Influence du cobalt et de la vitamine B₁₂ sur la croissance et la survie des ciliés du rumen *in vitro*, en fonction de la population bactérienne

Annie BONHOMME, Michelle DURAND (*), Carmen QUINTANA (**), S. HALPERN (**)

Laboratoire de Zoologie, U.E.R. Sciences, B.P. 347, 51062 Reims Cedex.

(*) Station de Recherche de la Nutrition, I.N.R.A., 78350 Jouy-en-Josas.

(**) Laboratoire de Biophysique, Faculté de Médecine, 94010 Créteil.

Summary. *Influence of cobalt and vitamin B₁₂ on growth and survival of rumen ciliates in vitro according to bacterial population.*

The effect of inorganic cobalt or organic cobalt in the form of vitamin B₁₂ was studied on the growth of rumen ciliates in the presence of normal bacterial population and in the presence of reduced bacterial population.

It was stated that concentration from 0.1 to 1 cobalt µg/ml and 0.12 to 0.24 vitamin B₁₂ µg/ml stimulated growth of rumen ciliates. At rates 10 to 20 times weaker, cobalt in the form of vitamin B₁₂ was more active than cobalt in inorganic form.

With reduced bacterial population (10³ B/ml) protozoa died within a few days but their survival was prolonged by adding cobalt, this effect being more pronounced with vitamin B₁₂ than with inorganic cobalt. The growth of ciliates treated with antibiotics was stimulated by addition of bacteria, and this effect was more pronounced when the bacteria had been preincubated with cobalt.

Incorporation of cobalt into rumen ciliates was studied using electron microprobe analysis. Cobalt was present in all the ciliate but essentially accumulated as granules in the endoplasm inside or outside the vacuoles. With reduced bacterial population, cobalt was also incorporated into the ciliates whatever the Co concentration.

Indeed, ciliates seemed to need bacteria in order to use the organic cobalt for growth.

Introduction.

Le cobalt, partie intégrante de la vitamine B₁₂, ou cofacteur d'enzymes est essentiel aux microorganismes et en particulier à ceux qui synthétisent les cobalamines. Les besoins en cobalt varient énormément selon les microorganismes (Letunova et Koval'skij, 1978) de 0,1 µg/l pour *Rhizobium* à 1-3 mg/l pour *Propionibacterium*. De même, les concentrations optimales de Co pour la synthèse de la vitamine B₁₂ varient selon les microorganismes : Letunova et Koval'skij (1978) citent des valeurs de 0,01 mg/l pour les bactéries du rumen et de 4,64 pour les microorganismes du sol. Quant à la microfaune du rumen, elle est incapable de synthétiser les vitamines (Oxford, 1955 ; Usuelli, 1964). Il est probable que ses

besoins sont satisfaits par ses relations symbiotiques avec les bactéries. Outre la vitamine B₁₂, on ne sait pas si les protozoaires nécessitent du cobalt inorganique. Or, il est connu que le cobalt, chez certains microorganismes, peut partiellement se substituer au manganèse dans certains coenzymes (Mori et Kandatsu, 1975).

Le propos de ce travail est de montrer le rôle du cobalt soit sous forme inorganique, soit sous forme organique (vitamine B₁₂), dans le comportement des ciliés en culture *in vitro* et l'influence des bactéries dans l'utilisation de cet oligo-élément par la microfaune, en suivant :

- d'une part l'effet du cobalt et de la vitamine B₁₂ sur la croissance des ciliés en culture en présence d'une population bactérienne normale ou réduite ;
- d'autre part, à l'aide de la microanalyse, l'incorporation du cobalt dans les ciliés provenant : a) de cultures à population bactérienne normale, b) de cultures à population bactérienne réduite, c) de cultures prétraitées aux antibiotiques auxquelles une population bactérienne préincubée avec du cobalt est ajoutée.

Matériel et méthodes.

1. — Conditions de culture *in vitro* des ciliés du rumen.

Source des ciliés. Technique de culture. — Les ciliés provenant de contenus de rumen de moutons fraîchement abattus sont séparés des débris végétaux par filtration sur gaze et centrifugation à 300 g pendant 4 min., puis lavés avec la solution saline de Coleman.

Le milieu de culture est celui décrit par Coleman (1971) sans addition d'herbe séchée. Les ciliés sont ensemencés dans le milieu salin (débarrassé de son oxygène par un barbotage gazeux d'azote) additionné de liquide de rumen sans ciliés à la concentration de 10 p. 100 et d'amidon de blé à la concentration de 0,01 p. 100 et placés à 38 °C. L'effet de l'addition *in vitro* de différentes concentrations de cobalt (0,1 à 10 µg/ml) et de vitamine B₁₂ (0,12 à 2,4 µg/ml) sur la croissance des ciliés est étudié.

La population ensemencée ($1,5 \times 10^4$ /ml) est composée essentiellement de ciliés du genre *Entodinium* (*E. simplex*, *E. minimum*, *E. caudatum*, *E. bursa*).

Pour le renouvellement du milieu, les cultures sont divisées tous les 7 jours, selon la technique de Coleman (1972). Le cobalt (CoCl₂) ou la vitamine B₁₂ aux différentes concentrations sont ajoutés régulièrement tous les 2 jours (fig. 1a-3) ou tous les 6 jours (fig. 1b).

Pour déterminer la part des bactéries dans la stimulation de la croissance des ciliés par l'addition de cobalt, deux expériences sont réalisées :

A) D'une part les ciliés sont mis en culture avec des antibiotiques permettant d'obtenir des cultures à population bactérienne réduite (10³ B/ml). Le mélange d'antibiotiques utilisé ⁽¹⁾ comporte :

⁽¹⁾ (Composition d'antibiotiques de Hino et Kametaka (1977) modifiée par Bonhomme *et al.* (1981) pour l'obtention des ciliés axéniques).

- Antibiotiques A : carbénicilline, ampicilline, céphaloridine ;
- Antibiotiques B : chloramphénicol, spiramycine, tétracycline.

Les concentrations utilisées sont de 250 µg/ml dans le milieu d'incubation pour chacun des antibiotiques A et 50 µg/ml pour chacun des antibiotiques B. Le liquide de rumen ajouté est autoclavé (110 °C, 20 min.). Chaque jour, la culture reçoit une concentration de 50 µg/ml de chacun des antibiotiques A et 10 µg/ml de chacun des antibiotiques B. Le cobalt ou la vitamine B₁₂ aux différentes concentrations sont ajoutés régulièrement tous les 2 jours.

B) D'autre part, les ciliés sont traités aux mêmes antibiotiques mais à la concentration double pendant 24 h et sont lavés une à deux fois avec la solution saline de Coleman. Ces ciliés sont remis en culture en présence d'un culot de bactéries de rumen lavées qui ont été incubées dans les mêmes conditions que les ciliés, 24 h avec du cobalt à différentes concentrations. La culture témoin reçoit un culot de bactéries non incubées avec du cobalt.

Le dénombrement des ciliés est réalisé à l'aide de la cellule de comptage Fuchs-Rosenthal. Le dénombrement des bactéries est effectué en anaérobiose sur le milieu de culture M. 8 (Kurihara *et al.*, 1968) fourni par Fonty ⁽²⁾.

2. — Microanalyse du cobalt intracellulaire.

Préparation des ciliés. Techniques de microanalyse. — Les espèces ciliaires étudiées sont les suivantes : *Entodinium caudatum*, *Entodinium simplex*, *Entodinium bursa* essentiellement et *Eudiplodinium magii*, *Epidinium ecaudatum*.

L'étude est réalisée :

A) *Sur des préparations « in toto »*. Les populations analysées ont été incubées avec différentes concentrations de cobalt de 1 à 20 µg/ml pendant 4 h, 24 h et 3 jours. Les ciliés sont ensuite fixés à l'alcool, et déposés sur des lames de terphane et recouverts d'une couche de carbone.

L'analyse est également réalisée sur des étalements de ciliés traités aux antibiotiques et incubés avec 20 µg/ml de cobalt pendant 24 h et sur des ciliés traités aux antibiotiques 24 h et mis en culture 40 h avec des bactéries incubées avec du cobalt à la concentration de 50 µg/ml pendant 24 h.

B) *Sur des coupes ultrafines.* — Les ciliés ont été incubés pendant 6 h avec du cobalt à la concentration de 100 µg/ml. Les ciliés sont ensuite fixés à la glutaraldéhyde (4 p. 100) et à l'acide osmique (1 p. 100) puis déshydratés et inclus dans l'araldite.

Des observations au MET à haute résolution (JEM 100c) ont été réalisées sur des coupes non colorées.

Le microanalyseur X utilisé (CAMEBAX) consiste en un microscope électronique à balayage (MEB) associé à des spectromètres à dispersion de longueurs d'onde et à sélection d'énergie et équipé d'un microscope électronique à transmission (MET).

⁽²⁾ Laboratoire de Microbiologie, INRA, Theix, 63110 Beaumont.

Les conditions expérimentales ont été de 20 kV et 50 nA pour les préparations *in toto* et 45 kV, 100 nA pour les coupes ultrafines.

Deux méthodes d'analyse ont été utilisées :

- une méthode qualitative de détection de la présence de cobalt sous forme de « traversée ». Le spectromètre X calé sur la raie $K\alpha$ du cobalt, on réalise l'analyse le long d'une ligne de balayage traversant l'échantillon ;
- une méthode semiquantitative de mesure du cobalt présent dans des volumes comparables, est réalisée par balayage de surfaces identiques de différents ciliés ou d'un même cilié.

Les comptages sont réalisés sur la raie $K\alpha$ (S) et à des angles $\theta \pm \Delta\theta$ ($\Delta\theta = 0,32^\circ$) pendant un temps de 50 sec. Le bruit de fond (B) sous le pic caractéristique $K\alpha$ Co est calculé par interpolation linéaire à partir de ces deux dernières mesures. L'erreur statistique sur la mesure du signal caractéristique $Sc = S - B$ est estimée comme $\sigma = \sqrt{S + B}$ et l'intervalle de confiance utilisé est $Sc + 2\sigma$.

Sur les préparations *in toto* les surfaces balayées correspondent d'une part au cilié entier ($25 \times 25 \mu\text{m}^2$ et $35 \times 35 \mu\text{m}^2$ pour le genre *Entodinium* et $75 \times 75 \mu\text{m}^2$ pour les genres *Epidinium* et *Eudiplodinium*). D'autre part, afin de mettre en évidence les variations de la répartition du cobalt intracellulaire, différentes régions d'un même cilié correspondant à des surfaces de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ pour le genre *Entodinium* et $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ pour *Eudiplodinium magii* ont été analysées ⁽³⁾.

Sur les coupes ultrafines, le volume analysé est d'environ $0,02 \mu\text{m}^3$, ce qui permet de détecter 10^{-17} g de cobalt environ.

Des images de ciliés en MEB sont également réalisées. La qualité de ces images est médiocre parce que les conditions exigées pour l'obtention de bonnes images (métallisation à l'Au ou l'Au-Pd de la surface de l'échantillon et inclinaison de celui-ci) ne sont pas compatibles avec l'analyse qui se fait sur des échantillons recouverts d'une couche de carbone et placés horizontalement.

Résultats.

1. — Effet du cobalt et de la vitamine B_{12} sur la croissance des ciliés *in vitro* en présence d'une population bactérienne normale.

Les résultats exprimés dans les figures 1, 2 et 3 et dans les tableaux 1 et 2 ont été choisis parmi plusieurs expériences comme étant les plus représentatifs, mais dans tous les essais, nous avons eu les mêmes effets pour les mêmes traitements.

A) *Addition de cobalt tous les deux jours (fig. 1a).* — Par rapport au témoin P, l'addition de $0,1 \mu\text{g/ml}$ de cobalt permet une croissance optimum de la population ciliaire. La concentration de $10 \mu\text{g/ml}$ est létale.

⁽³⁾ Pour un échantillon homogène, les résultats d'analyses sont indépendants de la surface balayée.

B) *Addition de cobalt tous les six jours (fig. 1b).* — On constate que la concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$ de cobalt stimule la croissance de la population ciliaire et qu'une diminution de la croissance est sensible à partir de 5 $\mu\text{g/ml}$ de Co. La concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$, toujours inhibitrice, ralentit très nettement la croissance.

FIG. 1.

- a) *Effet du cobalt sur la population ciliaire (Entodinium) en culture « in vitro » (addition de Co tous les 2 jours).*
 b) *Effet du cobalt sur la population ciliaire (Entodinium) en culture « in vitro » (addition de Co tous les 6 jours).*

C) *Arrêt de l'addition de cobalt (fig. 2).* — Lorsqu'au 6^e jour, l'on arrête l'addition de cobalt, administrée tous les 2 jours, aux cultures, on constate dès le jour suivant une baisse de moitié de la croissance pour la concentration de 0,1 μg et une évolution de la croissance semblable à celle du témoin pour la concentration de 1 μg . Aux concentrations toxiques de 5 et 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, on observe une légère stimulation à 5 μg mais la population reste à un niveau inférieur à celle du témoin. A 10 μg l'arrêt de l'addition de cobalt survient plus tard et la population déjà réduite décroît graduellement pour disparaître entre le 8^e et le 11^e jour.

FIG. 2. — Effet de l'arrêt de l'addition du cobalt sur la population ciliaire (*Entodinium*) en culture « in vitro ».

D) *Addition de la vitamine B₁₂ tous les 2 jours (fig. 3).* — Les concentrations de 0,12 et 0,24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ stimulent la croissance des ciliés ; dès 1,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ la vitamine B₁₂ est inhibitrice.

FIG. 3. — Effet de la vitamine B₁₂ sur la population ciliaire (*Entodinium*) en culture « in vitro » (addition de vitamine B₁₂ tous les 2 jours).

2. — Effet du cobalt et de la vitamine B₁₂ sur la survie des ciliés en présence d'une population bactérienne réduite (10³ B/ml).

Cette population bactérienne est maintenue réduite en ajoutant quotidiennement des antibiotiques. Dans ces conditions, la population ciliaire disparaît en 3 jours dans le témoin. Les concentrations de 0,5 et 1 µg/ml de Co maintiennent les ciliés à un niveau de population de 10³/ml pendant 3 jours (essai 1). Mais la durée de survie est peu prolongée par rapport à celle du témoin (P + ant) (tabl. 1a). Lorsque la concentration de cobalt augmente, (Co5, Co10) (essai 2), la

TABLEAU 1a

*Effet du cobalt sur la survie des ciliés (10³/ml)
en présence d'une population bactérienne réduite (10³ B/ml)*

Milieu d'incubation	Temps d'incubation (jours)			
	1	2	3	4
Essai 1 :				
P	12	8	19	22
P + ant	9,2	3,7	0	
P + ant Co 0,1	13	4,6	0	
P + ant Co 0,5	13	5,1	4	0
P + ant Co 1	14	7,7	2,6	
Essai 2 :				
P + ant	33	11	0	
P + ant Co 5	28	0,3	0	
P + ant Co 10	15	0		

P : protozoaires (10³/ml) ; ant : antibiotiques.

Co : 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 : cobalt aux concentrations de 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 et 10 µg/ml.

Addition d'antibiotiques tous les jours. Addition de cobalt tous les deux jours.

TABLEAU 1b

*Effet de la vitamine B₁₂ sur la survie des ciliés
en présence d'une population bactérienne réduite (10³ B/ml)*

Milieu d'incubation	Temps d'incubation (jours)				
	1	2	3	4	5
P	12	8	19	22	14
P + ant	9,2	3,7	0		
P + ant B ₁₂ 0,12	9,2	8,4	2,3	0,15	0
0,24	8,9	7,5	7,2	0,9	0
1,2	13	8	3,3	0,9	0
2,4	18	7,2	1,5	0,7	0
12	9,6	9,7	1,5	0	0
24	16	2,3	0,3	0	0

P : protozoaires (10³/ml) ; ant : antibiotiques.

B₁₂ : 0,12 ; 0,24 ; 1,2 ; 2,4 ; 12 ; 24 : vitamine B₁₂ aux concentrations de : 0,12 ; 0,24 ; 1,2 ; 2,4 ; 12 et 24 µg/ml.

Addition d'antibiotiques tous les jours. Addition de vitamine B₁₂ tous les deux jours.

population ciliaire baisse rapidement pour disparaître le 3^e jour. Dans le même essai 1, avec la vitamine B₁₂ les concentrations de 0,24, 1,2 et 2,4 µg/ml maintiennent les ciliés à un niveau de 10³/ml au 4^e jour (tabl. 1b). La survie des ciliés est davantage prolongée par un apport de cobalt sous forme organique (vitamine B₁₂) que par un apport de cobalt inorganique.

3. — *Effet des bactéries incubées avec du cobalt sur la croissance des protozoaires (tabl. 2).*

Les ciliés en culture, débarrassés en grande partie des bactéries après 24 h d'incubation (P — B) en présence d'antibiotiques puis lavés, reçoivent des bactéries non traitées (P + B) d'une part et d'autre part des bactéries incubées 24 h avec du cobalt (P + BCo) aux concentrations de 10, 20 et 50 µg/ml et lavées. On observe une reprise de la croissance des protozoaires. Cette stimulation est davantage prononcée par l'addition de bactéries incubées avec du cobalt. La population bactérienne dans ces cultures est de l'ordre de 10⁷ B/ml.

TABLEAU 2

Etude de la population ciliaire (prétraitée 24 h aux antibiotiques) en culture « in vitro » après l'apport de bactéries préincubées (24 h) avec du cobalt

Milieu d'incubation	Temps d'incubation (jours)			
	2	5	6	9
P — B	1,5			
P + B	10	13	8,9	7,5
P + B Co ₁₀	9,7	17,8	14	—
P + B Co ₂₀	9,4	17	15,6	15
P + B Co ₅₀	8,9	6,5	7,6	13,7

P — B disparaît le 4^e jour. B et B Co : 10⁷/ml. P : 10³/ml.

4. — *Incorporation du cobalt dans les ciliés du rumen.*

A) *Observation en microscopie électronique des ciliés incubés avec CoCl₂.*

Les micrographies électroniques (fig. 4a) montrent de nombreux granules denses (G) (absents dans le témoin) souvent envacuolés dans l'endoplasme des ciliés. Des granules sont également parfois observés à la surface des bactéries. A la concentration utilisée (100 µg/ml), le cobalt est toxique pour ces ciliés et l'on peut observer une vacuolisation assez importante de la cellule en réponse à cette agression. Des vacuoles de plus grandes dimensions et parfois transparentes aux électrons apparaissent également. On n'observe pas d'autres modifications ultra-structurales.

FIG. 4. — Microanalyse par sonde électronique d'une coupe ultrafine de cilié « *Entodinium* » (incubation avec Co 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pendant 6 h).

- a) Inclusions de cobalt (G) dans l'endoplasme du cilié, celui-ci n'ayant subi aucun traitement de coloration. $\times 14\,500$.
- b) « Traversée » : profil d'analyse du cobalt le long d'une ligne de balayage allant de l'endoplasme à l'extérieur de la coupe du cilié (fig. 4a).

B) Microanalyse du cobalt intracellulaire par sonde électronique.

— *Sur les préparations « in toto »* : La présence de cobalt dans les protozoaires est clairement observée dans les enregistrements des « traversées » (concentration 10 µg/ml) (fig. 5). La quantité de cobalt incorporée s'élève avec le taux de cobalt du milieu d'incubation (tabl. 3). Pour un taux de cobalt donné, l'incorpora-

TABLEAU 3

Taux de comptages caractéristiques (Sc/50 s) du cobalt dans différents « Entodinium » en relation avec sa concentration dans le milieu de culture (durée d'incubation 24 h) (surface balayée : 35 × 35 µm²)

Concentration de cobalt dans le milieu µg/ml	<i>Entodinium simplex</i>	<i>Entodinium caudatum</i>	<i>Entodinium bursa</i>
1	0	107 ± 81	—
10	175 ± 70	334 ± 75	890 ± 103
20	915 ± 99	1 256 ± 111	1 615 ± 125

Dans les tableaux 3 à 7 : E₀ = 20 kV ; I_a = 50 nA.

TABLEAU 4

Taux de comptages caractéristiques (Sc/50 s) du cobalt dans « Endotinium Caudatum » incubés avec 10 µg de cobalt/ml en fonction du temps d'incubation (surface balayée 35 × 35 µm²)

Temps d'incubation	<i>Entodinium caudatum</i>
24 h	334 ± 75
3 j	1 100 ± 112

tion du cobalt semble la même chez les ciliés de la même espèce. Lorsque le temps d'incubation s'élève le taux de cobalt intracellulaire est également augmenté (tabl. 4). La concentration la plus importante de cobalt se trouve toujours localisée dans l'endoplasme central (tabl. 5).

FIG. 5. — Microanalyse par sonde électronique sur des préparations de ciliés « Entodinium » « in toto ». Mise en évidence du cobalt intracellulaire.

- « Traversée » d'un « Entodinium » d'une culture incubée avec du cobalt à la concentration de 10 µg/ml pendant 24 h. × 1 800.
- « Traversée » d'un « Entodinium » d'une culture traitée aux antibiotiques et incubée avec du cobalt à la concentration de 20 µg/ml pendant 24 h. × 1 560.

TABLEAU 5

Taux de comptages caractéristiques (Sc/50 s) du cobalt dans différentes régions d'Entodinium incubés avec 10 µg de cobalt/ml pendant 24 h (surface balayée 10 × 10 µm²)

Espèces	Endoplasme central	Ectoplasme et endoplasme oraux	Ectoplasme et endoplasme caudaux
<i>Entodinium caudatum</i> ...	490 ± 77	412 ± 79	350 ± 76
<i>Entodinium bursa</i>	900 ± 98	622 ± 87	422 ± 80

Soumis à un même taux de cobalt, les ciliés, s'ils sont en même temps traités aux antibiotiques, incorporent en général autant de cobalt que les témoins non traités (tabl. 6 et fig. 5b). Les ciliés débarrassés de la plus grande partie des bactéries par un traitement aux antibiotiques pendant 24 h et mis en présence de bactéries incubées avec du cobalt au taux de 50 µg/ml pendant 40 h incorporent ce cobalt (tabl. 7).

TABLEAU 6

Comparaison des taux de comptages caractéristiques (Sc/50 s) du cobalt dans « Entodinium », « Epidinium » et « Eudiplodinium » et dans différentes régions d'« Eudiplodinium », traités ou non aux antibiotiques et incubés avec du cobalt au taux de 20 µg/ml pendant 24 h

Espèces	Surfaces balayées	non traitées	traitées
<i>Entodinium bursa</i>	25 × 25 µm ²	2 476 ± 137	2 334 ± 138
<i>Epidinium ecaudatum</i>	75 × 75 µm ²	1 623 ± 120	974 ± 112
<i>Eudiplodinium magii</i>	75 × 75 µm ²	1 707 ± 125	1 418 ± 117
Endoplasme central	25 × 25 µm ²	2 456 ± 143	2 092 ± 133
Ectoplasme et endoplasme oraux	25 × 25 µm ²	263 ± 87	257 ± 88
Ectoplasme et endoplasme caudaux	25 × 25 µm ²	653 ± 96	380 ± 90

TABLEAU 7

Taux de comptages caractéristiques (Sc/50 s) du cobalt dans différents « Entodinium » et dans différentes régions de ces ciliés traités aux antibiotiques 24 h et mis en culture 40 h avec des bactéries incubées avec du cobalt à la concentration de 50 µg/ml pendant 24 h (surface balayée 35 × 35 µm²).

Différents <i>Entodinium</i>	Nombre de coups
<i>E. caudatum</i>	746 ± 94
<i>E. caudatum</i>	617 ± 96
<i>E. bursa</i>	1 162 ± 108
<i>E. bursa</i>	967 ± 98
<i>E. caudatum</i>	
Endoplasme central	608 ± 95
Endoplasme + ectoplasme oraux	418 ± 89
Endoplasme + ectoplasme caudaux	432 ± 80

— *Sur les coupes ultrafines* : La présence de cobalt dans les différentes régions d'une coupe ultrafine de ciliés incubés avec du chlorure de cobalt (100 µg/ml de Co) est mise en évidence par l'analyse sur une ligne de balayage traversant la zone extérieure du cilié, la cuticule, l'ectoplasme et un granule dense (fig. 4b). Des comptages réalisés dans différentes régions, sur différents granules dans l'endoplasme des ciliés, sur des bactéries intra et extracellulaires précisent ces résultats (tabl. 8).

TABLEAU 8

Taux de comptages caractéristiques (Sc/100 s) du cobalt dans les ciliés « Entodinium ».
Concentration de cobalt dans le milieu d'incubation 100 µg/ml pendant 6 h

Régions :	Extérieur	Cuticule Ecto- plasme	Endo- plasme	Vacuoles vides	Granule non envacuolé	Granules envacuolés	Bactéries enva- cuolées	Bactéries externes
cps/100 s	0	111 ± 62	176 ± 65 162 ± 66	0	781 ± 85	559 ± 80 314 ± 72 1 074 ± 93	254 ± 71 158 ± 68	229 ± 74 130 ± 76

Le cobalt est présent dans tout le cilié, mais il se concentre dans les granules denses envacuolés ou non dans l'endoplasme. Le taux de cobalt des bactéries intra ou extracellulaires est essentiellement le même aux erreurs de comptage près.

Discussion.

1. — *Effet du cobalt et de la vitamine B₁₂ sur la croissance des protozoaires en culture « in vitro ».*

Mori et Kandatsu (1975) notent que l'activité des ciliés en culture décroît quand le cobalt dans le milieu d'incubation est converti en composé chélaté avec EDTA, mais augmente en présence d'un excès de cobalt (0,04 µg/ml). Selon ces auteurs une petite quantité de cobalt serait nécessaire aux protozoaires.

Dans nos expériences, le cobalt stimule la croissance de la population ciliaire dans une zone de concentrations de 0,1 à 1 µg/ml selon la fréquence de ses additions.

Il semble que le cobalt soit utilisé au fur et à mesure de ses adjonctions, soit en étant directement absorbé par les protozoaires, soit en passant par des bactéries elles-mêmes ingérées par les ciliés. Lorsqu'il n'y a plus addition de cobalt, les cultures aux faibles concentrations retrouvent après quelques jours le même niveau de population que celui du témoin. Quant aux cultures aux concentrations faiblement toxiques, l'arrêt de l'addition de cobalt paraît stimuler légèrement la population ciliaire qui reste cependant inférieure à la population témoin.

En présence d'une concentration de 0,12 à 0,24 $\mu\text{g/ml}$ de vitamine B_{12} , soit 0,005 à 0,01 $\mu\text{g Co/ml}$, on observe une stimulation de la croissance des ciliés. Ainsi le cobalt sous forme de vitamine B_{12} est actif à des concentrations dix à vingt fois moindres que le cobalt inorganique, sans effet à ce taux.

Dans nos expériences, le cobalt ajouté sous forme de vitamine B_{12} est toxique à des taux 10 à 20 fois plus faibles (1,2 à 2,4 $\mu\text{g/ml}$ B_{12} soit 0,05 à 0,1 $\mu\text{g Co/ml}$) que le cobalt inorganique.

Aux concentrations élevées (10 $\mu\text{g/ml}$) le cobalt inorganique est très inhibiteur ; les ciliés sont plus petits : *Entodinium minimum* et *Entodinium simplex* sont observés, *Entodinium caudatum* disparaît et la population ciliaire décroît.

La cellulolyse est très sensible à un excès de cobalt. Les concentrations inhibitrices se situent entre 2,5 et 30 $\mu\text{g/ml}$ (Martinez, 1972). Mais la protéosynthèse n'est que légèrement inhibée à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ (Mac Naught et Owen, 1950). Uesaka *et al.* (1966) utilisent *in vitro* les concentrations de 0 à 1 000 $\mu\text{g/ml}$ et notent dès 50 $\mu\text{g/ml}$ (après 20 h d'incubation) la réduction de l'activité fermentaire des ciliés par baisse de la production des acides gras volatils, sans que les ciliés, même aux concentrations supérieures à 50 $\mu\text{g/ml}$, en soient affectés. Cependant, nous avons observé la disparition des ciliés après 48 h d'incubation avec du cobalt à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$.

2. — Localisation du cobalt incorporé dans les protozoaires.

La microanalyse par sonde électronique permet la détection intracellulaire du cobalt dans les ciliés ainsi que sa localisation ultrastructurale dans les coupes ultrafines.

Dans les conditions expérimentales d'analyse utilisées, la détection est réalisable sur les ciliés *in toto* incubés avec du chlorure de cobalt, essentiellement à partir de la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ de cobalt. La localisation au niveau ultrastructural n'est possible que sur des ciliés incubés avec des concentrations de cobalt élevées (100 $\mu\text{g/ml}$ de Co) en raison du faible volume analysé (de l'ordre de $0,02 \mu\text{m}^3$). Les ciliés incubés avec ces concentrations élevées de cobalt disparaissent en 48 h. Aussi les résultats obtenus sur la localisation du cobalt ne peuvent être extrapolés aux conditions *in vivo* et sont seulement indicatifs.

D'autre part, les résultats de la microanalyse sont semi-quantitatifs car il est difficile d'obtenir des coupes ou des étalements uniformes.

Nos micrographies électroniques montrent la présence de granules intracytoplasmiques très denses dans les ciliés lorsqu'ils sont incubés avec des concentrations élevées de cobalt. La microanalyse X montre la présence de cobalt dans ces granules ainsi que dans différentes régions des ciliés.

Le cobalt, vraisemblablement absorbé par la zone orale, est présent dans tout le cilié, mais il apparaît essentiellement dans l'endoplasme où il se concentre dans les granules envacuolés ou non. Lorsque le taux de cobalt dans le milieu de culture s'élève, les ciliés absorbent davantage de cobalt même lorsqu'il devient toxique et l'on observe par rapport au témoin une grande vacuolisation dans l'endoplasme. Il n'y a pas d'autres modifications ultrastructurales particulières.

Quel que soit le genre des ciliés impliqué : *Entodinium*, *Polyplastron*, *Ophryoscolex* ou *Epidinium*, on observe la présence de cobalt dans ces cellules, plus particulièrement localisé au niveau de granules dans l'endoplasme. On note également l'incorporation du cobalt dans les bactéries. On ne sait cependant pas si la formation de granules répond à un mécanisme de détoxification.

Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus dans l'étude de l'incorporation du zinc par les mêmes techniques (Bonhomme *et al.*, 1979) et montrent que ces protozoaires sont capables d'incorporer divers éléments, ce qui explique leur sensibilité aux taux excessifs de zinc (Bonhomme *et al.*, 1980) ou de cobalt.

3. — *Rôle des bactéries dans l'utilisation du cobalt par les protozoaires.*

En présence d'une population bactérienne réduite, il apparaît que le cobalt a un léger effet sur la survie des ciliés. Quant à la vitamine B₁₂, son effet est plus net que celui du cobalt inorganique à des proportions 100 fois moindres.

L'apport de bactéries préincubées avec du cobalt aux concentrations de 10 à 50 µg/ml à des cultures traitées aux antibiotiques stimule davantage la croissance des ciliés que l'apport simple de bactéries. Cet effet stimulant est peut-être dû à l'apport de vitamine B₁₂ par les bactéries. Les bactéries incubées en présence de cobalt ont probablement synthétisé la vitamine B₁₂ ainsi qu'il l'a été montré avec des contenus de rumen (Gawthorne, 1970) sur une courte période. *In vitro*, Mori et Kandatsu (1975) ont noté une incorporation élevée de ⁶⁰Co dans la fraction bactérienne et selon Smith et Marston (1970), l'activité de la vitamine B₁₂ *in vivo* se retrouve essentiellement (95 p. 100) dans cette fraction bactérienne.

Cependant, la présence de la population bactérienne n'apparaît pas nécessaire à l'incorporation du cobalt dans les protozoaires, puisque l'on note une incorporation presque identique du cobalt lorsque les ciliés sont traités aux antibiotiques. De plus, les protozoaires peuvent incorporer aussi bien le cobalt associé aux bactéries lavées.

Nos essais indiquent que le cobalt inorganique stimule légèrement la croissance des ciliés mais, lorsqu'il est sous forme de vitamine B₁₂, il est beaucoup plus actif.

En *conclusion*, les ciliés ont des exigences en oligoéléments, en particulier en cobalt essentiellement sous forme de vitamine B₁₂. Les bactéries du rumen qui la synthétisent et la contiennent, une fois ingérées, satisfont à leurs exigences de cobalt et de vitamine B₁₂. Selon Coleman (1971) le taux de digestion des bactéries par les protozoaires varie avec l'espèce bactérienne. Sitôt lysées, les bactéries libèrent la vitamine B₁₂ synthétisée susceptible de stimuler la croissance des ciliés.

Il apparaît donc que l'utilisation du cobalt sous forme de vitamine B₁₂ par les ciliés du rumen passe par les bactéries.

Reçu en mai 1981

Accepté en septembre 1981

La partie microanalyse a été réalisée au Laboratoire de Biophysique dirigé par le Professeur P. Galle, Service de microanalyse, CNRS-INSERM, Faculté de Médecine, Créteil.

Références

- BONHOMME-FLORENTIN A., 1974. Contribution à l'étude de la physiologie des ciliés Entodiniomorphes endocommensaux des ruminants et des équidés. *Ann. Sci. nat.*, **12**, 155-283.
- BONHOMME A., DURAND M., DUMAY C., BEAUMATIN P., 1979. Etude *in vitro* du comportement des populations microbiennes du rumen en présence de zinc sous forme de sulfate. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **19**, 937-942.
- BONHOMME A., QUINTANA C., DURAND M., 1980. Electron microprobe analysis of zinc incorporation into rumen protozoa. *J. Protozool.*, **27**, 491-497.
- BONHOMME A., FONTY G., SENAUD J., 1981. Obtention et survie de Polyplastron multivesiculatum (cilié Entodiniomorphe) en culture axénique. *J. of Protozool.* (sous presse).
- COLEMAN G. S., 1971. The cultivation of rumen Entodiniomorphid Protozoa, 159-176. In CHAPTON D., BOARD R., *Isolation of anaerobes*, Acad. Press, N. Y.
- COLEMAN G. S., 1972. The metabolism of starch, glucose, aminoacid pyrimidine and bacteria by the rumen ciliate *Entodinium simplex*. *J. gen. Microbiol.*, **71**, 117-131.
- GAWTHORNE J. M., 1970. *In vitro* studies of the factors affecting the metabolism of cobamides and cobinamides by sheep rumen microorganisms. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, **48**, 293-300.
- HINO T., KAMETAKA M., 1977. Gnotobiotic and axenic culture of rumen protozoan *Entodinium caudatum*. *J. gen. appl. Microbiol.*, **23**, 37-48.
- KURIHARA Y., EADIE J. M., HOBSON P. N., MANN S. O., 1968. Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the sheep rumen. *J. gen. Microbiol.*, **51**, 267-288.
- LETUNOVA S. V., KOVAL'SKIJ V. V., 1978. *Ecologie géochimique des microorganismes*. Ed. Nauka, Moscou, 32-36, 62-70.
- MAC NAUGHT M., OWEN E., 1950. The utilization of non protein nitrogen in the bovine rumen. 5. — The isolation and nutritive value of a preparation of dried rumen bacteria. *Biochem. J.*, **46**, 32-36.
- MARTINEZ A., 1972. *Effect of some major trace element interactions upon « in vitro » rumen cellulose digestion*. Thes. Oregon State Univ.
- MORI B., KANDATSU M., 1975. On the relationship between activity of rumen microbes and cobalt level in the culture medium. *Jap. J. zootech. Sci.*, **46**, 558-564.
- OXFORD A. E., 1955. The rumen ciliate protozoa. Their chemical composition, metabolism, requirements for maintenance and culture and physiological significance for the host. *Exper. Parasit.*, **4**, 569-605.
- SILVER S., JASPER P., 1977. Manganese transport, 115. In WEINBERG E. D., *Microorganisms and minerals*. M. Delker Inc., N. Y., Basel.
- SMITH R., MARSTON H., 1970. Production, absorption distribution and excretion of vitamin B₁₂ in sheep. *Brit. J. Nutr.*, **24**, 857.
- UESAKA S., KAWASHIMA R., ZAMBAYASHI M., 1966. Effect of several mineral elements on the activity of volatile fatty acids production of rumen protozoa. *Bull. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ.*, **29**, 21-31.
- USUELLI F., 1964. Sulfonamide, Antibiotika, Vitamine und Mikroorganismen des Pansens. *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Dtsch.*, **19**, 46-50.
-