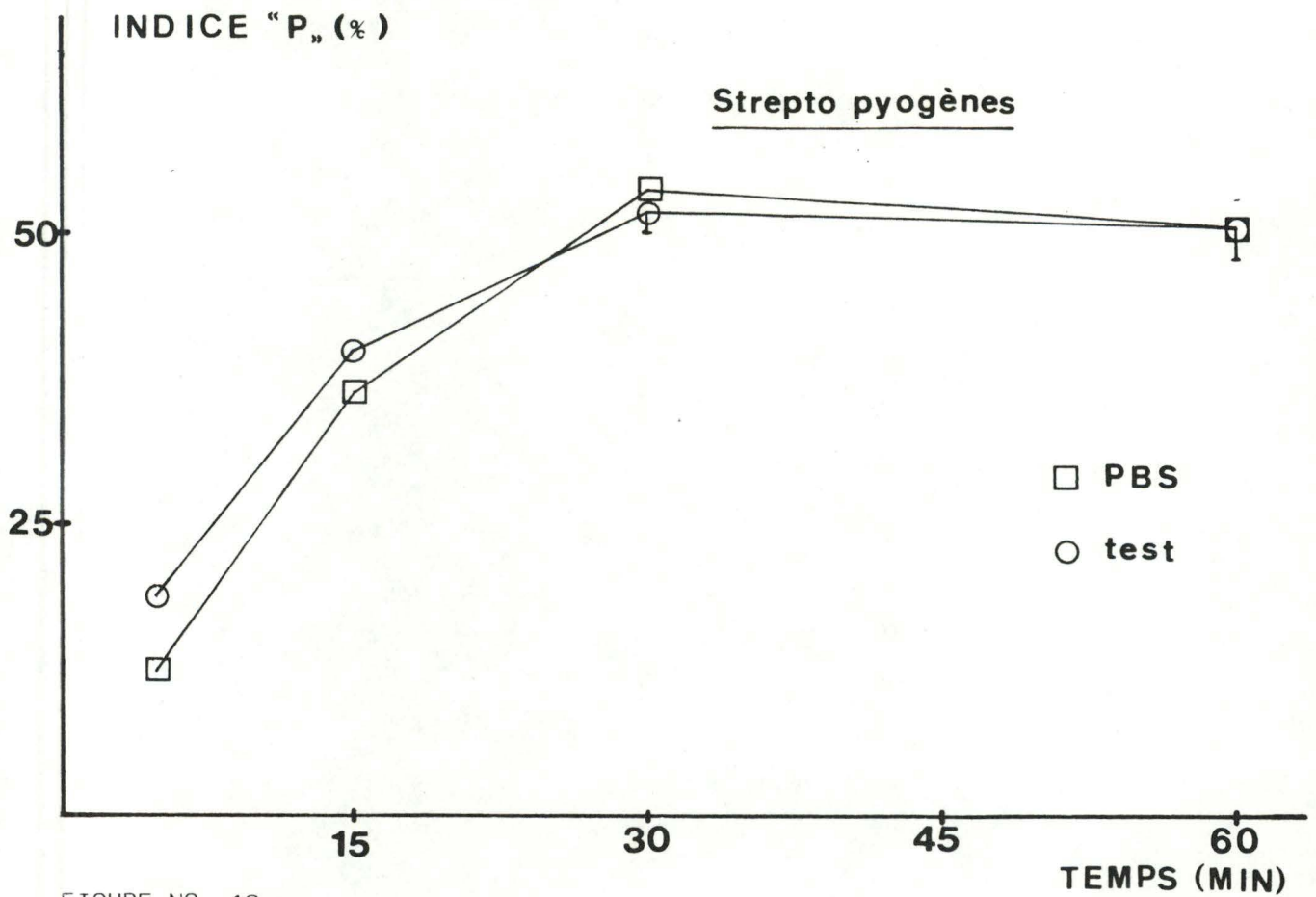


FIGURE NO. 10

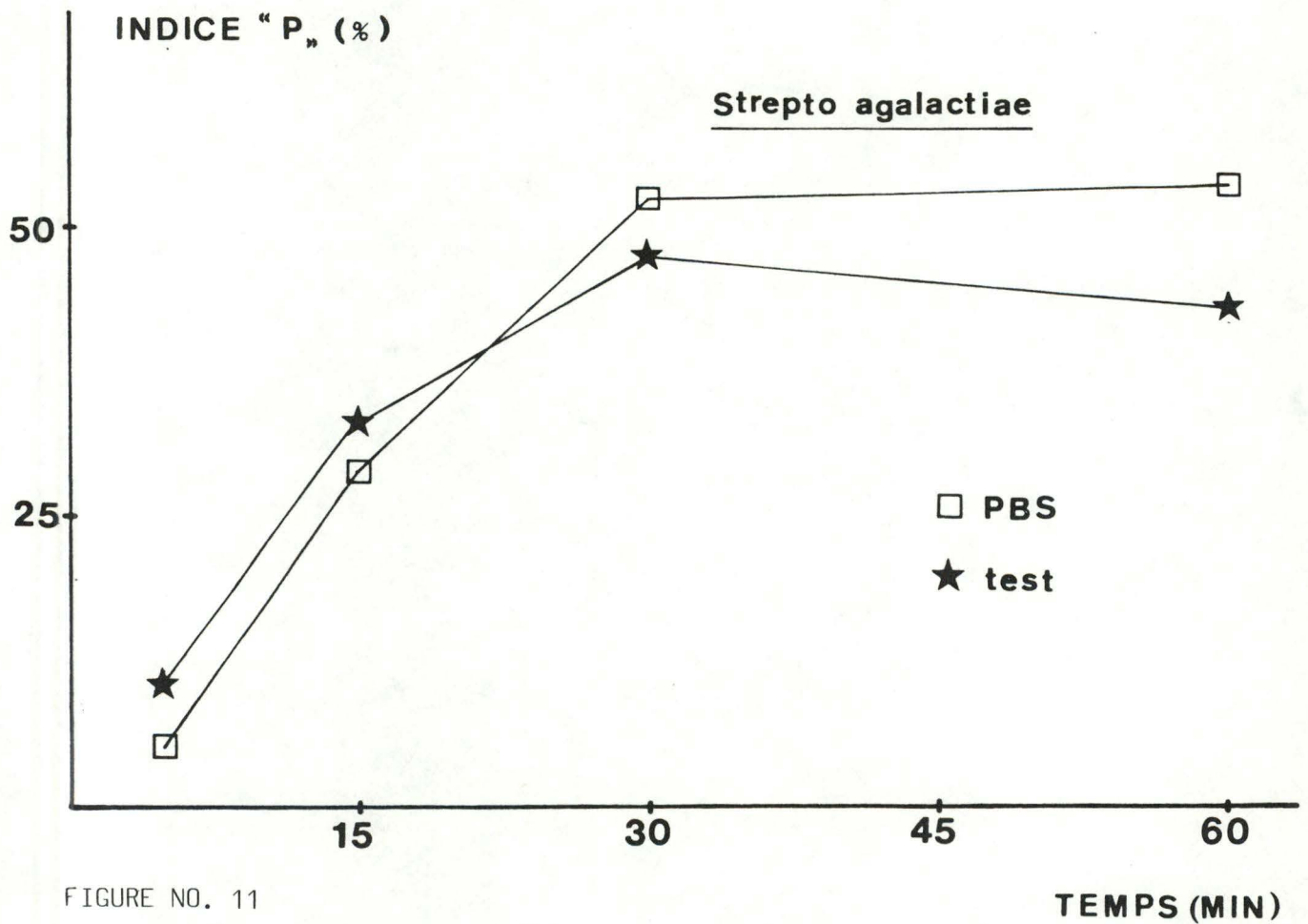


FIGURE NO. 11

Ce manque apparent d'effet sur les PMN observé avec les surnageants de *Streptococcus pyogènes* peut être dû à la nécessité d'une période d'incubation plus longue et/ou à une concentration trop faible de la (les) substance(s) lytique(s) pour agir sur les PMN, ou encore à l'absence de récepteurs membranaires adéquats sur les PMN de bovins puisque la souche est d'origine humaine.

- *Streptococcus agalactiae*

Comme pour *Streptococcus pyogènes*, nous avons représenté graphiquement l'indice phagocytaire moyen obtenu à partir des trois surnageants bactériens au cours du temps.

Ainsi, de cette cinétique globale (figure no. 11), nous pouvons tirer les observations suivantes :

- . La phagocytose n'est pas constante au cours du temps ; elle est plus rapide dans les 15 premières minutes : la pente entre 5 et 15 minutes est de 2,27 pour 0,95 entre 15 et 30 minutes, et pour -0,13 entre 30 et 60 minutes.
- . Au cours des 15 premières minutes, l'activité phagocytaire des PMN incubés avec les surnageants streptococciques est supérieure à celle du contrôle PBS. Ensuite, elle diminue par rapport au contrôle PBS, puisqu'après 30 minutes d'incubation, le % de phagocytose est d'environ 47 % pour ces cellules et est de 52 % pour le contrôle PBS ; et après une heure, il passe à 43 % pour 54 % au niveau du contrôle PBS. L'observation microscopique n'a pas apporté d'explication à cette réduction dans la capacité phagocytaire.

Vu la cinétique de l'indice phagocytaire au cours des 15 premières minutes par rapport au contrôle PBS, nous pouvons suggérer que le ou les facteur(s) des surnageants streptococciques, qui modifie(nt) la courbe de phagocytose par rapport au contrôle PBS, n'agirai(en)t pas sur la capacité phagocytaire des PMN mais plutôt sur la capacité bactéricide.

En effet, nous pourrions très bien imaginer que le ou les facteur(s) bactérien(s), en altérant cette capacité cellulaire, limiterai(en)t l'exocytose de débris bactériens radioactifs qui normalement en résulte.

Cette exocytose réduite expliquerait le surcroît de radioactivité dans le culot cellulaire par rapport aux PMN incubés dans du PBS au cours des 15 premières minutes (voir 1.6.).

Par la suite, cet encombrement de bactéries radiomarquées dans les cellules limiterait la capacité phagocytaire des PMN, ce qui expliquerait le plus faible % de phagocytose par rapport au témoin PBS observé après 20 minutes d'incubation.

Pour vérifier cette suggestion, il faudrait modifier le test de façon à séparer la phagocytose de la bactéricidie.

Comme il y a peu d'études faites sur ce sujet, nous ne pouvons pas suggérer le nom et le mode d'action d'une toxine streptococcique connue qui altère de la même façon les PMN.

Etant donné la faible différence avec le contrôle PBS au niveau graphique, comparé aux effets plus nets des surnageants staphylococciques (voir plus loin), nous avons traité statistiquement les résultats obtenus dans trois expériences de phagocytose avec le même surnageant streptococcique (le surnageant d'une culture de 48 heures).

Les résultats des trois expériences sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

| Temps | Expérience 1 |      | Expérience 2 |      | Expérience 3 |      |
|-------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|
|       | PBS          | S    | PBS          | S    | PBS          | S    |
| 5'    | 9,6          | 12,8 | 9,5          | 17,0 | 5,3          | 10,6 |
| 15'   | 30,1         | 32,0 | 43,0         | 45,2 | 28,7         | 32,3 |
| 30'   | 50,9         | 45,8 | 59,7         | 56,6 | 52,5         | 47,9 |
| 60'   | 53,8         | 46,9 | 58,4         | 48,7 | 54,0         | 42,8 |

L'écart-type pour l'ensemble de ces mesures varie entre 0,1 et 2.

Le modèle de l'analyse de la variance est le suivant :

le facteur expérience : critère aléatoire à 3 niveaux : E  
 le facteur temps : critère fixe à 5 niveaux : T  
 le facteur milieu (PBS - surnageant bactérien) : critère fixe à 2 niveaux : M

Trois répétitions sont hiérarchisées aux trois critères :

les critères expérience - temps sont croisés  
 les critères expérience - milieu sont croisés  
 les critères temps - milieu sont croisés.

|              | SCE         | dl | CM         | F      | Rejet ou non |
|--------------|-------------|----|------------|--------|--------------|
| Expérience   | 0.072580860 | 2  | 0.03629043 | 367.02 | HS           |
| Milieu       | 0.001144900 | 1  | 0.00114490 | 10.33  | NS           |
| Interactions |             |    |            |        |              |
| EM           | 0.000221666 | 2  | 0.00011083 | 1.12   | NS           |
| ET           | 0.040854906 | 8  | 0.00510686 | 51.65  | HS           |
| MT           | 0.058862829 | 4  | 0.01471571 | 27.61  | HS           |
| EMT          | 0.004263445 | 8  | 0.00053293 | 5.39   | HS           |
| R (EMT)      | 0.005932669 | 60 | 0.00009888 |        |              |

L'effet expérience est hautement significatif, comme nous l'avons déjà observé dans l'ANOVA réalisée pour tester la fiabilité du test.

L'effet milieu est NS, ce qui veut dire que la valeur moyenne, avec le surnageant bactérien pour l'ensemble des trois expériences et pour tous les temps confondus, n'est pas significativement différente de celle que nous obtenons pour le milieu PBS.

Toutefois, comme l'interaction milieu-temps est significative, nous pouvons affirmer que la phagocytose de cellules incubées avec le surnageant bactérien est différente de celle obtenue quand les cellules sont incubées avec du PBS. En effet (figures nos.12, 13 et 14), au début de la cinétique, la courbe de phagocytose avec le surnageant bactérien est au-dessus de celle avec le PBS ; et au environ de 15-20 minutes, la courbe de phagocytose avec le PBS passe au-dessus de l'autre. Le croisement de ces deux cinétiques explique le facteur milieu NS. En effet, par compensation, la valeur moyenne de phagocytose, obtenue avec le surnageant bactérien pour les trois expériences et tous les temps confondus, est proche de celle avec le milieu PBS. Cet effet compensatoire se retrouve dans l'interaction expérience-milieu Non Significative qui dit que dans chaque expérience, la valeur moyenne de phagocytose avec le milieu PBS pour tous les temps est proche de celle avec le surnageant bactérien. Ce qui veut dire que l'effet compensatoire est retrouvé dans les trois expériences. L'interaction expérience-temps est HS, ce qui veut dire que d'une expérience à l'autre, les valeurs de l'indice phagocytaire des deux milieux confondus au cours du temps sont significativement différentes.

FIGURES 12, 13 ET 14 : CINETIQUES DES INDICES PHAGOCYTAIRES AU COURS DU TEMPS DE PMN INCUBES DANS LE SURNAGEANT D'UNE CULTURE DE 48 HEURES DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE (A 3 JOURS DIFFERENTS)

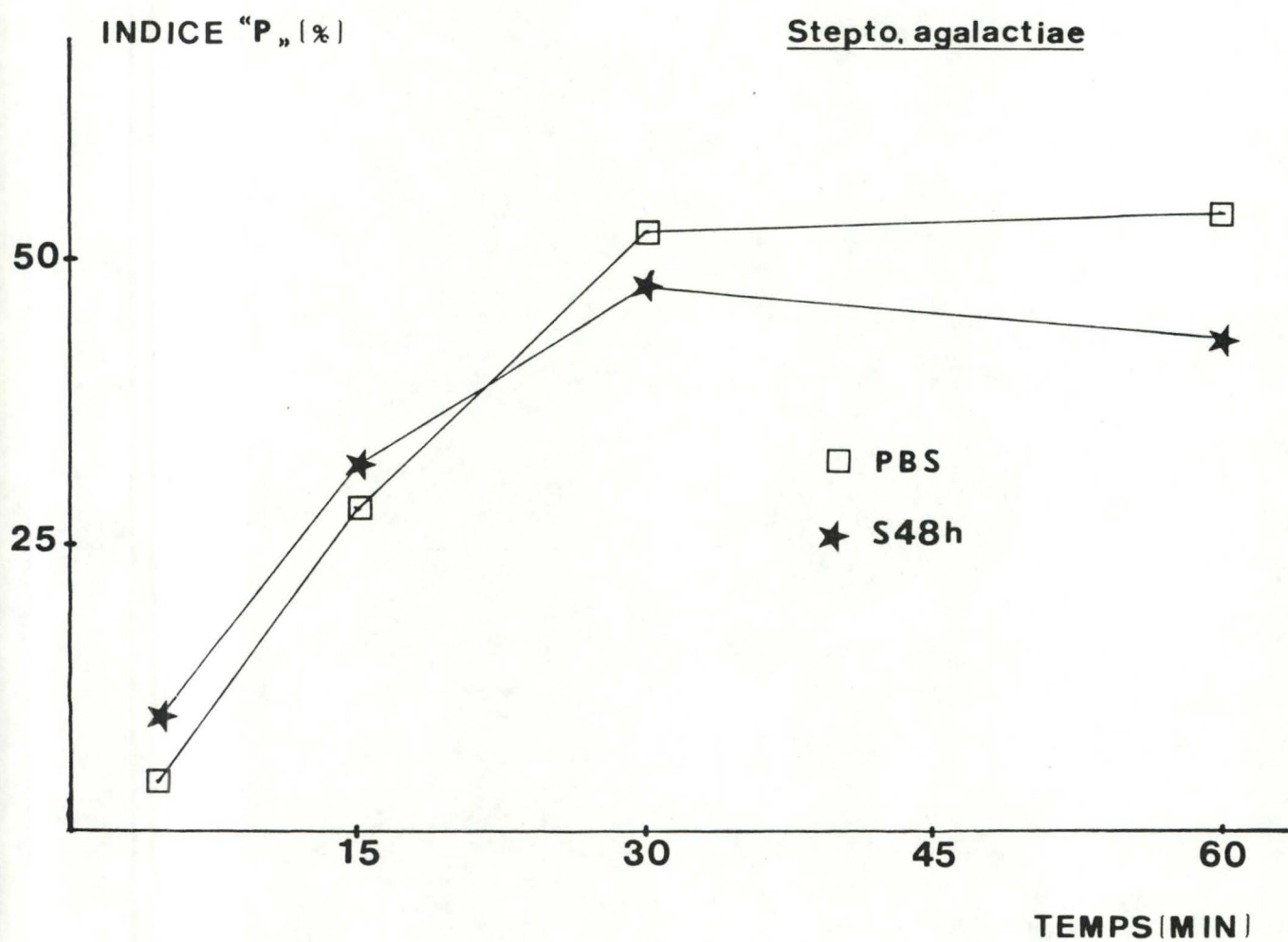


FIGURE NO. 12

FIGURE NO. 13

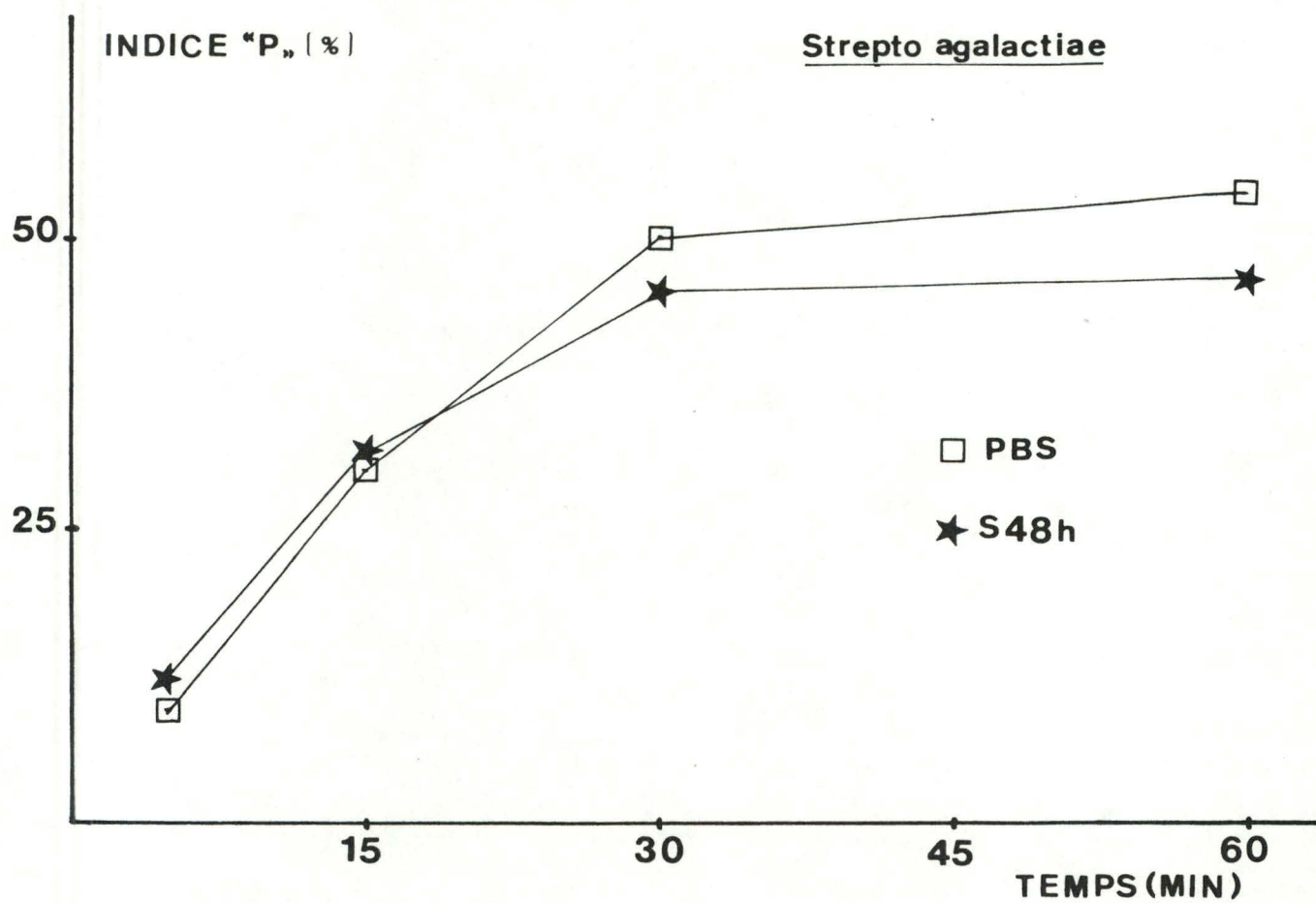
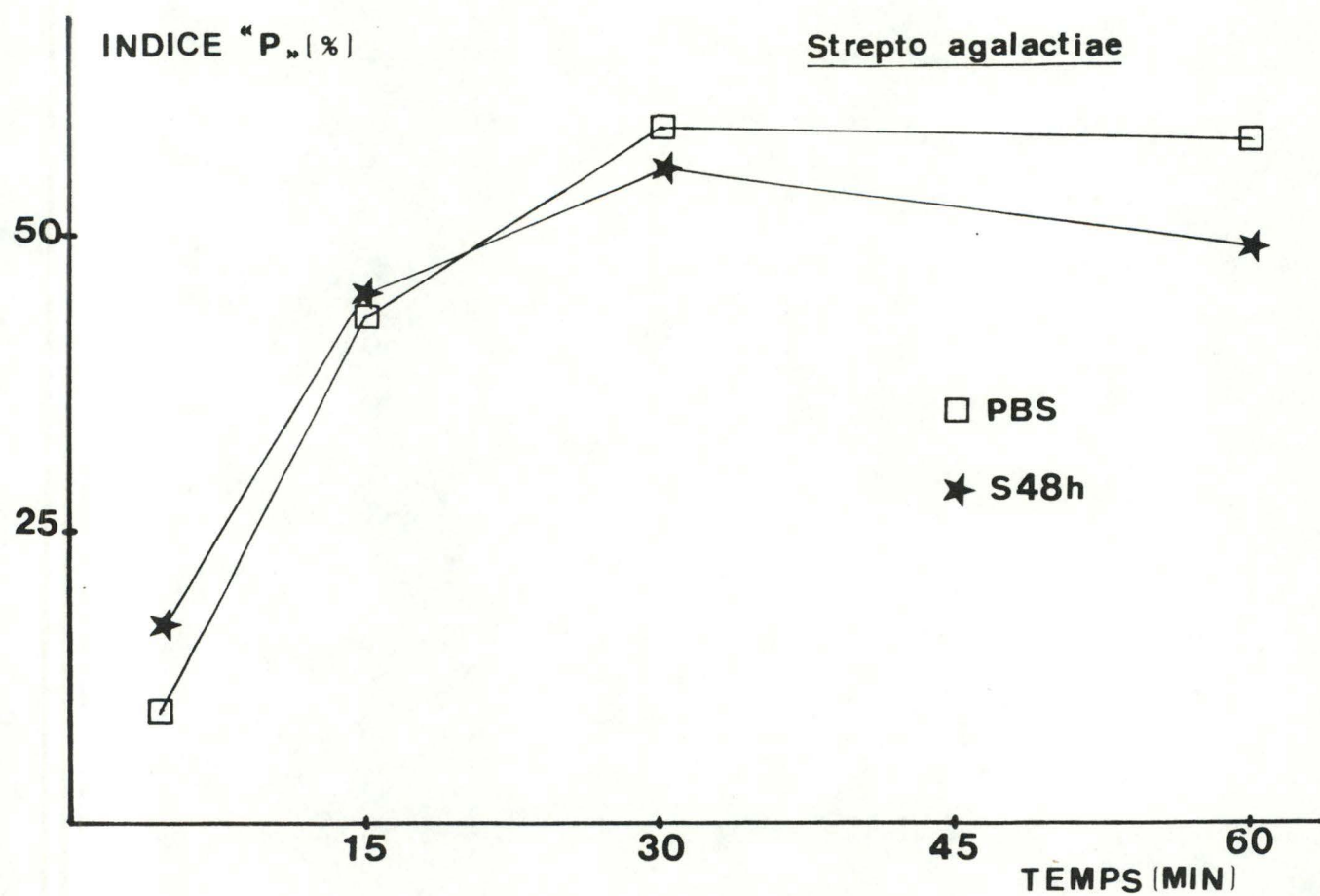


FIGURE NO. 14





A nouveau, remarquons que cette interaction est testée contre le CM résiduel, sous-estimant la variabilité réelle dans le tube.

L'interaction triple est Hautement Significative, ce qui veut dire que l'interaction milieu-temps est différente d'une expérience à l'autre : en effet, graphiquement (figures nos. 12, 13 et 14), nous observons que le croisement de cinétiques ne se produit pas toujours au même temps. Cependant, dans les trois expériences faites, l'indice phagocytaire de cellules avec le PBS devient chaque fois supérieur, entre 15 et 25 minutes, à celui de cellules avec le surnageant bactérien.

## 2.4. INCUBATION AVEC LES SURNAGEANTS DE CULTURES STAPHYLOCOCCIQUES

### 2.4.1. Résultats

Les cinétiques phagocytaires sont rapportées dans les figures nos. 15, 16, 17 et 18.

Incubation avec les divers surnageants staphylococciques - Moyenne de l'indice phagocytaire :

| Variétés de Staphylococcus aureus<br>et % de viabilité après 1h | Temps (en minutes) |      |       |      |
|---|--------------------|------|-------|------|
|   | 5'                 | 15'  | 30'   | 60'  |
| <b>Bovine écovar</b>  |                    |      |       |      |
| 94 % viabilité témoin   | 13,5               | 35,5 | 55,1  | 53,0 |
| 94 % viabilité S 24h  | 16,0               | 38,3 | 52,8  | 48,8 |
| 4 % viabilité S 48h   | 3,2                | 10,1 | 9,3   | 10,3 |
| 5 % viabilité S 72h   | 2,0                | 10,0 | 8,4   | 11,9 |
| <b>Ovine écovar</b>   |                    |      |       |      |
| 90 % viabilité témoin   | 19,4               | 49,6 | 64,9  | 57,9 |
| 2 % viabilité S 24h   | 2,3                | 1,5  | 5,6   | 4,6  |
| <b>Human écovar</b>   |                    |      |       |      |
| 99 % viabilité témoin   | 6,9                | 26,8 | 50,6  | 63,0 |
| 0 % viabilité S 48h   | 1,4                | 1,1  | 1,4   | 17,6 |
| 0 % viabilité S 72h   | 1,2                | 2,3  | 1,5   | 12,6 |
| <b>Human écovar</b>   |                    |      |       |      |
| 95 % viabilité témoin   | 11,8               | 41,4 | 56,08 | 53,6 |
| 94 % viabilité S 24h  | 14,0               | 44,2 | 58,4  | 53,1 |
| 2 % viabilité S 48h   | 3,2                | 6,9  | 3,8   | 1,5  |
| 2 % viabilité S 72h   | 2,9                | 5,8  | 3,2   | 1,4  |

La valeur moyenne de l'écart-type pour l'ensemble des mesures varie de 0,1 à 2 %.

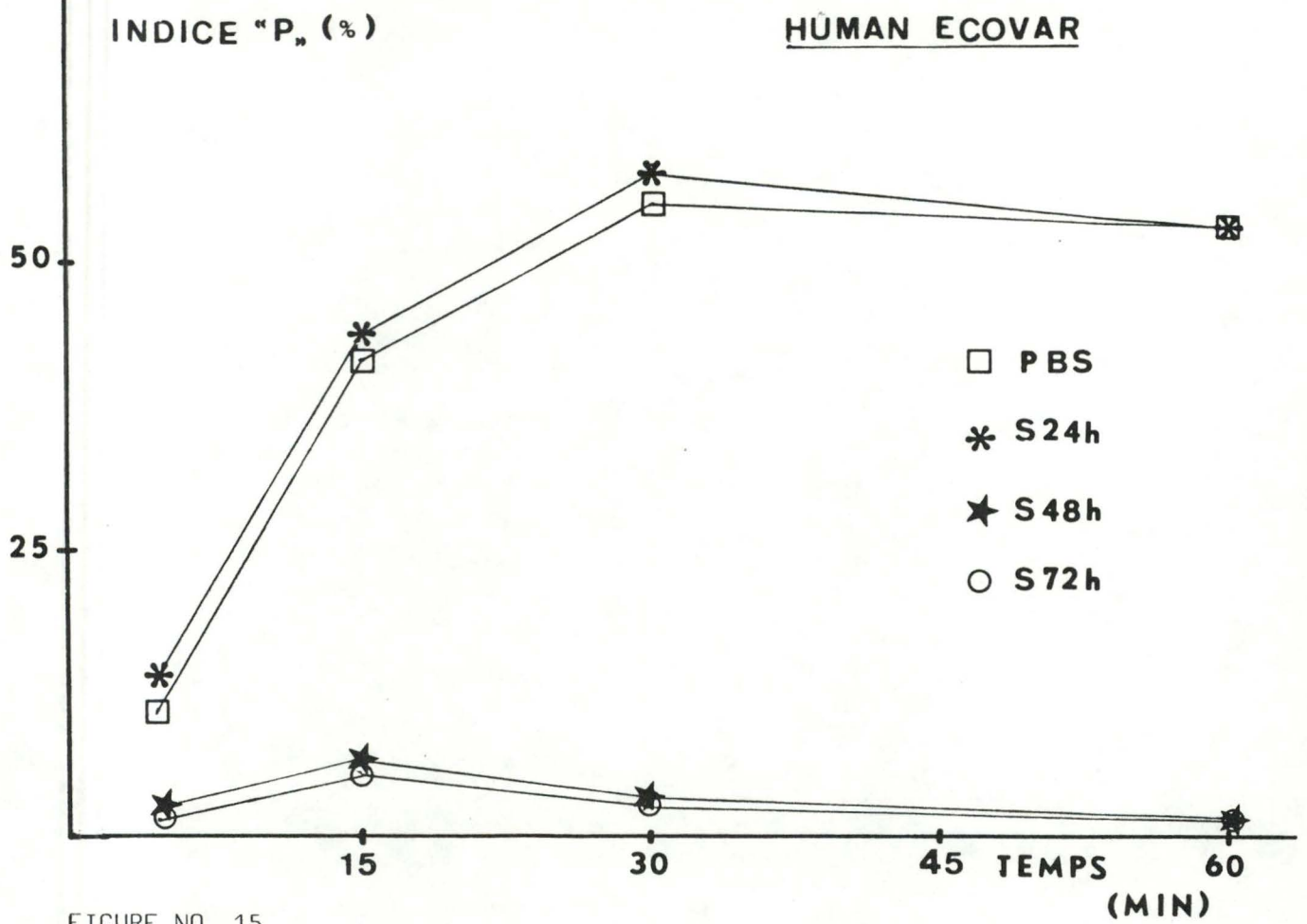


FIGURE NO. 15

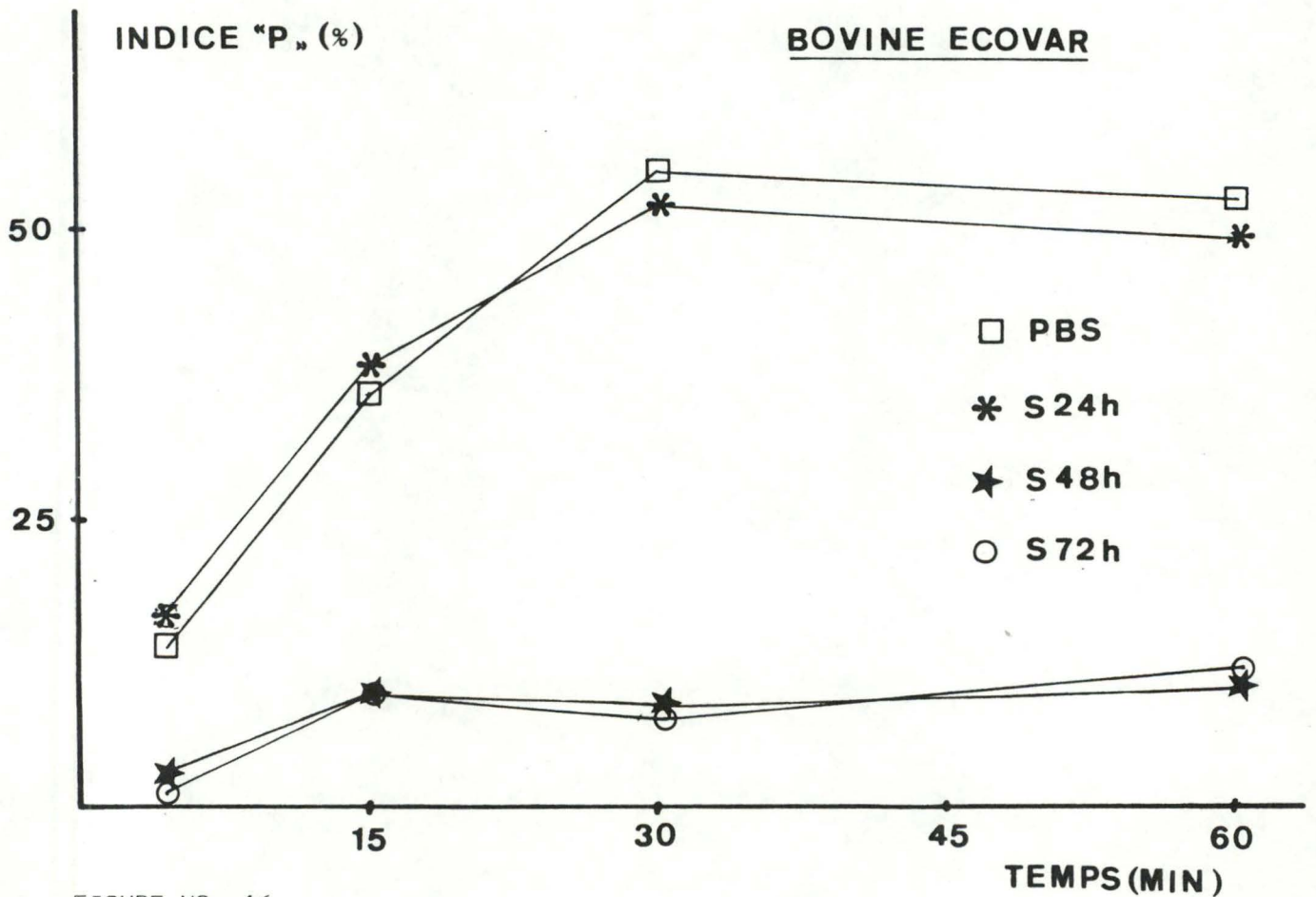


FIGURE NO. 16

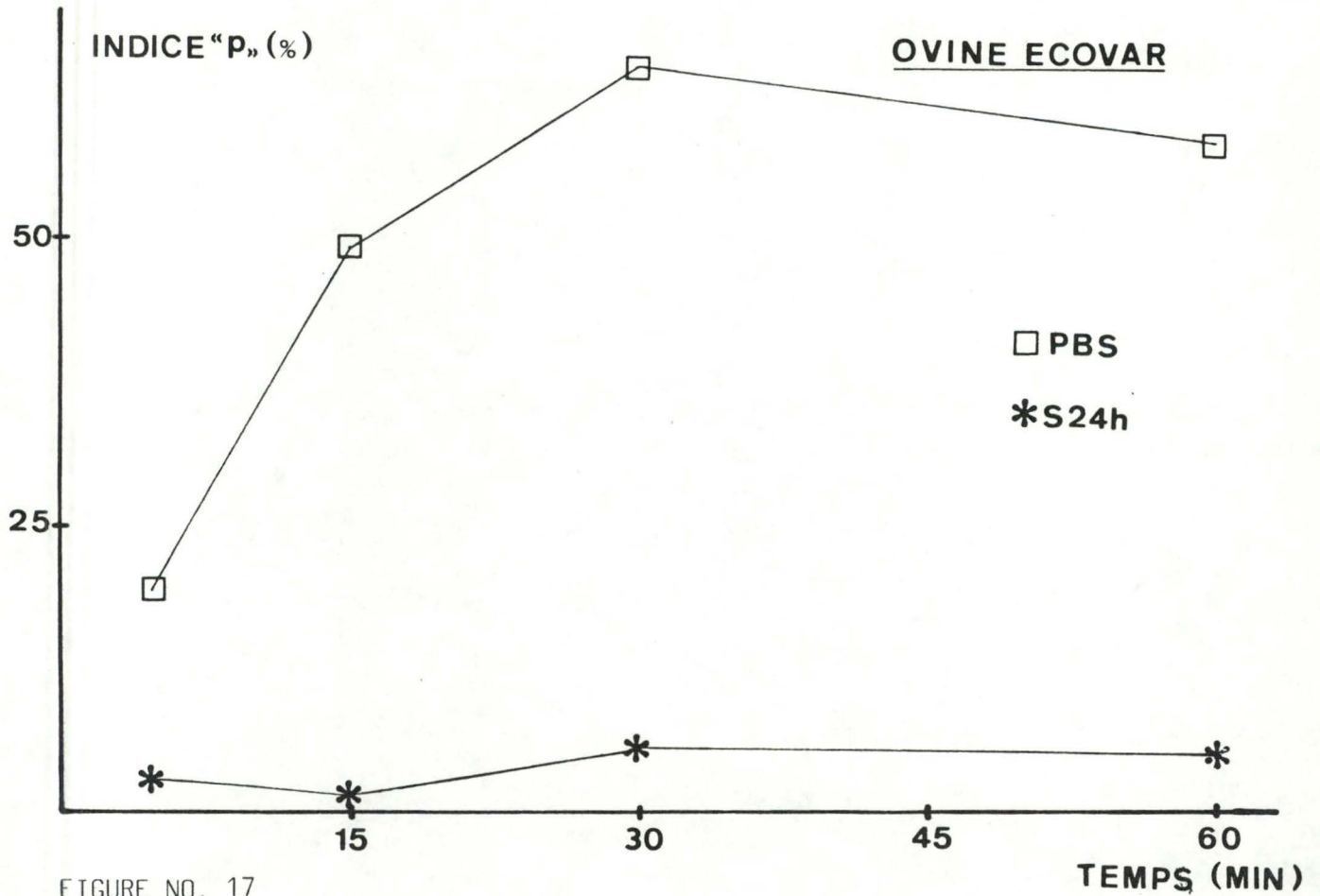


FIGURE NO. 17

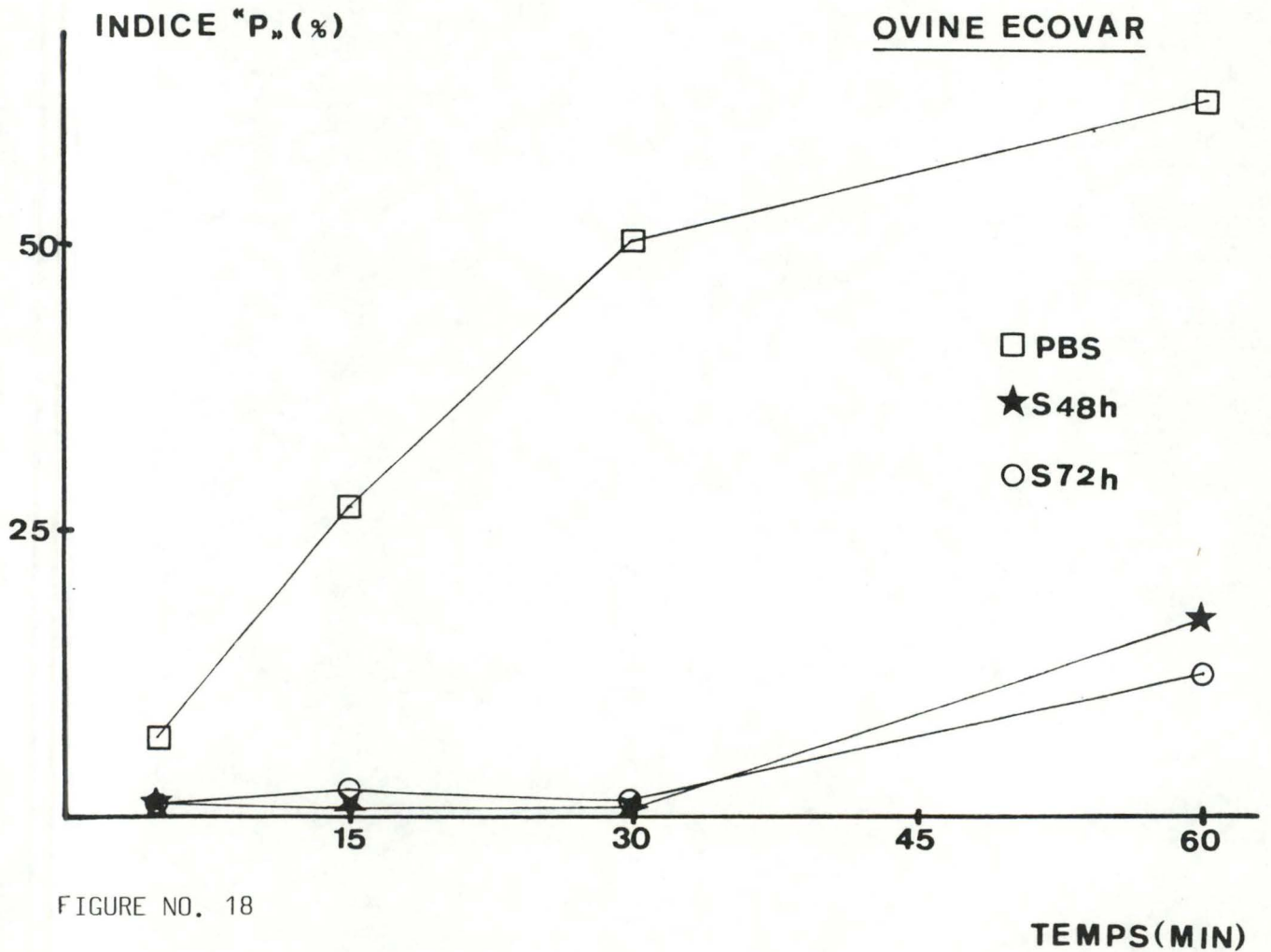


FIGURE NO. 18

#### 2.4.2. Discussion

##### - La variété bovine écovar

L'incubation des PMN avec les surnageants d'une culture de 48 heures et de 72 heures de cette variété, pendant le test de phagocytose, produit une baisse de la capacité phagocytaire de ces cellules, comme montré par la prise de *Staphylococcus aureus* radiomarqués (figure no. 16).

Le % de phagocytose est de 10-12 % après une heure d'incubation, alors qu'il est de 53 % pour le contrôle PBS ; cet indice phagocytaire réduit est quasi constant depuis 15 minutes jusqu'à la fin du test.

Par contre, l'incubation des PMN avec le surnageant de 24 heures ne cause pas d'altération dans leur capacité à ingérer les bactéries radiomarquées puisque la progression de l'indice phagocytaire au cours du temps est la même que celle du contrôle PBS.

##### - La variété human écovar

L'incubation des PMN avec le surnageant d'une culture de 24 heures n'altère pas leur capacité à phagocyter les bactéries radiomarquées. Comme pour le contrôle PBS, la progression de l'indice phagocytaire n'est pas constante au cours du temps (figure no. 15) ; la phagocytose est beaucoup plus rapide au cours des 15 premières minutes (voir tableau ci-dessous) : en effet, la pente entre 5 et 15 minutes est de 3,02 alors qu'elle chute à 0,95 % entre 15 et 30 minutes et à -0,17 % entre 30 et 60 minutes.

Moyenne des pentes aux différents temps du test :

| Human écovar   | Pentes |         |         |
|----------------|--------|---------|---------|
|                | κP5-15 | κP15-30 | κP30-60 |
| Contrôle PBS   | 2,96   | 0,98    | -0,08   |
| Surnageant 24h | 3,02   | 0,95    | -0,17   |

Pour les surnageants de culture de 48 heures et 72 heures, le fait que plus de 90 % des bactéries ne soient pas phagocytées après une incubation d'une heure avec les PMN prouve bien que ces surnageants bactériens ont un effet sur la capacité phagocytaire des PMN.

##### - La variété ovine écovar

Les trois surnageants de la variété ovine écovar exercent un effet anti-phagocytaire sur les PMN in vitro puisque la phagocytose dans les trois cas ne dépasse pas 6 % après une heure, exception faite pour les surnageants de 48 heures et 72 heures, où elle atteint 12-17 % en fin du test (figures nos. 17 et 18).

Photos de PMN incubés dans du PBS (a) et dans du surnageant  
de culture bactérienne (b) au grossissement 100 X  
(coloration avec une solution acridine orange - éthidium bromide)

a)



b)



Cette augmentation de l'indice phagocytaire de +/- 10 % entre 30 et 60 minutes est aussi observée avec le contrôle PBS.

Etant donné que le % de viabilité juste après 60 minutes est de 0 % pour les cellules incubées avec ces surnageants bactériens, il serait logique d'obtenir, pour 30 et 60 minutes, la même valeur pour l'indice phagocytaire de ces cellules.

Donc, cette augmentation de l'indice phagocytaire entre 30 et 60 minutes pourrait être expliquée par une erreur de manipulation dans les lavages des cellules, à la fin du test.

#### 2.4.3. L'effet des surnageants staphylococciques sur la viabilité des PMN

Vu l'effet observé de ces surnageants bactériens sur la viabilité des PMN à la fin du test de phagocytose (voir tableau page 55), il nous est apparu intéressant de suivre cet effet au cours du temps, pour savoir si l'influence exercée par le surnageant sur la viabilité des PMN expliquerait les modifications dans l'allure de la cinétique phagocytaire.

Ainsi, pour chaque surnageant, cette cinétique s'effectue comme suit :

- On incube 2 ml de PMN ( $3 \cdot 10^7$  PMN) avec 2 ml de surnageant étudié à 37°C.
- Aux différents temps d'incubation (0 à 1 heure), on prélève un aliquot et on le dilue volume/volume avec une solution d'éthidium bromide - acridine orange. On détermine la viabilité par comptage des cellules vivantes (qui apparaissent vertes) et des cellules mortes (qui apparaissent rouges) au microscope à fluorescence.

Le tableau de la page suivante reprend, pour chaque surnageant, le % de viabilité obtenu au cours du temps.

Les trois variétés de *Staphylococcus aureus* ont un effet toxique pour les PMN mais à des degrés différents :

- l'effet de la variété ovine écovar est le plus net dans les surnageants de 24, 48 et 72 heures puisqu'après une minute, nous avons 100 % de mortalité
- celui de la variété human écovar débute dès la troisième minute d'incubation pour arriver à 100 % de mortalité après 6 minutes
- pour les surnageants de 48 et 72 heures de la variété bovine écovar, la lyse est moins rapide puisqu'elle commence après 20 minutes avec 43 % de mortalité pour arriver à 93 % après une heure d'incubation.

Le % de viabilité des PMN incubés dans des surnageants bactériens  
au cours du temps :

| Variété staphylococ-<br>cique | Temps d'incubation à 37°C |        |        |        |         |         |
|-------------------------------|---------------------------|--------|--------|--------|---------|---------|
|                               | 0                         | 1 min. | 3 min. | 6 min. | 20 min. | 60 min. |
| <u>Bovine écovar</u>          |                           |        |        |        |         |         |
| surnageant 24h                | 99 %                      | -      | -      | -      | -       | 97 %    |
| surnageants 48 et 72h         | 99 %                      | 97 %   | 96 %   | 97 %   | 57 %    | 7 %     |
| <u>Ovine écovar</u>           |                           |        |        |        |         |         |
| surnageants 24, 48<br>et 72h  | 98 %                      | 0 %    | -      | -      | -       | -       |
| <u>Human écovar</u>           |                           |        |        |        |         |         |
| surnageant 24h                | 99 %                      | -      | -      | 98 %   | -       | 97 %    |
| surnageants 48 et 72h         | 99 %                      | 99 %   | 13 %   | 0 %    | -       | -       |
| Contrôle PBS                  | 99 %                      | -      | -      | 98 %   | -       | 98 %    |

Sur base de ces résultats, nous pouvons dire que les trois variétés staphylococciques produisent un (ou plusieurs) facteur(s) soluble(s) cytotoxique(s) qui semble(nt) agir au niveau de la membrane cellulaire comme mesuré par l'ingestion d'éthidium bromide (chargé positivement à pH 7,4). L'observation microscopique (photos ci-contre) des PMN incubés avec les surnageants bactériens contenant le (ou les) facteur(s) cytotoxique(s) nous révèle un gonflement cellulaire de la plupart des PMN morts encore présents dans cette suspension et une réduction du nombre de PMN dans la suspension cellulaire suite à la lyse complète des PMN.

De plus, quand nous incubons ces variétés staphylococciques pendant 24 à 48 heures à 37°C sur milieu au sang, nous observons une hémolyse totale. Ce qui signifie que dans nos surnageants bactériens, nous avons une hémolysine Alpha présente. Bien sûr, à partir de cette simple expérience (milieu au sang), nous ne pouvons conclure que le facteur soluble cytotoxique pour les PMN soit l'hémolysine révélée sur milieu au sang.

Cependant, sur base d'effets similaires observés sur des granulocytes de lapin et de souris incubés avec des hémolysines staphylococciques purifiées, Gladstone (1957) et Szmigielski (1976) ont suggéré que ces changements cellulaires in vitro provenaient de dommages dans le transport actif du  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^-$  et de la perte d'intégrité de la membrane lysosomale, entraînant des troubles osmotiques dans la cellule.

En effet, vu que ces cellules sont remplies de lysosomes, une perte d'intégrité de ces structures intracellulaires conduirait automatiquement à la lyse cellulaire.

Ainsi, le degré de dommages de ces structures est lié à la perméabilité de la membrane cellulaire, comme mesuré par ingestion d'un colorant vital (Szmigielski, 1976).

Etant donné que le rapport bactéries/PMN donnant une cinétique phagocytaire optimale n'est plus respecté, puisqu'il y a une lyse et une mortalité importantes des PMN, l'activité phagocytaire des quelques PMN encore vivantes est très faible, voire négligeable.

Dès lors, la cinétique de viabilité des PMN incubés avec les surnageants de culture des variétés bovine écovar, human écovar et ovine écovar explique la cinétique phagocytaire de PMN incubés avec ces mêmes surnageants :

- pour bovine écovar, nous observons 57 % de viabilité des PMN après 20 minutes, ce qui explique une activité phagocytaire ne dépassant pas les 12 % ;
- pour human écovar, le % de viabilité des PMN est encore plus faible que celui obtenu pour la variété bovine écovar ; il explique une phagocytose encore plus négligeable que celle avec bovine écovar : de 0 à 3 % de viabilité après une heure à 37°C pour une phagocytose ne dépassant pas les 7 % ;
- pour ovine écovar, une mortalité de 100 % après une minute avec les trois surnageants de culture explique une phagocytose négligeable, dès le début du test de phagocytose.

Ainsi dans ces trois cas (trois variétés), le % de bactéries phagocytées dépend directement de PMN viables, ce qui n'est pas le cas, nous le rappelons, pour les surnageants de *Streptococcus agalactiae*.

#### 2.4.4. L'effet des surnageants staphylococciques sur les bactéries

Vu l'effet du surnageant bactérien sur les cellules, nous nous sommes demandés si le surnageant n'exercerait pas une influence sur l'intégrité de la paroi de *Staphylococcus aureus*.

Pour ce faire, nous avons pratiqué une expérience détaillée ci-dessous :

- On incube volume/volume  $1,5 \cdot 10^8$  bactéries/ml avec un surnageant bactérien ayant un effet cytotoxique sur les PMN, pendant 30 minutes à 37°C, sous agitation.
- Ensuite, le surnageant bactérien est enlevé par centrifugation à 4.500 rpm, pendant 15 minutes, et deux lavages au PBS froid, à la même vitesse, sont effectués.



- Finalement, les bactéries sont resuspendues dans du PBS glacé à la DO correspondant à  $\pm 1,5.10$  bactéries/ml (par spectrophotométrie à 650 nm).
- On incube alors 2 ml de sérum avec les PMN et les bactéries radiomarquées.
- On effectue ensuite les manipulations comme dans le test proprement dit.

Les résultats sont notés dans le tableau ci-dessous et dans la figure no. 19.

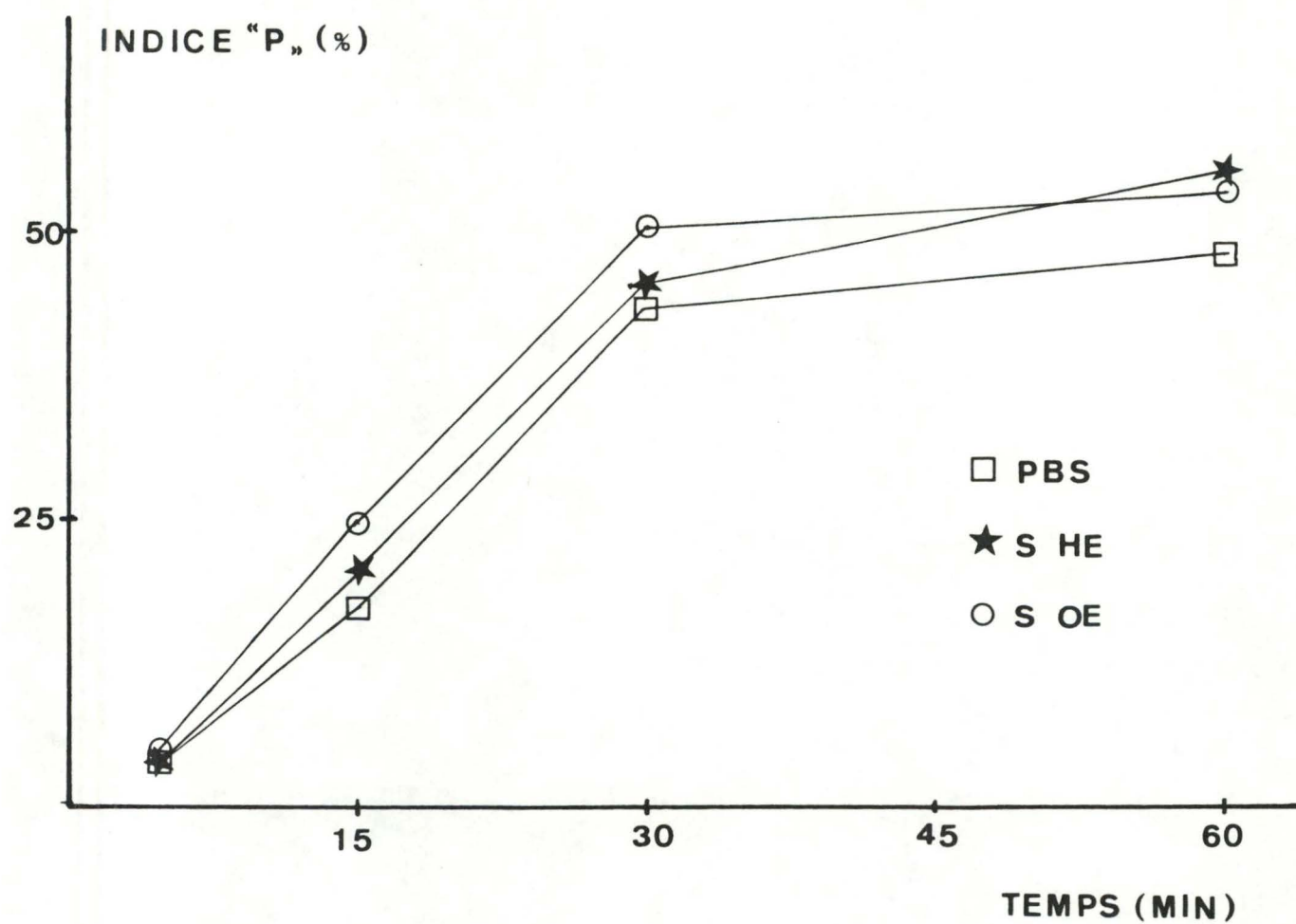
| Préincubation des bactéries dans      | Indice phagocytaire à |                |                |                |
|---------------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
|                                       | 5 min.                | 15 min.        | 30 min.        | 60 min.        |
| PBS                                   | 4,0 $\pm$ 0,3         | 17,8 $\pm$ 0,6 | 43,5 $\pm$ 0,8 | 48,6 $\pm$ 0,4 |
| le surnageant de 72 h de human écovar | 3,6 $\pm$ 0,1         | 21,3 $\pm$ 0,3 | 45,4 $\pm$ 0,9 | 55,6 $\pm$ 0,5 |
| le surnageant de 72 h d'ovine écovar  | 4,5 $\pm$ 0,1         | 25,0 $\pm$ 0,2 | 50,5 $\pm$ 0,4 | 54,0 $\pm$ 0,6 |

Nous observons que les courbes de phagocytose des PMN incubés avec les bactéries prétraitées sont toujours au-dessus du contrôle PBS.

Sur base de cette constatation, nous pouvons suggérer plusieurs hypothèses :

- soit le surnageant bactérien jouerait un rôle opsonisant sur *Staphylococcus aureus* ; ceci est peu probable vu que *Staphylococcus aureus* est sans cela facilement phagocyté par le PMN ;
- soit il contiendrait un facteur bactérien qui entraînerait une modification de la croissance de *Staphylococcus aureus* ; ce comportement différent pourrait aboutir à la formation d'amas bactériens plus importants que lorsqu'elles sont incubées dans du PBS (contrôle), et ceci pourrait intervenir dans la cinétique phagocytaire des PMN.

FIGURE NO. 19 : CINETIQUES DES INDICES PHAGOCYTAIRES DE PMN INCUBES AVEC DES BACTERIES PRETRAITEES AUX SURNAGEANTS STAPHYLOCOCCIQUES



#### 2.4.5. Neutralisation de la leucotoxicité des surnageants par la chaleur et par l'action d'enzymes

1<sup>o</sup>) Des échantillons de surnageants bactériens ayant un effet cytotoxique pour les PMN sont chauffés pendant 2 minutes-30 secondes et 30 minutes à 56°C.

Immédiatement après l'incubation, on les refroidit en les immergeant dans un bain de glace ; un échantillon non chauffé est mis, comme contrôle, dans le bain de glace.

Ensuite, un aliquot de chaque solution est testé avec un volume égal de  $1,5 \cdot 10^7$  PMN à 37°C, pendant une heure.

Après cette période d'incubation, on compte le nombre de cellules vivantes après dilution dans une solution d'éthidium bromide et d'acridine orange.

Ces valeurs de viabilité sont exprimées en % viabilité par la formule :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{\text{nombre de cellules vivantes dans chaque solution}}{\text{nombre de cellules vivantes contenues dans du PBS}} \times 100$$

Etant donné l'effet lytique des surnageants bactériens sur les PMN, le nombre de PMN dans le témoin PBS sera pris comme le nombre total de PMN ajoutés au surnageant bactérien au temps  $t_0$ .

2<sup>o</sup>) Un volume de 0,2 ml de ces mêmes échantillons de surnageants bactériens est ajouté à 0,1 ml d'une solution de 1 mgr/ml de trypsine (pancréas bovine, type III ; Sigma), pronase (grade B, Calbiochem, Los Angeles, California) et lipase (pancréas porcine, type VI ; Sigma).

Les contrôles sont : un contrôle "enzyme", où 0,2 ml de PBS est ajouté à 0,1 ml de chaque solution enzyme ; et un contrôle "surnageant", où 0,2 ml de surnageant est ajouté à 0,1 ml de PBS.

Après une incubation de 30 minutes à 37°C, un aliquot de chaque solution est testé avec un volume égal de  $1,5 \cdot 10^7$  PMN à 37°C, pendant une heure.

Ensuite, on compte le nombre de cellules vivantes comme ci-dessus.

Les résultats de 1<sup>o</sup>) et de 2<sup>o</sup>) sont rapportés dans le tableau repris à la page suivante.

Effet de la température et des enzymes sur la leucotoxicité des surnageants bactériens, exprimé en % de viabilité après 60 minutes :

| Les surnageants staphylococciques ayant un effet leucotoxique | sans traitement | avec traitement à la chaleur |      | avec traitement aux enzymes |         |        |
|---|-----------------|------------------------------|------|-----------------------------|---------|--------|
|   |                 | 2,5'                         | 30'  | trypsine                    | pronase | lipase |
|   |                 |                              |      |                             |         |        |
| Variété bovine écovar   |                 |                              |      |                             |         |        |
| surnageant 48h  | 3-5 %           | 3 %                          | 97 % | 1 %                         | 99 %    | 2 %    |
| surnageant 72h  | 2-3 %           | 3 %                          | 99 % | 0 %                         | 99 %    | 1 %    |
| Variété human écovar  |                 |                              |      |                             |         |        |
| surnageant 48h  | 0 %             | 0 %                          | 96 % | 0 %                         | 96 %    | 0 %    |
| surnageant 72h  | 0 %             | 0 %                          | 97 % | 0 %                         | 95 %    | 0 %    |
| Variété ovine écovar  |                 |                              |      |                             |         |        |
| surnageant 24h  | 0 %             | 0 %                          | 95 % | 0 %                         | 95 %    | 0 %    |
| surnageant 48h  | 0 %             | 0 %                          | 95 % | 0 %                         | 95 %    | 0 %    |
| surnageant 72h  | 0 %             | 0 %                          | 95 % | 0 %                         | 95 %    | 0 %    |

Contrôle enzymes : 96-99 % viabilité

Contrôle PBS : 99 % viabilité

Contrôle RPMI : 98 % viabilité

Sur base de ces résultats, nous pouvons dire que l'effet toxique des différents surnageants de *Staphylococcus aureus* résulte de l'action d'une ou plusieurs substances de nature protéique puisque sensible à la pronase et labile à la chaleur.

Ceci renforce l'hypothèse suggérée précédemment (voir 2.4.3.), à savoir que le facteur soluble cytotoxique pour les PMN serait une des quatre hémolysines staphylococciques connues.

En effet, par cette expérience de neutralisation de l'effet cytotoxique des surnageants, nous montrons que la ou les substance(s) est (sont) de nature protéique. Or, les différentes hémolysines staphylococciques sont de nature protéique.

Cependant, il faudrait purifier la ou les substance(s) ayant un effet sur les PMN et comparer ses propriétés physico-chimiques à celles connues des hémolysines staphylococciques.

#### 2.4.6. Incubation avec un surnageant traité à la pronase

Etant donné que la leucotoxicité des surnageants staphylococciques est neutralisée par incubation avec la pronase pendant 30 minutes à 37°C, il nous est apparu intéressant de démontrer l'inocuité de ce surnageant après traitement à la pronase sur la phagocytose.

Pour ce faire, nous avons, immédiatement après avoir traité le surnageant à la pronase (30 minutes à 37°C), resuspendu les PMN à bonne concentration dans celui-ci.

Les surnageants bactériens utilisés sont les surnageants de 48 et 72 heures de la variété human écovar.

Les résultats sont rapportés dans le tableau ci-dessous et dans la figure no. 20 .

| Milieu d'incubation | Temps (en minutes) |              |              |              |
|---------------------|--------------------|--------------|--------------|--------------|
|                     | 5'                 | 15'          | 30'          | 60'          |
| PBS                 | 7,1 +/- 0,3        | 35,3 +/- 0,8 | 59,4 +/- 1,0 | 51,3 +/- 2,0 |
| S 48h + pronase     | 12,9 +/- 0,4       | 39,5 +/- 0,4 | 55,1 +/- 0,8 | 45,2 +/- 0,9 |
| S 72h + pronase     | 9,6 +/- 0,8        | 33,1 +/- 0,5 | 53,4 +/- 0,7 | 45,8 +/- 1,2 |

Sur base de ces résultats, nous pouvons dire que le surnageant staphylococcique, une fois traité à la pronase, n'agit plus sur l'activité phagocytaire des PMN de bovins.

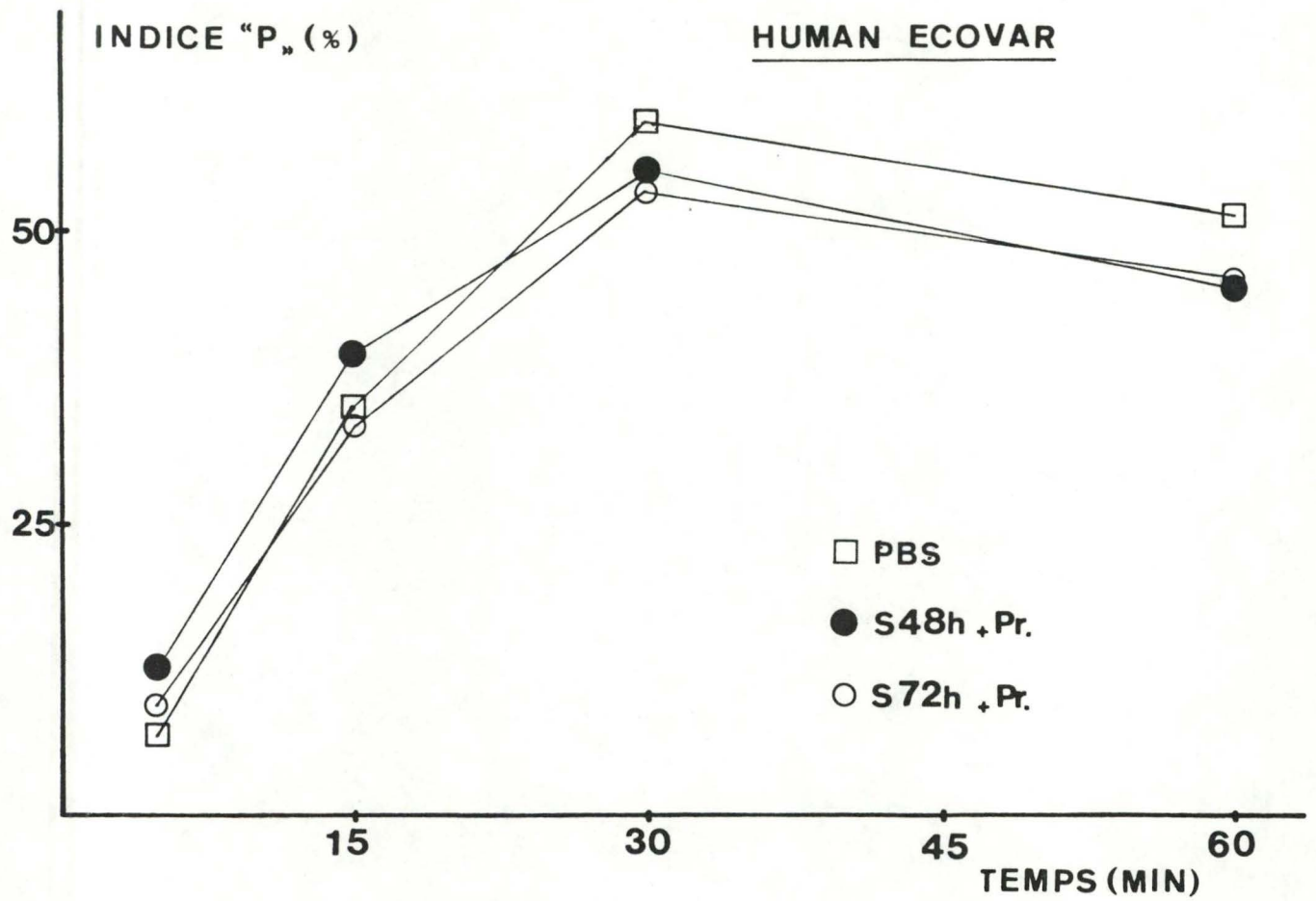


FIGURE NO. 20 : EVOLUTION DANS LE TEMPS DE L'INDICE PHAGOCYTAIRE DE PMN INCUBES DANS DEUX SURNAGEANTS BACTERIENS PRETRAITES A LA PRONASE

---

CONGLUSSION

### CONCLUSION FINALE

Le but de ce travail était de montrer un effet anti-phagocytaire possible de souches bactériennes connues pour engendrer une inflammation mammaire dans le cheptel laitier.

Pour ce faire, nous avons mis au point un test d'incubation des PMN avec les surnageants de culture de cinq souches bactériennes.

Ce test a comme avantages, par rapport à celui utilisé dans les précédents mémoires, d'être plus rapide car il nécessite moins de manipulations et d'être plus précis, comme confirmé par l'analyse statistique : par exemple, l'écart-type des expériences faites par la méthode classique était de +/- 10 % et est seulement de 2 % par la méthode utilisant la thymidine tritiée.

Cependant, il a comme inconvénient majeur une exocytose non négligeable de débris bactériens radioactifs par les PMN : ainsi, la radioactivité dans les PMN, au temps tx, n'est pas égale à la somme de toutes les bactéries radioactives ingérées, depuis le temps to, par les PMN puisque nous avons au cours du temps une libération de la radioactivité intracellulaire à l'extérieur de la cellule.

Malgré cette "fuite" de radioactivité dans le milieu extracellulaire, nous avons pu montrer que :

- Les surnageants de cultures staphylococciques ont un effet sur la fonction phagocytaire des PMN. Celui-ci résulte de la présence dans le surnageant de culture d'un (ou de plusieurs) facteur(s) soluble(s) de nature protéique cytotoxique pour les leucocytes.

La production de cette (ces) toxine(s) est fonction de la phase de croissance du micro-organisme étudié : ainsi, les variétés bovine écovar et human écovar produisent la (les) toxine(s) après 48 heures de culture, tandis que la variété ovine écovar la (ou les) produit déjà après 24 heures de culture.

Etant donné que cette (ces) toxine(s) staphylococcique(s) affecte(nt) les cellules phagocytaires, elle peut être considérée comme étant un des facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*.

- L'absence d'effet toxique des surnageants de culture de *Streptococcus pyogenes* sur les PMN de bovins.
- *Streptococcus agalactiae*, qui est un agent très fréquent de la mammite bovine, diminue l'activité phagocytaire des PMN, sans altérer leur morphologie.



Pour fournir des informations supplémentaires concernant la pathogénie de *Staphylococcus aureus* et de *Streptococcus agalactiae* sur le bétail laitier, il serait intéressant :

- de tester un plus grand nombre de souches bactériennes entraînant des lésions inflammatoires au niveau de la glande mammaire
- d'étudier l'effet de surnageants de telles souches sur le système immunitaire spécifique de l'organisme
- d'isoler et d'identifier cette cytotoxine afin de produire des anticorps monoclonaux contre cet antigène, dans un but thérapeutique chez le bovin
- de modifier cette méthode de travail pour pouvoir dissocier la phagocytose de la bactéricidie ; ainsi, il serait possible de voir si l'effet du surnageant de *Streptococcus agalactiae* sur la phagocytose ne serait pas plutôt dû à une réduction de la capacité bactéricide de la cellule
- d'évaluer les effets de la (ou les) toxine(s) bactérienne(s) sur les activités des PMN autrement que par la phagocytose de bactéries radiomarquées : par exemple, son effet sur le chimiotactisme, sur la chemiluminescence.

# BIBLIOGRAPHIE

## BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON, J.C., Progressive pathology of staphylococcal mastitis with a note on control, immunisation and therapy, *The Vet. Rec.*, 110, 372-376, 1982.
- ARBUTHNOTT, J.P. and al., Bacterial toxins and cell membranes, (edited by J. Jeljaszewicz and T. Wadström, 1978).
- BAGGIONI, M. and al., *J. coll. Biol.*, 45, 586-597, 1970.
- BLOOD, D.C., HENDERSON, J.A., La mammite, *Médecine vétérinaire*, 293-313, 1976.
- BOGGS, D.R., Physiology of neutrophil proliferation, maturation and circulation, *Clin. Haematol.*, 4, 535-551, 1975.
- BRUYNOGHE, G., Cours de microbiologie médicale et d'immunologie, Institut Saint-Laurent, Liège, 1973.
- CARLSON and KANEKO, Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood, *Proc. Soc. exp. biol. med.*, 142, 853-856, 1973.
- CAVALIERI, S.J. and SNYDER, I.S., Effect of *Escherichia coli* alpha-hemolysin on human peripheral leukocyte viability in vitro, *Infection and Immunity*, Vol. 36, N° 2, 455-461, May 1982.
- COHN, Z.A., MORSE, S.I., Interactions between rabbit polymorphonuclear leukocytes and staphylococci, *J. Exp. Med.*, 110, 419, 1959.
- DEPELCHIN, A., Cours d'immunologie, FNDP Namur, 1985.
- DEPELCHIN, A., Cours de microbiologie générale, FNDP Namur, 1984.
- FEYTMANS, E., Cours de statistique (première licence), FNDP Namur, 1986.
- GALLEZ, B., Mémoire : Héritabilité des capacités phagocytaires et bactéricides des polymorphonucléaires sanguins chez les bovins bleu blanc belge, FNDP Namur, 1981.
- GRANVILLE, A., Précis d'hygiène du lait, Faculté de médecine vétérinaire, CUREGHEM ; 1966.
- GUIDRY, A.J., M S, and PAAPE, M.J., Ph D, Effect of bovine neutrophil maturity on phagocytosis, *Am. J. Vet. Res.*, 37, 703-705, 1976.
- HABER, F. and WEISS, J., *Proc. R. Soc. Lond. A.*, 147, 332-351, 1981.
- HIRSH, R.L., The complement system, *Microbio. Rev.*, Vol. 46, N° 1, 71-85, Mar. 1982.

- JAIN, N.C., Neutrophil leukocytes and inflammation of the bovine mammary gland, *The-riogenology*, Vol. 6, N° 2-3, 153-168, 1976.
- JAIN, N.C., LASMANIS, J., Phagocytosis of serum-resistant and serum-sensitive coli-form bacteria by bovine neutrophils from blood and mastitic milk, *Am. J. Vet. Res.*, 39, 425, 1978.
- JANZEN, J.J., *J. Dairy Sci.* 53, 1151, 1970.
- JAWET, Z.E. and al., *Coccus pyogènes, dans : Microbiologie médicale*, Presses de l'U-niversité Laval, 1976.
- KLEBANOFF, S.J., Cytocidal mechanisms of phagocytic cells, *Immunology* 80 (edited by Fongereau et Dausset), J. Academic Press, 1980.
- LEIJH, P.C.J. and al., Participation of Ig and complement components in the intra-cellular killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by human gra-nulocytes, *Infection and Immunity*, Vol. 33, N° 3, 714-724, Sept. 1981.
- LETESSON, J.J. and al., Etude de la sensibilité et de la reproductibilité de tests standardisés pour la mesure des capacités phagocytaires et bactéricides des polymorphonucléaires sanguins chez les bovins, *Ann. Méd. Vét.*, 126, 631-643, 1982.
- LOSTRIE-TRUSSART, N. and al., Etude des fonctions phagocytaire et bactéricide des polymorphonucléaires sanguins chez des taureaux et leurs produits mâles dans la race bleu blanc belge, *Ann. Méd. Vét.*, 128, 125-134, 1984.
- MASSON, P.L. and al., *J. Exp. Med.*, 130, 643-658, 1969.
- MICHELL, R.H. and al., Measurement of rates of phagocytosis : the use of cellular monolayers, *J. Cell. Biol.*, 40, 216, 1969.
- MIMS, C.A., *The pathogenesis of infections disease*, J. Academic Press, 47-90, 1977.
- MURPHY, J.M., STUART, O.M., *Cornell Vet.*, 44, 139, 1954.
- MURPHY, J.M., *Cornell Vet.*, 49, 411, 1959.
- NAIDU, T.C. and NEWBOULD, F.H.S., Glycogen in leukocytes from bovine blood and milk, *Can. J. Comp. Med.*, 37, 47-55, 1973.
- NAKAI, T. and al., Characterisation of the hemolysin produced by *Haemophilus pleuro-pneumoniae*, *Am. J. Vet. Res.*, Vol. 44, N° 2, 344-347, Febr. 1983.
- NEWBOULD, F.H.S., NEAVE, F.K., The recovery of small numbers of *Staphylococcus au-reus* infused into the bovine teat cistern , *J. Dairy Res.*, 32, 157-162, 1965.

- OFEK, I. and al., Oxygen-stable hemolysins of group A Streptococci, *Infection and Immunity*, Vol. 6, N° 4, 459-464, Oct. 1972.
- OLMSTEAD, J.B. and al., Microtubules, *Am. Rev. Bioch.*, 42, 507-540, 1973.
- PAAPE, M.J. and al., Effect of fat and casein on intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by milk leukocytes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 155, 588-593, 1977.
- PAAPE, M.J. and al., Phagocytic defense of the ruminant mammary gland, from : the ruminant immune system (edited by John E. Butler, 1981).
- PATTISON, I.H., *Vet. Rec.*, 70, 114, 1958.
- REINITZ, D.M. and PAAPE, M.J., Deficiency in the lowering of pH within phagosomes of milk polymorphonuclear leukocytes following phagocytosis, *J. Dairy Sci.*, 62, 122, 1979.
- REMACLE, J., *Cours de techniques biochimiques*, FNDP Namur, 1984.
- ROGOLSKY, M., Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*, *Microbio. Rev.*, Vol. 43, N° 3, 320-360, Sept. 1979.
- ROTH, J.A., KAEBERLE, M.L., Evaluation of bovine polymorphonuclear leukocyte function, *Vet. Immunol. Immun.*, 2, 157-174, 1981.
- RUSSEL, M.W., REITER, B., Phagocytic deficiency of bovine milk leucocytes : an effect of casein, *J. Reticuloendothel. Soc.*, 18, 1-13, 1975.
- SCHALM, O.W., *Vet. Med.*, 39, 279, 1944.
- SCHALM, O.W. and al., Effects of pre-existing leukocytosis on experimental coliform mastitis in cattle, *Am. J. Vet. Res.*, 25, 83-89, 1964.
- SCHALM, O.W. and al., Significance of leukocytic infiltration into the milk in experimental *Streptococcus agalactiae* mastitis in cattle, *Am. J. Vet. Res.*, 27, 1537-1546, 1966.
- SCHALM, O.W. and al., Conversion of chronic staphylococcal mastitis to acute gangrenous mastitis after neutropenia in blood and bone marrow produced by an equine anti-bovine leukocyte serum, *Am. J. Vet. Res.*, 37, 885-890, 1976.
- STJERNHOLM, R.L. and al., Impaired chemiluminescence during phagocytosis of opsonized bacteria, *Infect. Immun.*, 7, 313, 1973.
- STOSSEL, T., Phagocytosis (First and second of three parts), *The New England Journal of Medicine*, Vol. 290, N° 13 et 14, 717-723 et 774-780, 1974.

- STOSSEL, T. and HARTWIG, J., Interactions between actin, myosin, and an actin-binding protein from rabbit alveolar macrophages, *J. Biol. Chem.*, Vol. 250, N° 14, 5706-5712, 1975.
- SZMIGIELSKI, S. and al., In "Staphylococci and staphylococcal diseases" (ed. by J. Jeljaszewicz), 691-706 and 773-782, 1976.
- TOUSSAINT, N., MARCHAL, Cours de systématique bactérienne, Institut Saint-Laurent, Liège, 1981.
- VAN FURTH, R., VAN ZWET, T.L., In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes in : "Handbook of Experimental Immunology" D.M. Weir, ed., Blacwell Scientific. Publication, Oxford, 3e ed., P 36, 1978.
- VERHOEF, J. and al., Kinetics of staphylococcal opsonisation, attachment, ingestion and killing by human polymorphonuclear leukocytes : a quantitative assay using <sup>3</sup>H-Thymidine labeled bacteria, *J. Immunol. Meth.*, 14, 303-311, 1977.
- VRAY, B. and al., A new quantitative fluorimetric assay of phagocytosis of bacteria, *Scand. J. Immunol.*, 11, 147, 1980.
- WATSON, D.L., Enhancement of in vitro phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear leucocytes, *Res. Vet. Sci.*, 19, 288-292, 1975.
- WATSON, D.L., PRIDEAUX, J.A., Comparaisons of *Staphylococcus aureus* grown in vitro or in vivo, *Microbiol. Immunol.*, Vol. 23, 543-547, 1979.
- WERGIN, W.P., PAAPE, M.J., Structure of polymorphonuclear leukocytes isolated from bovine blood and milk, *J. Cell Biol.*, 75, 102a, 1977.
- WILKINSON, B.J. and al., Cryptic peptidoglycan and the antiphagocytic effect of the *Staphylococcus aureus* capsule : model for the antiphagocytic effect of bacterial cell surface polymers, *Infection and Immunity*, Vol. 23, N° 2, 502-508, Feb. 1979.
- WILLIAMS, M.R., BUNCH, K.J., Variation among cows in the ability of their blood polymorphonuclear leucocytes to kill *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Res. Vet. Sci.*, 30, 298-302, 1981.
- WILLIAMS M.R. and al., The relationship between phagocytosis and intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils, *Br. Vet. J.*, 141, 362-370, 1985.

- WILSON, C.D., SALT, G.F.H., Streptococci in animal disease, ed. F.A. Skinner and L.B. Quesnel 7th, 143-149, 1978.
- WISEMAN, G.M., The hemolysins of Staphylococcus aureus, Bacteriol. Rev., Vol. 39, N° 4, 317-344, Dec. 1975.
- ZIGMOND, S.H. and al., Cytocholosine B and polymorphonuclear leukocytes locomotion, phagocytosis and glycolysis, Exp. Cell. Res., 73, 383-393, 1972.
- GLADSTONE, G.P., VAN HEYNINGEN, W.E., Br. J. exp. Path., 38, 123-137, 1957.