

LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

- E. VALLES. — Sur l'emploi de différents indicateurs d'oxydo-réduction pour l'étude des bactériophages des streptocoques lactiques 241
- M. BEAU. — Etudes sur la caséine 249
- L. RANDOIN, C. JOURDAN et J. CAUSERET. — Influence du caillage sur l'utilisation digestive et sur la valeur biologique des protides du lait. Essais de supplémentation des protides du lait du caillé et du Camembert par la cystine 272
- M. BROGIONI. — Recherche et dosage du diacétyle dans le beurre produit dans la province de Pérouse 276

REVUE :

- G. GÉNIN. — Le lait dans le monde. 283

Bibliographie analytique :

- 1^o Les livres 290
- 2^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 296

- 3^o Brevets 341

Bulletin bibliographique :

- 1^o Les livres 346
- 2^o Revues, Sociétés savantes 347

Documents et informations :

- M. BEAU. — La situation laitière 353
- Du fourrage vert toute l'année 356
- Interdiction de livrer du lait pénicillé au Danemark 361
- Augmentation de la production du lait aux Etats-Unis 362
- Publicité américaine en faveur du beurre 363
- Après les « milk bars », les « cheese bars » 363
- Produits laitiers dans l'alimentation humaine 363
- Stabilité du lait au point de vue nutritif 363
- Prix comparés du ramassage du lait en vrac ou en bidons 364
- Insémination artificielle en Grande-Bretagne 365
- Beurre pasteurisé 365
- Communiqués 368

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

SUR L'EMPLOI DE DIFFÉRENTS INDICATEURS D'OXYDO-RÉDUCTION POUR L'ÉTUDE DES BACTÉRIOPHAGES DES STREPTOCOQUES LACTIQUES

par

E. VALLES (2)

I. Introduction

Le développement d'un bactériophage dans le lait de fromagerie représente une menace toujours sérieuse en industrie laitière et il

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

(2) Boursier de la Faculté de Chimie et Pharmacie de Montevideo. Professeur à l'Ecole de Laiterie de Colonia Suiza (Uruguay).



est important pour les techniciens de disposer de procédés simples, permettant de déceler l'attaque du phage et de mesurer, éventuellement, son intensité en effectuant un dénombrement du phage. C'est dans le but de mettre au point un tel procédé que nous avons entrepris notre travail.

Pour déceler et étudier l'action des bactériophages des streptocoques lactiques, quatre techniques ont été employées depuis longtemps. Elles sont basées sur :

- 1° La formation des plages de lyse sur les milieux gélosés ;
- 2° L'observation de la lyse des streptocoques ensemencés sur bouillon nutritif ;
- 3° La mesure de l'acidité titrable des cultures sur lait ;
- 4° Les variations du potentiel rédox, révélées par le changement de coloration du tournesol ou du bleu de méthylène [1] [2].

Dans le présent travail, nous avons étudié plus spécialement la quatrième de ces techniques en observant les variations du potentiel d'oxydo-réduction dans les cultures indemnes et dans les cultures infectées par le bactériophage, variations mises en évidence par les changements de coloration de plusieurs indicateurs d'oxydo-réduction.

II. Méthodes utilisées

Nous nous sommes servis, pour nos essais, de souches de streptocoques lactiques (*S. lactis*), faisant partie de la collection du laboratoire et utilisées comme levains pour diverses fabrications fromagères.

Plusieurs échantillons de lactosérum, prélevés dans les fromageries où nos souches servaient à la préparation des levains, nous ont servi de matériel de départ pour l'isolement et l'activation des bactériophages.

Le mode opératoire adopté était le suivant :

1° *Technique d'ensemencement.*

a) On prépare des dilutions décimales (dilutions 10^{-1} à 10^{-3} , par exemple) du lactosérum dans lequel on suspecte la présence du bactériophage en employant de préférence comme diluant du lait stérile [3] ;

b) Onensemence un volume convenable de lait stérile, additionné de l'indicateur choisi, avec 1% d'une culture de streptocoques lactiques sur lait stérile, culture ayant subi une incubation de 12 à 18 heures à 30° C. ;

c) On répartit ce lait ensemencé, à raison de 9 millilitres par tube, dans des tubes stériles (18 x 180 mm.) ;

d) On ajoute 1 millilitre de chaque dilution du bactériophage préparée en a), dans 9 millilitres du laitensemencé, en ayant soin de bien mélanger ;

e) Un tube témoin est préparé en ajoutant aux 9 millilitres de laitensemencé, 1 millilitre de lait stérile ;

f) On incube au bain-marie à 30° C.

2° Préparation des indicateurs ajoutés au lait.

Ajouter le contenu d'une ampoule contenant 10 millilitres de solution de tournesol stérile (R.A.L.) à 1 litre de lait écrémé cru. Stériliser à l'autoclave 20 minutes à 118°.

Rézasurine : Dans une fiole jaugée de 50 millilitres stérile, dissoudre dans l'eau distillée stérile un comprimé de rézasurine, en opérant aseptiquement. Ajouter, aseptiquement, au lait stérilisé, un volume de cette solution pour dix volumes de lait.

Bleu de méthylène : Dans un flacon en verre brun, dissoudre, en opérant aseptiquement, 1 gr. 10 de bleu de méthylène dans 500 millilitres d'eau distillée stérile (solution mère) ; au moment de l'utilisation, préparer une dilution à 1/40^e de la solution mère dans l'eau distillée stérile. Ajouter, aseptiquement, un volume de cette dernière solution à dix volumes de lait. La concentration finale du colorant dans le lait est de 1/200.000^e [4].

Vert janus, bleu de Nil, phenosafranine et rouge neutre : Dans un flacon stérile en verre brun, dissoudre 1 gr. 10 de chacun de ces colorants dans 50 millilitres d'eau distillée stérile, en opérant aseptiquement. Au moment de faire l'essai avec ces colorants, préparer une dilution à 1/40^e dans l'eau distillée stérile, et ajouter aseptiquement un volume de cette dernière solution à dix volumes de lait. Concentration finale du colorant dans le lait : 1/20.000^e.

Toutes les solutions de colorants décrites ci-dessus (à l'exception du lait tournesolé) ont été employées le jour même, les solutions mères étant conservées à l'abri de la lumière.

III. Observations sur le développement des cultures de bactéries lactiques en présence de bactériophages au moyen de la technique des indicateurs

L'action des bactériophages sur des bactéries cultivées dans un milieu opaque — comme le lait — ne peut être suivie par observation directe du phénomène de lyse comme on peut le faire lorsqu'on utilise un milieu de culture transparent (bouillon nutritif).

Cependant, le lait présente sur les milieux artificiels certains avantages : tout d'abord, la facilité de sa préparation et de son emploi dans les laboratoires de laiterie, ensuite la remarquable

adaptation de nombreuses souches de bactéries lactiques à ce milieu de culture naturel qui permet leur développement rapide, alors que la croissance des mêmes bactéries est parfois très faible ou nulle sur des milieux artificiels.

L'addition de l'un ou l'autre des indicateurs mentionnés plus haut permet de rendre visible, même dans un milieu opaque comme le lait, le phénomène de bactériophagie à condition de connaître la relation entre les différentes phases de l'action du bactériophage et les changements de teinte de l'indicateur. Dans le but d'établir cette relation, nous avons étudié le comportement d'un système « bactérie-bactériophage » inoculé, d'une part sur un bouillon nutritif transparent (1) additionné d'indicateur et, d'autre part, sur du lait stérile ayant reçu le même indicateur.

Voici quelles ont été nos observations dans les deux séries de tubes — lait et bouillon — lorsqu'on garde constant l'inoculum de bactéries en ajoutant à cet inoculum des quantités décroissantes de bactériophage.

Premier cas : Pour de fortes doses de bactériophages (rapport $\frac{\text{bactériophage}}{\text{bactéries}}$ élevé), les tubes qui ont reçu du bactériophage ne présentent aucun changement de teinte de l'indicateur. Au contraire dans les tubes témoins additionnés d'indicateur, ce dernier est réduit : d'abord, au fond du tube, puis dans toute la hauteur de la culture. Un trouble apparaît dans le tube de bouillon et, dans l'autre tube, quelques heures après la réduction de l'indicateur, le lait coagule. C'est seulement après plusieurs heures d'incubation que la réduction apparaît dans les tubes qui ont reçu du bactériophage et est suivie, plus tard, de la coagulation du lait ou de la formation d'un trouble en bouillon résultant du développement des cultures secondaires.

Deuxième cas : Pour des doses moyennes ou faibles de bactériophages (rapport $\frac{\text{bactériophage}}{\text{bactéries}}$ moyen ou faible), le comportement des tubes témoins étant le même que dans le premier cas, celui des tubes qui ont reçu du bactériophage est le suivant : en bouillon, après les premières heures d'incubation un trouble apparaît — dû à la croissance des bactéries — et l'on observe en même temps la réduction de l'indicateur. Puis une recoloration progressive devient visible et simultanément le bouillon commence à s'éclaircir : lorsque le tube est complètement recoloré, la lyse est totale et le milieu de nouveau parfaitement clair. Si l'on continue l'incubation,

(1) Peptone : 2% ; extrait de viande : 1% ; dextrose : 1% ; extrait de levure : 8% ; NaCl : 0,5% ; eau distillée : q.s.

le tube se trouble de nouveau et l'on assiste à une nouvelle réduction de l'indicateur. Le tube est finalement complètement réduit et trouble, le deuxième trouble correspondant à l'apparition des cultures secondaires.

Dans l'essai parallèle sur le lait, le déroulement des phénomènes se produit de façon analogue : on assiste d'abord à une réduction de l'indicateur suivie d'une recoloration graduelle qui débute dans la couche supérieure de la culture, s'étend progressivement vers le fond du tube et ramène finalement le milieu à la teinte initiale. En continuant l'incubation, on observe une deuxième réduction (cultures secondaires) à laquelle fait suite la coagulation du lait.

La réduction et la recoloration de l'indicateur sont la conséquence des variations du potentiel rédox du milieu de culture sous l'influence du développement (chute du potentiel) ou de la lyse des bactéries (remontée du potentiel). C'est ce phénomène de réduction et de recoloration de l'indicateur qui permet à la fois de déceler la présence du phage et d'obtenir, comme on le verra plus loin, une mesure de la concentration en corpuscules dans le lysat (le plus souvent lactosérum) dont on est parti.

Notation des résultats.

Pour traduire et apprécier d'une manière quantitative les phénomènes qui viennent d'être décrits, nous avons utilisé le système de notation suivant :

1° — : aucune réduction de l'indicateur ;

2° + : réduction, dont l'intensité est exprimée conventionnellement par un nombre de signes + correspondant au volume liquide réduit, par rapport au volume total de liquide dans le tube de culture.

Exemple : + réduction dans un quart du tube ;
 ++ réduction dans une moitié du tube ;
 +++ réduction dans les trois-quarts du tube ;
 ++++ réduction totale.

3° R : recoloration. Elle représente le phénomène inverse du précédent. Un tube totalement réduit étant désigné par ++++, un tube totalement recoloré sera désigné par RRRR. Mais si la recoloration est seulement partielle, on l'indique en signalant, en même temps, le degré de réduction du tube ; ainsi +RRR signifie que les trois-quarts du tube sont recolorés (RRR) et que le quart reste réduit (+).

On devra chaque fois comparer le tube ayant reçu une dilution de bactériophage au tube témoin pour apprécier la différence qui existe entre eux.

Exemple :

A	{	culture témoin	++++
		culture + phage	+++R
B	{	culture témoin	+++
		culture + phage	+++

Dans le cas des tubes A, un quart du tube ayant reçu le bactériophage est recoloré, les trois-quarts sont encore réduits : l'action du bactériophage commence à se manifester.

Dans les tubes B au contraire, le témoin et le tube ayant reçu le bactériophage sont tous deux aux trois-quarts réduits, et il n'y a pas de recoloration apparente dans le tube ayant reçu du phage. L'action de ce dernier n'est pas encore visible.

4° C : coagulation du lait.

Les notations seront faites régulièrement à partir du moment où les tubesensemencés sont placés au bain-marie à 30° : dès que le colorant du tube témoin présente un début de virage, l'intervalle de temps séparant deux observations ne doit pas dépasser une heure.

Utilisation de différents indicateurs d'oxydo-réduction.

Nos premières observations ont été faites avec du lait tournesolé. Nous avons ensuite été amenés à penser que des colorants plus électropositifs que le tournesol seraient susceptibles de déceler l'action du bactériophage dans un temps plus court que le tournesol et nous avons donc essayé le bleu de méthylène et la résazurine.

Le tableau I donne les résultats d'un essai effectué avec les trois indicateurs : tournesol, bleu de méthylène, et résazurine en utilisant le bactériophage 15 et la souche de *Streptococcus lactis* 7 M 10 b.

Pour permettre une interprétation plus claire de ces résultats, quelques-uns d'entre eux ont été schématisés dans les figures 1, 2, 3.

La figure 1 représente ce qui se passe dans les tubes qui ont reçu les doses les plus fortes de bactériophage (dilutions 10⁻¹ à 10⁻² du tableau I) : on n'observe pas de chute de potentiel ou seulement une chute légère qui n'atteint pas la zone de virage de la résazurine, ni — à fortiori — celles du bleu de méthylène ou du tournesol. Tous ces tubes restent donc colorés et en comparant avec le tube témoin, nous pouvons conclure — après 1, 2 ou 3 heures d'incubation, suivant que l'on a utilisé résazurine, bleu de méthylène ou tournesol — que le bactériophage a agi sur la culture.

La figure 2 se rapporte au cas de la dilution 10^{-3} : c'est la résazurine, indicateur le plus positif qui montre le premier — après 2 heures d'incubation — le phénomène de réduction et recoloration. Le bleu de méthylène et le tournesol restent, au bout du même temps sans changement de teinte appréciable. Tout au moins pour les



Fig. 1

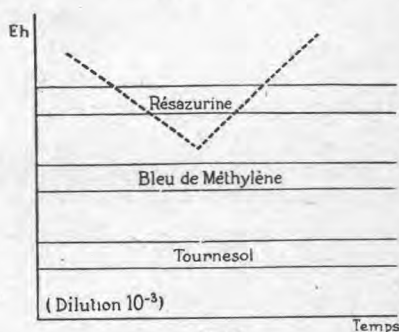


Fig. 2

tubes qui ont reçu du bactériophage, car si l'on examine les tubes témoins, le bleu de méthylène fait apparaître une différence entre le témoin qui est réduit et la culture avec bactériophage, non réduit. Dans le cas du tournesol, témoin et bactériophage ne montrent aucun changement de coloration.

Pour les dilutions plus grandes (par exemple, à partir de 10^{-5} , 10^{-6}) le nombre plus faible des corpuscules de bactériophage permet à la culture de se développer pendant un temps plus long : le potentiel rédox du milieu atteint donc des valeurs plus négatives que dans les deux cas précédents et les trois indicateurs sont réduits. Dès que la culture est lysée, le processus d'oxydation commence et la recoloration apparaît d'abord pour les indicateurs dont la zone de virage se rapproche le plus de la valeur atteinte au moment du développement maximum par le potentiel d'oxydo-réduction du milieu.

L'intensité de recoloration des tubes est à peu près du même ordre pour le tournesol et le bleu de méthylène et se trouve légèrement supérieure à celle de la résazurine.

Cette différence s'accroît aux dilutions les plus fortes : la figure 3 permet d'apprécier ce qui se passe pour la dilution 10^{-8} . Le potentiel rédox du milieu atteint une limite encore plus basse que pour les dilutions précédentes et l'indicateur le plus négatif (tourne-sol) se recoloré le plus rapidement. L'ordre de la recoloration est le suivant : tournesol, bleu de méthylène et plus tard résazurine.

Avec d'autres bactériophages, les changements de teintes successifs de l'indicateur se produisent dans le même sens, mais il arrive que leurs durées respectives soient plus courtes. Le tableau II montre le résultat d'un tel essai réalisé avec la même souche 7 M 10 b, mais avec un bactériophage 15 I, plus actif que le bactériophage 15. On voit dans le cas des dilutions 10^{-7} et 10^{-8} que réductions et recolorations des trois indicateurs apparaissent et se succèdent plus rapidement dans le temps que pour le bactériophage 15.

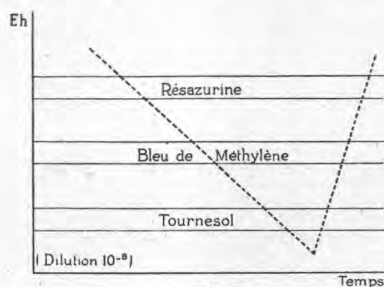


Fig. 3

Les résultats que nous venons d'exposer, nous conduisent aux conclusions suivantes :

1° Pour les systèmes phage-bactéries soumis aux essais, les variations du potentiel rédox sont fonction de la concentration en corpuscules au début de l'expérience : plus faible est la concentration en corpuscules et plus négatives sont les valeurs atteintes par le potentiel rédox du milieu de cultureensemencé, au cours des premières heures d'incubation.

2° Pour de fortes doses de phage la réponse est donnée, en premier lieu, par les indicateurs dont les zones de virage sont les plus proches de la valeur initiale du potentiel rédox du milieu. Tandis que pour de faibles concentrations en phage la réponse est donnée par ceux qui présentent une zone de virage plus voisine des valeurs du potentiel rédox du milieu au moment où la culture approche de son développement maximum. En d'autres termes, lorsque la lyse bactériophagique se produit tôt ce sont les indicateurs à zone de virage positive qui la déclenchent les premiers (réduction et recoloration de la résazurine). Au contraire, lorsque l'attaque bactériophagique se produit tard, ce sont les indicateurs à zone de virage négative qui la révèlent en premier lieu (recoloration du tournesol).

Emploi d'autres indicateurs Rédox.

Mettant à profit ces premières indications, nous avons utilisé d'autres colorants, plus négatifs que le tournesol, dans le but d'étu-

TABLEAU I

Dilutions		Temps d'incubation (en heures)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Résazurine	<i>Témoin</i>	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	C	C
	10-1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10-2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10-3	++++	+RRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10-4	++++	++++	+++R	+RRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10-5	++++	++++	++++	+++R	+RR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10-6	++++	++++	++++	++++	+++R	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10-7	++++	++++	++++	++++	+++R	+RRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10-8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++R	RRRR
	10-9	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	C	C
Bleu de Métylène	<i>Témoin</i>	—	+++	++++	++++	++++	++++	++++	C	C
	10-1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10-2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10-3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10-4	—	+R	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10-5	—	+++	++++	++RR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10-6	—	+++	++++	+++R	++RR	+RRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10-7	—	+++	++++	++++	+++R	+++R	++RR	RRRR	RRRR
	10-8	—	+++	++++	++++	++++	+++R	++RR	+RRR	RRRR
	10-9	—	+++	++++	++++	++++	++++	++++	C	C
Tourneol	<i>Témoin</i>	—	—	++	+++	+++	++++	++++	C	C
	10-1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10-2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10-3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10-4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10-5	—	—	++	++R	+RR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10-6	—	—	++	+++	++R	+RRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10-7	—	—	++	+++	++R	+RR	RRRR	RRRR	RRRR
	10-8	—	—	++	+++	+++	+RRR	+RRR	+RRR	RRRR
	10-9	—	—	++	+++	+++	++++	++++	++++	C

TABLEAU II

Dilutions		Temps d'incubation (en heures)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Résazurine	<i>Témoin</i>		+	++++	++++	++++	++++	++++	C
	10 ⁻³		—	—	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁴		+	+RRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁵		+	+++R	+RRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁶		+	++++	++RR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁷		+	++++	++++	++RR	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁸		+	++++	++++	++++	++++	++RR	RRRR
	<i>Témoin</i>		+	++++	++++	++++	++++	++++	C
Bleu de Métylène	11 ⁻³		—	—	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁴		+	+RRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁵		+	+++R	+RRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁶		+	++++	++RR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁷		+	++++	++++	++RR	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁸		+	++++	++++R	+RRR	RRRR	RRRR	RRRR
	<i>Témoin</i>		—	—	++	++++	++++	++++	C
	10 ⁻³		—	—	—	—	—	—	—
Tournesol	10 ⁻⁴		—	—	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁵		—	—	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁶		—	—	+R	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁷		—	—	++	++RR	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁸		—	—	++	++RR	RRRR	RRRR	RRRR

dier les variations dues à l'action de bactériophages peu actifs ou celles de bactériophages actifs, mais très dilués. Voici un résumé des observations faites avec les quatre colorants suivants :

Phenosafranine et rouge neutre :

Avec la souche de *Streptococcus lactis* 7 M 10 b, le tube témoin coagule avant la réduction du colorant ; cette réduction ne se manifeste qu'après 16 heures environ d'incubation à 30°. Les tubes inoculés avec du bactériophage ne subissent pas non plus de réduction avant 16-18 heures et lorsque la réduction se produit elle n'est pas suivie de recoloration, même après 24 heures d'incubation à 30°.

Bleu de Nil :

Les résultats obtenus avec ce colorant sont à peu près semblables à ceux du tournesol. Les changements de coloration sont cependant beaucoup plus nets.

Vert de Janus :

La deuxième zone de virage — du rose à l'incolore — de cet indicateur, zone plus négative que celle du tournesol, nous intéres-

sait particulièrement. Mais dans les conditions de l'expérience nous n'avons pu observer que la première zone de virage, du bleu au rose, qui seule permettait de déceler l'action du bactériophage. Les changements de coloration sont très accusés et la réponse est donnée dans un temps intermédiaire entre celui du bleu de méthylène et celui du tournesol.

Dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placés, ces quatre colorants n'offraient donc pas d'intérêt au point de vue des utilisations pratiques. Cependant nous pensons qu'une étude approfondie concernant l'emploi des colorants plus négatifs que le tournesol ou plus positifs que la résazurine mériterait d'être entreprise dans le cas des bactériophages de streptocoques lactiques cultivés sur lait stérile.

IV. Application de la technique des indicateurs à l'étude de plusieurs races de bactériophages des streptocoques lactiques

a) *Appréciation de l'activité des bactériophages.*

La méthode que nous avons décrite plus haut permet d'évaluer le degré d'activité des phages en considérant, pour les mêmes dilutions, le temps nécessaire à la recoloration des indicateurs ou en recherchant la plus grande dilution qui montre encore la présence du bactériophage.

Les tableaux III, IV et V indiquent les résultats obtenus avec trois bactériophages doués d'une activité plus ou moins grande. Dans le cas de bactériophages actifs, l'emploi de la résazurine ou du bleu de méthylène est avantageux car les variations du potentiel d'oxydo-réduction sont alors très rapides et l'on obtient, avec ces deux indicateurs, des réponses dans un minimum de temps : 2 à 4 heures.

b) *Augmentation de l'activité et purification des bactériophages.*

Lorsqu'on veut obtenir un bactériophage possédant un degré d'activité élevé on peut aussi utiliser le procédé des indicateurs d'oxydo-réduction.

Au départ, lorsqu'on dispose d'un lactosérum dans lequel on soupçonne la présence d'un phage, une technique avantageuse semble être la filtration du lactosérum de façon à éliminer les bactéries présentes en conservant seulement les bactériophages. Ensuite lorsqu'après isollements et passages successifs on a obtenu un lysat actif, une nouvelle filtration permet d'éliminer les cellules de bactéries présentes et notamment les cellules résistantes au bactériophage [5].

Toutefois la mesure, par la méthode des dilutions, de la concen-

TABLEAU III

Dilutions		Temps d'incubation (en heures)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Résazurine	<i>Témoin</i>		++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	C
	10 ⁻¹		+	++++	++++	++++	++RR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻²		+	++++	++++	++++	++++	++++	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻³		+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	10 ⁻⁴		+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	10 ⁻⁵		+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	10 ⁻⁶		+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	10 ⁻⁷		+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	C
	10 ⁻⁸		+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	C

Bactériophage 3, très faible activité sur la souche 4 M 22 d.

TABLEAU IV

Dilutions		Temps d'incubation (en heures)							8
		1	2	3	4	5	6	7	
Résazurine	<i>Témoin</i>		+	++++	+++++	+++++	+++++	+++++	C
	10 ⁻¹		+	++++	++RR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻²		+	++++	+++++	+++++	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻³		+	++++	+++++	+RRR	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁴		+	++++	+++++	+++++	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁵		+	++++	+++++	+++++	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁶		+	++++	+++++	+++++	+++++	+++++	C
	10 ⁻⁷		+	++++	+++++	+++++	+++++	+++++	C
	10 ⁻⁸		+	++++	+++++	+++++	+++++	+++++	C

Bactériophage 13, activité moyenne ; 1^{er} passage sur la souche X 13 b.

tration en phage d'une culture lysée avant et après passage sur les filtres Seitz dont nous disposions, nous a montré qu'une proportion importante des corpuscules était retenue par le filtre. Cette constatation a d'ailleurs déjà été faite par d'autres auteurs (6).

TABLEAU V

Dilutions		Temps d'incubation (en heures)					6
		1	2	3	4	5	
Résazurine	<i>Témoin</i>		++++	+++++	+++++	+++++	+++++
	10 ⁻⁴		—	—	—	—	—
	10 ⁻⁶		++++	++RR	RRRR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁷		++++	+++++	++RR	RRRR	RRRR
	10 ⁻⁸		++++	+++++	++++R	RRRR	RRRR

Bactériophage 15, très actif ; 2^e passage sur la souche X 13 b.

Nous avons donc cherché le moyen d'obtenir des lysats actifs sans avoir recours à la filtration sur Seitz, tout au moins dans le cas des lysats actifs obtenus après passages sur les souches sensibles.

La technique suivante a finalement été adoptée :

1^o Préparer les dilutions du bactériophage, ainsi que le lait additionné d'indicateur et procéder aux ensemencements selon la technique déjà décrite. Employer de préférence la résazurine ou le bleu de méthylène. Ensemencer un tube témoin sans bactériophage ;

2^o Mettre à incuber à 30°, au bain-marie, les tubes correspon-

dant à des dilutions convenables : pour les bactériophages faibles 10^{-1} à 10^{-4} , pour des bactériophages actifs 10^{-5} à 10^{-7} ;

3° Retirer les tubes du bain-marie au fur et à mesure qu'ils présentent une recoloration totale pour ne pas laisser aux cultures secondaires le temps de se développer. A partir de ces tubes et sans filtration préalable, mais en partant d'une dilution supérieure à celle utilisée lors du premier passage (par exemple —6 au lieu de —5) on ajoute le lait additionné d'indicateur et ensemencé avec la souche sensible ;

4° Faire le nombre de passages nécessaire pour obtenir un certain degré d'activité jugé suffisant. On se rend compte facilement de l'augmentation progressive de l'activité en observant la vitesse de la recoloration pour une même dilution et pour des dilutions de plus en plus grandes ;

5° Les tubes contenant le bactériophage actif obtenu au cours de différents passages sont refroidis dans l'eau glacée et conservés ensuite à la glacière.

Résultats.

Nous avons, par cette technique, obtenu plusieurs bactériophages possédant un degré d'activité élevé en employant la résazurine ou le bleu de méthylène. Avec la résazurine et pour les dilutions de l'ordre de 10^{-4} , 4 heures suffisent pour obtenir la recoloration. Avec un bactériophage très actif, nous avons obtenu, au deuxième passage, la recoloration totale de la dilution 10^{-8} au bout de 5 heures seulement. Pour des bactériophages d'activité moyenne on peut facilement faire trois passages successifs au cours d'une journée en utilisant la résazurine comme indicateur.

Les cultures sur lait contenant un bactériophage actif ont été conservées pendant un mois à la glacière sans subir aucune perte d'activité.

Purification par isolement du phage sur milieu solide.

La purification d'un ou plusieurs bactériophages, contenus dans un levain, peut être réalisée en combinant le procédé des indicateurs d'oxydo-réduction et celui de la formation des plages sur milieu gélosé en boîtes de Pétri.

Technique.

Préparer avec du lait stérile, une dilution de bactériophage de l'ordre de 10^{-4} par exemple et, avec cette dilution, employer le procédé des passages successifs en utilisant la résazurine ou le bleu de méthylène.

Après la recoloration de la dilution 10^{-4} , faire le nombre de passages nécessaires, habituellement 2 ou 3, pour obtenir la recolo-

ration des tubes de la dilution 10^{-8} . Avec le contenu de ce tube, et au moment où la recoloration a lieu, faire des dilutions de bactériophages jusqu'à 10^{-7} et 10^{-8} dans du Ringer au quart.

Ensemencer ces dilutions sur des boîtes de Pétri, en utilisant le procédé de Gratia [7] adapté à l'étude des bactériophages des streptocoques lactiques par POTTER et NELSON [8]. Les plages apparaissent après 18 heures d'incubation à l'étuve à 30° . Repiquer alors une plage sur du lait contenant de la résazurine ou du bleu de méthylène ensemencé à 1% de la souche sensible. Préparer un témoin sans bactériophage. Mettre au bain-marie à 30° .

Après la recoloration du tube contenant le bactériophage, faire une série de dilutions et un passage sur lait à la résazurine ensemencé avec 1% de la souche sensible.

Vérifier l'allure de la recoloration et prendre le tube de la dilution la plus forte, par exemple 10^{-8} , venant de se recolorer, soit pour augmenter son degré d'activité par un nouveau passage sur milieu liquide, soit pour le purifier par un nouveau passage sur milieu solide.

Le bactériophage ainsi purifié est conservé à la glacière sans être filtré.

Discussion.

Par ce procédé, on purifie le bactériophage en augmentant son activité lytique vis-à-vis de la souche sensible et, si le milieu de départ contient un mélange de bactériophages, la série des passages préalables accroît la concentration en corpuscules de phages spécifiques de la souche utilisée.

La série de passages après le premier isolement sur gélose a pour but d'éliminer le plus possible les cellules résistantes qui peuvent être introduites au moment du repiquage des plages (formées sur milieu gélosé) dans le lait stérile [9].

Essai de résistance croisée.

En utilisant le procédé des indicateurs d'oxydo-réduction, nous avons fait des essais de résistance croisée entre plusieurs souches de bactéries et plusieurs bactériophages. Dans ce genre d'essais, réalisés pour établir le degré de parenté des souches bactériennes et celui des différentes races de bactériophages, il est nécessaire de placer dans des conditions bien définies les phages à essayer [10] [11].

Nous avons opéré par la méthode des plages en boîtes de Pétri et, parallèlement, par le procédé des indicateurs rédox. Pour l'essai sur milieu gélosé, en boîtes de Pétri, nous avons suivi la méthode de Nichols [10] en introduisant les variantes suivantes :

Dilutions critiques : nous avons choisi comme dilutions critiques la dernière dilution du bactériophage qui, agissant sur la souche homologue, nous donnait une lyse confluyente sur la gélose et la dilution suivante qui nous donnait des plages voisines les unes des autres. Ces dilutions ont été employées pour faire l'essai des bactériophages purifiés sur les différentes souches de streptocoques lactiques.

Mode opératoire : nous avons employé tantôt pour déterminer les dilutions critiques, tantôt pour l'essai proprement dit, la technique d'isolement sur boîtes de Pétri de Potter et Nelson [8], le milieu gélosé utilisé était le suivant : peptone Evans, 2% ; extrait de viande, 1% ; dextrose, 0,5% ; NaCl, 0,5% ; extrait de levure, 0,3% ; gélose, 1,5%.

L'essai fait par la méthode des indicateurs d'oxydo-réduction a été réalisé en utilisant la résazurine. Comme dilution critique, avec cette technique, nous avons choisi arbitrairement la dilution 10^{-4} du bactériophage, ce dernier possédant une activité telle que la recoloration soit obtenue au bout d'un temps compris entre 2 et 4 heures d'incubation à 30°.

Pour obtenir des bactériophages possédant chacun le même degré d'activité vis-à-vis de la souche homologue, nous avons employé la technique des passages successifs déjà décrite.

Résultats :

Nous avons utilisé 5 bactériophages différents sur 6 souches de streptocoques lactiques, en faisant un essai de résistance croisée.

Les deux méthodes — lyse confluyente sur gélose et recoloration des dilutions critiques — ont conduit aux mêmes résultats en ce qui concerne la spécificité des bactériophages vis-à-vis des différentes souches.

V. Comparaison des résultats obtenus avec la méthode des indicateurs d'oxydo-réduction et ceux donnés par la méthode de formation des plages sur milieux solides

En employant le procédé préconisé par Potter et Nelson [8], nous avons fait des essais parallèles entre cette méthode et la technique des indicateurs rédox. Nous venons de noter la concordance entre ces deux méthodes dans les essais de résistance croisée.

Les résultats de toutes nos expériences nous ont amené à constater que les réactions positives obtenues par la méthode des indicateurs d'oxydo-réduction correspondaient à des résultats positifs par la méthode de formation des plages sur gélose et inversement. Dans une seule expérience nous avons trouvé, pour la dilution 10^{-9} ,

une réaction négative à la résazurine et par contre, l'apparition de 10 plages, avec la méthode de Potter et Nelson.

Pour des essais de contrôle courant, en fromagerie, il est déjà intéressant de savoir si le bactériophage est présent en faible quantité, — jusqu'à la dilution 10^{-2} ou 10^{-3} par exemple, ou si la concentration des corpuscules est beaucoup plus élevée (dilution 10^{-8} ou 10^{-9} par exemple).

La technique des indicateurs d'oxydo-réduction permet d'obtenir facilement la réponse à une telle question.

RÉSUMÉ

1° Une méthode simple et rapide a été décrite pour déceler l'action des bactériophages des streptocoques lactiques, basée sur l'emploi des indicateurs d'oxydo-réduction, tournesol, bleu de méthylène et résazurine. Des appréciations quantitatives peuvent être obtenues avec un degré d'approximation suffisant pour le contrôle des levains utilisés en fromagerie.

2° L'étude de l'action du bactériophage des streptocoques lactiques peut être entreprise en utilisant la méthode exposée :

a) Nous avons montré comment on pouvait augmenter le degré d'activité et purifier les bactériophages ;

b) Déterminer la spécificité des bactériophages vis-à-vis des streptocoques lactiques.

3° Nous avons effectué une comparaison entre les résultats de la méthode des indicateurs d'oxydo-réduction et le procédé basé sur la formation des plages sur milieux solides.

Nous exprimons, en terminant, notre plus profonde reconnaissance à MM. G. MOCQUOT et R. CHEVALIER, pour les conseils et l'aide qu'ils ont bien voulu nous donner et grâce auxquels il nous a été permis d'entreprendre et de mener à bien ce travail.

(Station Centrale de Microbiologie et Recherches laitières. Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise).)

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J. Ma. ROSELL y I. DOS SANTOS. Metodos Analiticos de Laboratorio Lactologico y Microbiologia de Las Industrias Lacteas. *Editorial Labor*, tome II, 351, Barcelona, 1952.
- [2] A. A. NICHOLS et Z. WOLF. The heat resistance of the bacteriophages of cheese starters with observations on the estimation of phage concentration. *Journal Dairy Research*, **14**, 93, 1945.
- [3] G. E. TURNER et F. E. NELSON. Enumeration of lactic straptococcus bacteriophage, by a-Two-Layer method plaques. *Journal Dairy Science*, **34**, 754, 1951.
- [4] J. M. ROSELL y I. DOS SANTOS. *Loc. cit.*, tome I, 300.

- [5] F. d'HERELLE. Le bactériophage et son comportement, 160-181. Masson et C^{ie}, Editeurs, Paris 1926.
- [6] H. M. ADAMS. Methods in medical research, vol. II, 12. Julius H. Comroe Editor, Chicago, 1950.
- [7] A. GRATIA. Des relations numériques entre bactéries lysogènes et particules de bactériophage. *Annales Institut Pasteur*, **57**, 652, 1936.
- [8] N. N. POTTER et F. E. NELSON. Effets of calcium on proliferation of lactic streptococcus bacteriophage. II. Studies on plaque formation with a modified technique. *Journal Bact.*, **64**, 105, 1952.
- [9] F. d'HERELLE. *Loc. cit.*, 178-179.
- [10] A. A. NICHOLS et M. HOYLE. Bacteriophage in typing lactic streptococci. *Journal Dairy Research*, **16**, 175-191, 1949.
- [11] R. WAHL et P. LAPEYRE MENSIGNAC. L'identification des staphylocoques par les bactériophages. *Annales Institut Pasteur*, **78**, 352, 1950.

ÉTUDES SUR LA CASÉINE (1)

par

MAURICE BEAU

II. L'homogénéité de la caséine

La revue *Le Lait* a publié, de septembre à décembre 1953, sous la signature de M. Z. ZELTER, un article très complet sur les « Travaux biochimiques récents sur la structure et la composition de la caséine », avec une très importante bibliographie, comprenant 74 références, qui se rapportent surtout à la période de 1925 à nos jours.

D'autre part, M. G. MOCQUOT, Directeur du Laboratoire Central de Recherches laitières, a présenté devant le IX^e Congrès International des Industries agricoles, qui s'est tenu à Rome en 1952, un Rapport très complet concernant les « Conceptions récentes sur la constitution de la caséine ».

Ces deux auteurs donnent chacun un résumé des travaux anciens et récents sur la caséine, et leurs articles seront consultés avec fruit par tous les intéressés. Toutefois, ces articles ne sont généralement que des exposés des travaux effectués et des conclusions, parfois peut-être un peu hasardées, de leurs auteurs. Ils ne contiennent pas de critiques.

C'est pourquoi nous avons pensé faire connaître les réflexions que nous a suggérées la lecture dans les originaux des divers articles en question, notamment sur un point très étudié depuis 1925, et encore discuté à l'heure actuelle. Nous voulons parler de la question de savoir si la caséine est un corps homogène ou au contraire,

(1) *Le Lait*, 1955, —, n° 341-342, 1.