

génitaux de la femelle seraient résorbés, puis passeraient dans le sang et iraient exciter la glande mammaire. Mais, plus tard, KAHN ayant observé que la même chienne, sans qu'elle ait été saillie de nouveau lors des ruts ultérieurs, avait pourtant donné du lait au bout de huit semaines après le rut, abandonna l'explication première et conclut que la sécrétion des glandes mammaires se déclanche sous l'effet de quelques produits endogènes ou ayant la matrice comme origine et qui agissent spécifiquement sur les organes sexuels. Puis, il estime que ces produits ne suffisant toujours pas, il peut intervenir également des facteurs exogènes ayant leur source dans l'œuf fécondé, dans l'embryon. Toutefois, il n'estime pas indispensable que leur association ait toujours lieu.

On ne peut pas concevoir qu'il y ait fatalement une relation entre la sécrétion du lait chez les chiennes non fécondées et l'utérus, alors même qu'il y ait des symptômes de pseudo-gestation. Lorsque la sécrétion des glandes mammaires s'observe chez des chiennes dont la matrice a été extirpée, on peut expliquer la sécrétion du lait par une action de l'ovaire d'abord, spécialement du corps jaune (*corpus luteum*) ou encore de la glande interstitielle et également d'autres organes, ainsi que nous le montrerons ultérieurement.

(A suivre.)

UN PROCÉDÉ SIMPLE POUR LA COLORATION DES SPORES

Avec une planche en couleurs

Par le Dr. W. DORNER

Ingénieur agronome attaché à l'Etablissement fédéral d'industrie laitière et de bactériologie
à Liebefeld-Berne. Chef : M. le prof. Dr. R. BURRL

Nous avons déjà donné une description succincte de notre procédé en 1922 dans l'édition allemande de *l'Annuaire agricole de la Suisse*. Dès cette époque, nous avons eu maintes fois l'occasion de l'expérimenter. Il en est résulté quelques constatations intéressantes, que nous voulons soumettre aux lecteurs de *Le Lait*, sur la demande de M. le professeur PORCHER, son rédacteur en chef.

On sait que les spores des bactéries se présentent, examinées à l'état frais, dans la goutte pendante ou entre lame et lamelle sous forme de corpuscules fortement réfringents qui paraissent, suivant la mise au point du microscope, soit brillants et lumineux, soit sombres. Or il arrive que certains bacilles contiennent des granulations, le plus souvent des substances de réserve, qui ressemblent à première vue à des spores. Le but de la coloration des spores est de permettre au bactériologiste de s'assurer qu'il ne confond pas les spores avec ces granules fortement réfringents. Pour l'enseignement

aussi, le professeur a souvent besoin de préparations plus claires que celles obtenues sans coloration préalable.

Vu leur constitution chimique, les différentes parties de la cellule microbienne ne réagissent pas toutes de la même façon avec les colorants. Selon de récentes recherches, la faculté des bactéries ou parties de bactéries de prendre un colorant donné dépend en partie du point iso-électrique de leur protéine. C'est pourquoi on peut différencier les spores, les substances de réserve, etc., en employant des colorants et des procédés appropriés.

Notre procédé emprunte la technique de deux procédés de coloration bien connus que nous voulons examiner rapidement. C'est d'abord le procédé dit « à l'encre de Chine » du professeur BURRI. Dans sa première publication (BURRI R., *Das Tuscheverfahren*, Iéna, 1909, G. FISCHER), déjà BURRI avait forgé l'expression « coloration négative ». Cette appellation est d'autant mieux à sa place que dans le cours des années, on a renoncé dans certains cas à l'encre de Chine que l'on a remplacée par d'autres colorants. La coloration négative de BURRI se distingue par le fait que les microbes eux-mêmes ne sont pas colorés et baignent dans une nappe foncée, dont ils se détachent avec une remarquable netteté par suite de leur transparence. C'est donc bien le contraire des procédés ordinaires où les microbes sont colorés sur fond clair. Par suite de la mauvaise qualité de l'encre de Chine, pendant et après la guerre, on l'a remplacée par un autre produit, la nigrosine B de Gruebler, en solution aqueuse saturée. La nigrosine est supérieure à l'encre de Chine à certains égards. Comme il s'agit d'une solution et non d'une suspension, comme l'encre de Chine, elle se présente, même sous les plus forts grossissements, sous forme de nappe parfaitement homogène. En outre la nigrosine ne se coagule pas comme l'encre de Chine au contact de liquides acides. Ce fait a son importance, lorsqu'on veut par exemple examiner du lait acide ou caillé. Par contre, elle a des inconvénients aussi. Il arrive que, lorsqu'on examine des sérosités contenant des leucocytes, ceux-ci prennent la nigrosine parce qu'à leur égard elle constitue un véritable colorant. C'est la même cause qui rend la nigrosine impropre à la préparation de cultures unicellulaires. Le colorant diffuse dans la gélatine, sur laquelle on doit faire les points à la plume.

Pour effectuer une coloration négative selon BURRI, on dépose une anse de l'un des colorants, encre de Chine ou nigrosine, sur une lame, on y mélange les organismes à colorer et on étend le tout, soit au moyen de l'anse, soit avec une spatule appropriée, soit encore avec une lamelle tenue obliquement. On sèche sur la flamme et on examine dans une goutte d'huile de cèdre. En principe, la couche de colorant devrait avoir, une fois sèche, une épaisseur atteignant

environ la moitié de celle des microbes. Ceux-ci se détachent alors en blanc sur un fond foncé.

C'est intentionnellement que nous nous sommes étendus aussi longuement sur le procédé de coloration négative du professeur BURRI. Il mériterait d'être mieux connu. En moins d'une demi-minute, on obtient une préparation parfaite par ce moyen. Toutes les fois qu'il effectue une coloration sans poursuivre de but spécial (Gram, acido-résistance, etc.), le bactériologiste gagne du temps en employant le procédé négatif. Celui-ci gagnerait aussi à être étudié plus à fond. Il est possible qu'on pourrait l'employer dans certains cas d'une façon analogue à la coloration de Gram pour identifier les micro-organismes. En effet, bien des organismes qui ne prennent pas le Gram présentent une tache foncée au centre, lorsqu'ils sont colorés en frottis selon le procédé négatif. Nous rappelons pour plus de détails, le travail de BURRI : *Das Arbeiten mit der einzelnen Zelle*, in *Handbuch der mikrobiologischen Technik* de Kraus-Uhlenhuth, 1923, URBAN et SCHWARZENBERG.

L'autre technique employée correspond à la coloration des spores de KLEIN (L. HEIM, *Lehrbuch der Bakteriologie*, 1918, Berlin). Cet auteur colore en mettant une suspension de bacilles mélangée à son volume de fuchsine phéniquée selon ZIEHL, pendant quelques minutes au bain-marie. Il prépare ensuite un frottis et décolore les bacilles avec de l'alcool ou un acide dilué, jusqu'à ce que seules les spores soient encore rouges. Les bacilles sont ensuite recolorés en bleu. Une coloration réussie montre des spores rouge-vif dans des bacilles bleus.

Une propriété peu connue de la nigrosine, le pouvoir de décolorer les bacilles colorés par le ZIEHL, tout en laissant leur couleur aux spores, constitue la base de notre procédé. Il résulte de l'union des procédés BURRI et KLEIN, en utilisant cette propriété de la nigrosine pour remplacer la décoloration à l'acide ou à l'alcool. Sachant cela, notre procédé est vite expliqué : colorer les bacilles selon KLEIN, les décolorer et en même temps les faire ressortir d'une nappe foncée en faisant un frottis à la nigrosine. On procède alors comme suit :

1° Préparer une suspension des bacilles à colorer dans 0,5 cc. d'eau environ dans une éprouvette ;

2° Additionner 1 ou 2 cc. d'une solution fondue de gélatine à 10 % (on peut aussi employer un milieu de culture à la gélatine) ;

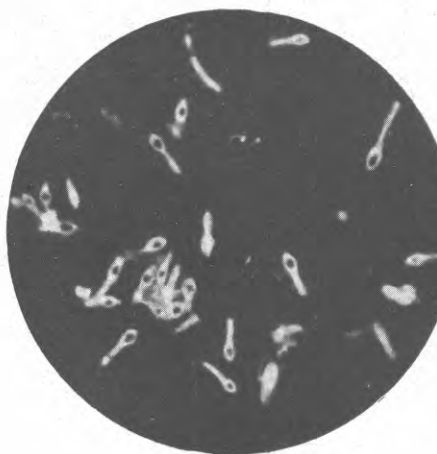
3° Additionner la même quantité de fuchsine phéniquée selon ZIEHL ;

4° Plonger les éprouvettes dans l'eau bouillante pendant dix minutes environ ;

5° Laver les bacilles pour enlever la gélatine. A cet effet, addition-



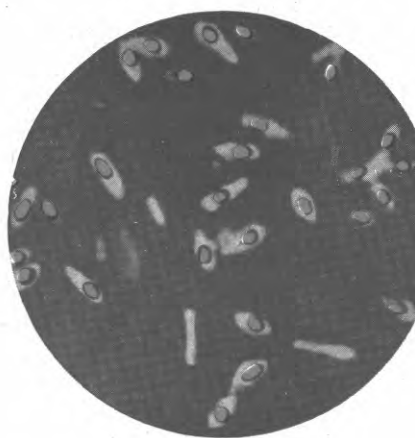
1. **Bac. amylobacter** (A. M. & BREDEMANN)
Organisme qui cause le gonflement en
cave du fromage d'Emmenthal.



2. **Bac. Danteci** (LE DANTEC)
Isolé de larves d'abeilles et remar-
quable par le fait que ses colonies
sont tantôt jaunes, tantôt rouges.



3. **Bac. anthracis**
Agent du charbon bactérien.



4. **Bac. putrificus** (BIENSTOCK)
Organisme qui cause la pourriture
en cave de l'Emmenthal et de
Gruyère.

Les photographies représentent les microorganismes grossis 2.000 fois.

ner 10 ou 15 cc. d'eau, centrifuger pendant quelques minutes ou laisser au repos pendant quelques heures ;

6° Mélanger une anse du culot avec une anse de nigrosine, étendre sur une lame et sécher ;

7° Examiner au microscope dans une goutte d'huile de cèdre.

Ces indications appellent quelques explications supplémentaires. Pour obtenir des préparations denses, il est nécessaire de colorer une quantité assez grande de bacilles. Dans la règle, on n'éprouve pas de difficulté à ce sujet, lorsqu'il s'agit d'organismes aérobies. Il en est autrement pour les anaérobies, surtout s'il s'agit d'organismes qui poussent en colonies floconneuses, fortement ancrées dans la gélose, comme par exemple le *bac. putrificus*. Dans ce cas, on favorise la croissance des bacilles entre la gélose et la paroi de l'éprouvette en pratiquant la piqure le long de celle-ci. On recueille alors les organismes après avoir sorti le cylindre de gélose, en rinçant l'éprouvette avec quelques gouttes d'eau.

Lors de nos premiers essais, nous n'avons pas ajouté de gélatine. Nous avons remarqué alors que les substances mucilagineuses, qui entourent les bacilles, se coagulaient en agglutinant ceux-ci lors de l'addition de fuchsine phéniquée. Il se forme ainsi de gros amas, qu'il est impossible de décolorer. Pour remédier à cet état de choses, nous ajoutons la gélatine qui joue simplement le rôle de colloïde protecteur et empêche l'agglutination des bacilles. Cette addition de gélatine n'est cependant pas indispensable dans tous les cas.

La quantité de fuchsine phéniquée ajoutée et la durée du chauffage au bain-marie semblent pouvoir varier, dans d'assez larges limites, sans nuire à la bonne réussite de la coloration. Les spores de certains organismes ne prennent pas ou incomplètement le ZIEHL. Le *bac. alvei* par exemple est de ce nombre. Seul le centre de sa spore se colore. Un large bord qui représente une épaisse membrane reste incolore. Il est évident que là où le procédé KLEIN est insuffisant, le nôtre le sera aussi.

Il est nécessaire d'éloigner la gélatine, car en séchant sur la lame elle rend les frottis absolument impropres. Il n'est cependant pas nécessaire d'effectuer plus d'un lavage.

La décoloration des bacilles par la nigrosine constitue un phénomène des plus intéressants. Nous ne savons pas exactement à quoi l'attribuer. Il est possible que, comme la nigrosine constitue un colorant sulfoné, ce soit le radical acide qui agisse. Il serait intéressant d'étudier cette question plus à fond. Peut-être pourrait-on tirer parti de cette propriété en combinant le procédé négatif à la nigrosine à d'autres colorations (Décoloration par la nigrosine des organismes acido-résistants, tels que le bacille tuberculeux, etc., colorés au

ZIEHL). L'avantage de la nigrosine serait d'agir régulièrement, impossible ici de trop décolorer.

D'autre part, il faut mentionner que l'encre de Chine possède également, à un degré moindre il est vrai, la propriété de décolorer les bacilles traités par le ZIEHL. On l'emploie avec succès pour décolorer des organismes de dimensions plus réduites. Peut-être que l'encre de Chine agit simplement par adsorption. Dans certains cas, les bacilles ne se décolorent pas du tout ou incomplètement. Le plus souvent, il s'agit alors de bacilles trop âgés ou dégénérés. Très souvent, les restes des bacilles non résorbés encore attachés à de vieilles spores ne se décolorent pas. Dans d'autres cas, la nigrosine pénètre à l'intérieur des bacilles déjà partiellement résorbés et leur donne une couleur foncée. On observe assez souvent ce phénomène, lorsqu'on colore la bactériidie charbonneuse. Ce ne sont cependant là que des exceptions, que l'on peut éviter en effectuant la coloration au bon moment. Après quelques tâtonnements, on y arrive facilement.

L'avantage principal de notre procédé est de simplifier beaucoup la décoloration et la recoloration des bacilles. Ces deux opérations se font d'une seule fois automatiquement. Les préparations obtenues sont fort belles. Les savants qui aiment pourvoir leurs descriptions de micro-photographies ne manqueront pas de faire appel à notre procédé lorsqu'il s'agira d'organismes sporulés. En effet, les préparations obtenues se prêtent admirablement à la reproduction photographique, parce que les couleurs employées donnent de bons contrastes sur la plaque sensible. Les photographies de la planche annexée le prouvent. L'une d'elles, celle qui représente le *Bacillus Danteci*, est reproduite sans aucune modification. Les autres ont d'abord été coloriées d'après le procédé Satrap, pour rendre le ton bleuâtre de la nigrosine. Les spores ont ensuite été colorées à la plume. Nos illustrations constituent donc des documents photographiques.

DU PASSAGE DES SUBSTANCES MÉDICAMENTEUSES DANS LE LAIT

par Dr. J. KOLDA

Chef de travaux de l'Institut de pharmacologie de l'École vétérinaire de Brno (Tchécoslovaquie)

(Travail du laboratoire du Prof. Dr. O. RYBAK,

présenté à la Société de Biologie de Brno, 21 octobre 1925).

L'action sécrétoire de la glande mammaire est sous la dépendance, d'un côté, du système nerveux, de l'autre, d'une influence sanguine qui peut s'exercer de différentes façons : quantitativement, par une augmentation de la pression sanguine, qualitativement, parce que