comme phosphates tricalcique et trimagnésien, il reste encore 3 % de chaux, qui est lié probablement à la caséine.

Ce calcul est chargé d'une faute, parce qu'une petite quantité de phosphore appartient à la caséine et pendant la calcination se transforme en acide phosphorique, qui se combine aux bases ci-dessus mentionnées.

2° La petite quantité de fer est à l'état insoluble, probablement comme phosphate.

3° L'anhydride de l'acide sulfurique dans la partie indialysable a son origine dans les matières protéiques.

MÉTHODE D'EXPERTISE DES PRÉPARATIONS PHARMACEUTIQUES DITES « FERMENTS LACTIQUES »

par J. MAHEU,

Docteur ès-sciences, Pharmacien de 1^{re} Classe,

Docteur en médecine,

Chef du service micrographique et bactériologique du laboratoire d'Etudes et d'Analyse
(Faculté de Pharmacie de Paris)

C'est au professeur HAYEM que nous devons le moyen de réaliser sans danger l'antisepsie intestinale. Cette action démontrée par HAYEM a été contrôlée par GRUNDZACH, SCHMITZ et SINGER. Mais ce fut METCHNIKOFF qui, en 1904, laissa entrevoir la possibilité du lutter contre la fermentation intestinale en ensemençant l'intestin avec des cultures de bacilles lactiques : « Remplacement de la flore intestinale nuisible par une flore bactérienne nouvelle et éminemment favorable ».

Mais le choix des espèces lactiques ne saurait être indifférent, les bacilles sélectionnés devant produire la plus grande quantité possible d'acide lactique pour obtenir le maximum de rendement. Il y avait donc lieu d'examiner les méthodes destinées à juger la valeur médicamenteuse de ces préparations. Nous exposons ici le résumé de nos recherches (1). La possibilité de faire fermenter le lactose étant ici beaucoup plus important à établir que la nature des ferments employés, cette étude comprenait donc deux sortes de recherches :

(1) J. MAHEU. — Essai bactériologique et chimique des opérations pharmaceutiques dites « Ferments lactiques ». Paris 1921. Dépôt : Lefrançois, Rue Casimir Delavigne, Paris.

1° Isolement, détermination et étude des espèces produisant la fermentation.

2° Production de l'acide lactique et son dosage.

I. — **Essai bactériologique.**— Il doit mettre en évidence :

A.— L'existence de ferments lactiques vivants.

B.— L'absence d'impuretés nuisibles (microbes protéolytiques ou producteurs d'acides gras).

A.— L'existence de ferments lactiques vivants sera constatée :

S'il s'agit de *B. bulgare* par ensemencement sur le lait écrémé stérilisé, et cultivé à la température 38-40°. Il pousse *très mal* sur les milieux artificiels et exige un certain entraînement pour pousser dans ces milieux.

Pour identifier le *B. bulgare*, il faudra ensemençer sur gélose sucrée en profondeur pour cultiver en anaérobie.

S'il s'agit de ferments lactiques indigènes (*Streptocoques*, *B. acidi lactici*, etc...) l'ensemencement sera fait dans du lait stérile écrémé ou non. Culture à 35°. On identifiera ensuite en cultivant en surface sur gélose glucosée et maltée.

B. — L'absence d'impuretés nuisibles est visible par examen direct. En effet, les lactiques vrais font cailler le lait sans que sa surface présente ni boursouflures, ni traces de peptonisation, au moins pendant les trois ou quatre premiers jours de culture, car, à la longue, le caillé se sépare et est surnagé par une couche légère de sérum. Si le caillé présente un aspect anormal, faire des ensemencements en gélatine et en gélose, en surface et en profondeur. Les échantillons à examiner sont ensemencés sur le bouillon de malt, préparé de la façon suivante :

a) Faire bouillir pendant un quart d'heure :

Tourillon d'orge.....	30 gr.
Eau distillée.....	1 lit.

b) Filtrer sur coton et ajouter :

Peptone.....	10 gr.
Lactose.....	20 gr.

c) Faire dissoudre, filtrer, répartir dans des ballons de 100 cm³, ajouter dans chaque ballon 3 gr. de carbonate de chaux précipité,

d) Stériliser à l'autoclave à 110°.

Lesensemencements sont faits avec les comprimés flambés, ou par 1 cm³ de bouillons liquides. Toutes les espèces développées sont séparées par ensemencements en gélatine sur boîte PÉTRI. On pourra même faire la numération des bacilles lactiques existants par cm³.

Dans quelques cas très rares, les cultures sont demeurées tout-à-fait stériles (1 échantillon).

Un grand nombre de comprimés examinés ne renferment que deux saprophytes (15 échantillons).

1° *Bacillus subtilis* et 2° *Bacillus mesentericus*, espèces absolument inactives sur le lactose. Dans d'autres échantillons, on observe des espèces du groupe des bactéries lactiques. Tantôt ce sont des espèces bien définies répondant au *Bacillus Bulgaricus* (10 échantillons), au *Bacillus bifidus* et même *B. acidophilus* ; ou bien ce sont des espèces représentant les ferments lactiques normaux du lait indigène et constituées par les variétés de *Bacillus* lactiques, de *Streptocoques* lactiques ou même de levures (9 marques).

Parfois, nous avons pu isoler de certains comprimés les espèces constituantes du Képhir: *Bacillus Caucasicus* Kern (*Dispora caucasica*), Levures, etc. (3 échantillons).

Les préparations liquides cultivent toujours, elles renferment du *Bacillus Bulgaricus*, du *Bacillus bifidus* ou du *Bacillus acidophilus*. D'autres sont des symbioses de *Bacillus lacticus* de Pasteur et de *streptococcus acidi lactici*. Toutes ont donné des cultures pures, pas de saprophytes.

On se rend compte de la valeur du ferment lactique commercial en faisant cultiver ce dernier dans un bouillon approprié en présence de lactose et de carbonate de chaux. L'acide lactique formé pendant la culture solubilise une partie du carbonate de chaux. On dose la chaux solubilisée et l'on calcule à l'aide du poids de chaux trouvé la quantité d'acide formé.

Minimum imposé : la culture doit fournir un minimum de 10 gr. d'acide lactique par litre après 48 heures à l'étuve à 37° pour les préparations liquides, 5 gr. pour les comprimés.

Cette méthode n'est qu'approximative, car en réalité, dans la fermentation du lactose, il ne se produit pas seulement de l'acide lactique, mais aussi d'autres acides, comme l'acide succinique, etc.. Elle donne cependant des résultats sensiblement identiques avec les

mêmes produits, elle permet en tous cas de déceler les cas suivants qui peuvent se rencontrer :

- 1° Un produit absolument stérile par manque d'ensemencement.
- 2° Un produit, qui tout en cultivant ne contient pas de ferment.
- 3° Les préparations ne donnant qu'une quantité trop faible d'acide lactique.

Il y a donc lieu pour chaque préparation de rechercher :

- 1° La présence de l'acide lactique.
- 2° La quantité produite rapportée au litre de culture.

Pour chaque échantillon de produit sec, on sème 0 gr.,50 de comprimés ou 0,50 de poudre, correspondant tantôt à un, tantôt à deux comprimés, dans 100 cm³ de bouillon de touraillon contenant 3 gr. de carbonate de calcium ; pour les préparations liquides, 1 cm³ de bouillon à analyser. Chaque ballon ensemencé avec les comprimés préalablement pulvérisés, la poudre ou le liquide est maintenu 48 heures à l'étuve à 37°. On a soin d'agiter de temps en temps, toutes les trois ou quatre heures, de manière à donner une culture plus uniforme. Lorsque les 48 heures de culture sont écoulées, les ballons sont chauffés 10 minutes à l'ébullition, pour coaguler les matières albuminoïdes, puis filtrés. Le chauffage diminue un peu la quantité de carbonate de chaux, mais le dosage est opéré sur un ballon témoin ; les résultats sont comparables, d'autant qu'une partie de la chaux a pu être dissoute par l'autoclave, indépendamment de celle dissoute par l'acide lactique produit :

Sur chaque ballon on procède aux opérations suivantes :

- 1° Recherche qualitative de l'acide lactique.
- 2° Dosage de ce dernier.

A. — *Recherche qualitative de l'acide lactique.* — Sur le liquide de culture relativement peu coloré par les méthodes suivantes :

a) Par le réactif d'UFFELMANN :

Eau phéniquée à 1/100.....	20 cm ³
Perchlorure de fer	1 goutte

Dans un petit verre à expérience, 10 cm³ de réactif sont additionnés de V à X gouttes de bouillon de culture. La réaction positive donne une couleur jaune dont l'intensité varie avec la force de la réaction.

b) Par la réaction de l'iodoforme. — Un centimètre cube de bouillon est additionné de 1 cm³ de solution iodo-iodurée. On ajoute un peu de soude. La réaction varie depuis la production d'odeur d'iodoforme, jusqu'à la formation d'un précipité abondant. Dans les cas douteux, l'on pourra s'assurer que l'on a bien à faire à l'acide lactique de la façon suivante : On évaporera l'éther à basse température et sur le résidu, on pourra faire les réactions caractéristiques de l'acide lactique, comme précédemment : par la réaction de Berg au perchlorure de fer, etc. On les obtient d'ailleurs très facilement avec les bonnes cultures.

La réaction de l'iodoforme est la plus constante et concordante. Dans certains cas où l'acide lactique est abondant, la réaction d'UFFELMAN était parfois faible, tandis qu'un abondant précipité d'iodoforme était obtenu.

B. — *Méthode de dosage de l'acide lactique formé employé dans nos recherches.* — Les bouillons ont été additionnés de 3 gr. de carbonate de chaux pour 100 cm³ ; à mesure que l'acide lactique se produit par la fermentation, il dissout le carbonate de chaux, en donnant du lactate de chaux soluble, de sorte que la quantité de chaux dissoute est équivalente, au point de vue chimique, à la quantité d'acide lactique produit.

Un dosage de la chaux dissoute conduira à la connaissance de la quantité d'acide lactique formé.

La chaux dissoute par l'acide lactique produit est précipité par l'oxalate d'ammoniaque, et l'oxalate de chaux décomposé donne de l'acide oxalique qui sera dosé par une solution titrée de permanganate de potasse.

A 50 cm³ de bouillon filtré et maintenu à l'ébullition, acidifié par 2 cm³ d'acide acétique, on ajoute 30 cm³ d'une solution décimale d'oxalate d'ammoniaque (7,50 par litre).

La chaux, précipitée à l'état d'oxalate, est recueillie sur un petit filtre sans plis, on lave l'oxalate de chaux à l'eau froide : puis, après avoir percé le filtre, on entraîne la matière par un jet de pissette, dans une fiole conique. On lave le filtre d'abord avec 10 cm³ d'une solution d'acide sulfurique au 1/10, puis à l'eau pour entraîner les dernières traces.

L'acide sulfurique décompose l'oxalate de calcium. Il se forme du sulfate de calcium insoluble, tandis que l'acide oxalique mis en li-

berté reste dans la solution. Cette dernière trouble en raison de la présence du sulfate de chaux produit, est portée au bain-marie à 60°.

On dose alors, dans la solution, la quantité d'acide oxalique produit. On fait tomber goutte à goutte la solution décinormale de permanganate de potasse (3,16 par litre) jusqu'à coloration rose, ne disparaissant pas par un nouveau chauffage au bain-marie.

On note le nombre de centimètres cubes employés.

Calculs.— L'expérience donne :

1° Le nombre de cm³ de solution de permanganate de potasse employés pour doser la chaux dissoute dans le ballon témoin non ensemencé.

2° Le nombre de centimètres cubes de solution de permanganate de potasse employés pour doser la chaux dissoute dans le ballon ensemencé ayant cultivé.

Sachant que 1 cm³ de solution de permanganate de potasse = 0,009 d'acide lactique (1), la différence entre le nombre de centimètres cubes de solution de permanganate employés dans le ballon de culture et le nombre employé pour le ballon témoin..... multiplié par 0,009 donne pour 50 cm³ de culture, la quantité d'acide lactique produit.

En multipliant par 20, on ramène facilement au litre :

Exemple : 1° témoin : 3 cm³ 8 de permanganate.

2° culture : 27,4.

$$27,4 - 3,8 = 23,6 \times 0,009 \times 20 = 4 \text{ gr.,}248$$

Acide lactique = 4 gr.,248 par litre.

Il y a toujours eu concordance entre les résultats bactériologiques et la quantité d'acide lactique produit.

Les comprimés ne renfermant que *Bacillus subtilis* ou *B. mesentericus*, ne produisent que des doses infimes d'acide lactique (acide lactique par litre formé en 48 heures : 0,720, 0,216, 0,090).

(1) 1 centimètre cube de permanganate $\frac{N}{10}$ = 0 gr.,009 d'acide lactique. Cela résulte de ce qu'un litre de permanganate normal oxyde un équivalent d'acide oxalique pesant 45 $\frac{(90)}{2}$ et de ce que dans les réactions successives qui ont été employées au cours de l'analyse, cet équivalent d'acide oxalique s'est substitué vis-à-vis du calcium à son équivalent d'acide lactique à 90, les liqueurs titrées étant encore basées sur le système des équivalents.

Pour les produits secs, les 46 échantillons examinés ont donné les résultats suivants :

10 variétés de comprimés : moins de			0,50 d'acide lactique par litre en 48 h.			
6	—	—	1 gr.	—	—	—
4	—	—	1 à 2 gr.	—	—	—
1	—	—	2 à 3 gr.	—	—	—
6	—	—	3 à 4 gr.	—	—	—
3	—	—	4 à 5 gr.	—	—	—
9	—	—	5 à 6 gr.	—	—	—

Mais ce sont les comprimés contenant les mélanges de ferments normaux (*Bacillus lacticus*, *Bacillus Bulgaricus*, *Streptocoques lactiques*) qui donnent le maximum de rendement. Trois variétés de comprimés donnent plus de 6 gr. par litre d'acide lactique en 48 heures. Une préparation belge a donné 28 gr. par litre et deux françaises, 27 et 31 grammes.

Les préparations lactiques liquides nous ont donné par litre sur 18 analyses :

9 échantillons : plus de 30 gr. d'acide lactique en 48 heures.					
3	—	au-dessus de 25 gr.	—	—	—
1	—	au-dessus de 20 gr.	—	—	—
3	—	au-dessus de 15 gr.	—	—	—
2	—	néant.			

Sauf ceux accidentellement stériles, aucun ne nous a donné moins de 15 grammes. Leur conservation est longue, toujours supérieure à 4 mois, donnant en 48 heures de culture, plus de 15 grammes d'acide lactique par litre. Les cultures liquides nous semblent donc les meilleures modes d'administration médicale des ferments lactiques quand on ne craint pas de faire ingérer d'assez grandes quantités d'acide lactique que les cultures contiennent toujours. Les comprimés ont par contre cet avantage d'être très peu acides au moment de l'ingestion, l'acidité n'étant créée que dans l'intestin.

Seuls, les comprimés de ferments lactiques bien préparés pourront être employés. Ces préparations sont très variables et ce n'est que par la surveillance des produits livrés qu'ils peuvent continuer à offrir de l'intérêt. Les bacilles qu'ils contiennent doivent demeurer vivants; car comme le disait METCHNIKOFF (1), « dans la lutte contre les putréfactions intestinales, au lieu d'administrer l'acide lactique en

(1) METCHNIKOFF. — Essais optimistes 1907, page 223.

nature, il faut introduire dans l'organisme des *cultures de microbes lactiques*. Puisque ces bactéries *s'acclimatent* dans le tube digestif de l'homme, y trouvent des matières sucrées *pour leur entretien*, elles peuvent produire leurs substances désinfectantes et servir pour le bien de l'organisme qui les entretient ».

D'après nos recherches et celles de nos prédécesseurs, un grand nombre de préparations lactiques sont totalement dépourvues de pouvoir thérapeutique.

Toutes ces préparations devront être soumises au contrôle bactériologique et être l'objet d'une surveillance sévère et permanente, étant donné l'extension que la bactériothérapie ne peut manquer de prendre tant par l'emploi des ferments lactiques que par celui d'autres microbes.

D'après Albert BERTHELOT (1), ces cultures ne devraient être considérées comme assez actives que lorsqu'elles sont susceptibles de déterminer à la dose de $1/2 \text{ cm}^3$ la coagulation de 10 cm^3 de lait en 24 heures à 37° .

Pour nous, il y a lieu d'exiger la production de 5 grammes d'acide lactique par litre de bouillonensemencé avec 5 grammes de comprimés en poudre et 10 grammes pour les cultures de préparations liquidesensemencées avec 1 cm^3 de liquide, après 48 heures de culture à 37° .

Le fait de la prise en gelée du lait avec une surface nette démontre à lui seul que le milieu contient à ce moment de 5 à 6 grammes p. 1.000 d'acide lactique. Constater également qu'il n'y a pas de quantité notable d'acide butyrique, acétique ou d'alcool. Pour les préparations destinées au traitement de l'appareil digestif, on est en droit d'exiger une grande richesse en ferments lactiques actifs, l'absence de bactéries pathogènes, mais on peut tolérer la présence de micro-organismes saprophytes (comprimés, bouillons, etc.).

Pour celles destinées au traitement des rhinites, sinusites, métrites, au pansement des plaies, on devra être inflexible et n'admettre que des cultures bactériologiquement pures de ferments lactiques en pleine activité. Il n'y a donc pas lieu ici de s'occuper des laits caillés et des comprimés, leur nature même leur interdisant toute autre destination que le traitement des affections de l'intestin. Nous devons également signaler que l'action de la compression trop

(1) A. BERTHELOT. — Nouvelles applications à la bactériothérapie lactique. *Revue de Médecine*, Août 1910.

forte peut détruire une partie des bacilles employés. Il faudra dans la fabrication des comprimés recourir à la pression la moins forte et supprimer les broyages mécaniques trop violents. Enfin attirons l'attention sur l'action de l'air sur les ferments, la disparition de ces derniers à la surface dans les poudres, l'intérêt qu'il y aurait à maintenir ces poudres à l'abri de l'air et peut-être à pratiquer l'enrobage des comprimés.

Il reste encore de nombreuses expériences physiologiques à réaliser, notamment en ce qui concerne l'action thérapeutique des bacilles non vivants, question déjà amorcée par BELONOWSKI (1).

BIBLIOGRAPHIE ANALYTIQUE

1^o LIVRES.

Jean CHAILLOU. — **Le nouveau-né doit être nourri exclusivement de lait.** *Thèse Méd., Bordeaux, 1920-21.*

L'auteur s'efforce de démontrer que, si l'idéal est de donner au nourrisson exclusivement le lait maternel, quand cet idéal est irréalisable pour des raisons sociales ou maternelles, l'allaitement mixte constitue le meilleur procédé d'alimentation.

Il fait la critique des diverses méthodes d'alimentation artificielle : lait bouilli, lait pasteurisé, lait condensé, etc. Leur inconvénient commun est de ne pas fournir à l'organisme de l'enfant les ferments solubles particuliers à l'espèce, et que seul contient le lait humain. Ces ferments solubles agissant à petites doses, il suffira que l'enfant absorbe une petite quantité de lait maternel pour se développer normalement.

On trouvera dans la seconde partie de cette thèse, l'étude des mesures prises par les Pouvoirs publics de Bordeaux pour protéger les femmes enceintes et les nourrissons.

D^r COURBIN.

D^r BICH. — **Traitement des affections oculaires par les injections sous cutanées de lait stérilisé.** *Thèse Méd., Bordeaux, 1920-21.*

L'auteur rapporte 7 observations nouvelles sur cette méthode, aujourd'hui bien connue.

La lactothérapie ne donne pas de résultats dans les lésions non inflammatoires et dans les affections oculaires de nature nettement tuberculeuse.

(1) BOLONOWSKI. — Influence du ferment lactique sur la flore intestinale de la souris, (*Annales Institut Pasteur*, 1907, page 991).