

N° d'ordre : 527

50376
1981
234

50376
1981
234

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Daniel DIVE

**NUTRITION ET CROISSANCE
DE COLPIDIUM CAMPYLUM
CONTRIBUTION EXPERIMENTALE
POSSIBILITES D'APPLICATION
EN ECOTOXICOLOGIE**



Soutenue le 16 octobre 1981 devant la Commission d'Examen

M. E. VIVIER	Président
H. LECLERC	Rapporteur
L. RASMUSSEN	Rapporteur
S. FRONTIER	Rapporteur
G. PERSOONE	Rapporteur
P. DE PUYTORAC	Examineur
A. RICHARD	Examineur

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIN DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A.LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie Organique Biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. ROBE Bernard	Sciences Economiques
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. CHAPOTON Alain	Electronique

M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et Environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M. BERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la Réactivité Chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. CHAINAUT André	Biologie Animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie Animale
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie Hertziennne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie Hertziennne
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des Cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie Mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. HOUDART René	Physique Atomique et Moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et Statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie Hertziennne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT Francois	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie Hertziennne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M. LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKÉ Bruno	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques

M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M ^{lle} MARQUET Simone	Probabilités
M. MEGDELIN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTJELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquées
M ^{me} NGUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M ^{lle} PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie Animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAULT Jean-François	Géologie Structurale
M. RICHARD Alain	Biologie Animale
M. RIETSCH François	Physique des Polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
M ^{me} SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie Moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
M ^{lle} SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie Alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VERBERT André	Biochimie
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
M ^{me} ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

A mes Parents

A ma femme et
à mes enfants

Monsieur le Professeur LECLERC, Directeur de l'Unité I.N.S.E.R.M. 146
m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire. Il m'a
accordé sa confiance et je lui dois d'être entré à l'I.N.S.E.R.M.
C'est grâce à son dévouement, à ses conseils et aux moyens matériels
qu'il m'a fournis durant toute la durée de mon travail que je peux
aujourd'hui passer cette thèse. Ce jour est pour moi l'occasion de
lui exprimer mon profond respect, mon dévouement et ma sincère
reconnaissance.

Je remercie *Monsieur le Professeur VIVIER*, de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être mon Directeur scientifique pendant ce travail. Il n'a jamais cessé de m'encourager et n'a négligé aucune occasion pour me mettre en rapport avec d'autres personnalités scientifiques susceptibles de m'aider dans mon travail. Je le prie d'accepter ici ma plus profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur DE PUYTORAC, de l'Université de Clermont Ferrand, a accepté de faire partie de mon Jury. Il s'est intéressé depuis de longues années à mon travail et a mis sa grande compétence à mon service pour me prodiguer ses conseils et ses critiques. Qu'il soit assuré de ma plus sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur RASMUSSEN, de l'Université de Odense (Danemark), m'a accueilli en stage. Nous avons ouvert ensemble un chapitre de la Biologie du *Colpidium* et nous espérons le mener à son terme. Le *Professeur RASMUSSEN* joint à ses immenses connaissances une gentillesse et une chaleur humaine qui ont beaucoup contribué à l'évolution de ce travail. Malgré l'éloignement de nos laboratoires, nous collaborons comme deux proches voisins. L'honneur qu'il me fait en acceptant de faire partie de mon Jury de thèse, me touche profondément et je tiens ici à lui exprimer toute mon admiration et toute ma gratitude.

Monsieur le Professeur FRONTIER a accepté de mettre ma thèse à l'épreuve de ses connaissances en écologie et je lui demande toute son indulgence. Je lui exprime également mon plus profond respect et toute ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur PERSOONE, de l'Université de Gand (Belgique), a été mon conseiller précieux en écotoxicologie. Il m'a mis en contact avec de très nombreuses personnalités scientifiques et il a mis à mon service son réalisme et son dynamisme débordants. Je tiens ici à lui exprimer toute ma gratitude.

Je remercie *Monsieur le Professeur RICHARD*, de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, d'avoir accepté de faire partie de mon Jury de thèse. Il m'a déjà, dans le passé, fait profiter de son expérience et j'ai grand plaisir à lui exprimer ici ma gratitude.

Je tiens à remercier tout spécialement, pour leur collaboration scientifique dans des travaux communs, *Madame le Professeur ERB* de l'U.E.R. de Pharmacie de Lille, le *Docteur Serge MOREAU* de l'Unité I.N.S.E.R.M. 42, *Messieurs MOSCHETTO, DEVYNCK* et *LEROY* du Centre de Technologie Biomédicale de l'I.N.S.E.R.M., le *Docteur GROSLIERE* de l'Université de Clermont Ferrand et le *Docteur PORCHER* de l'Université des Sciences et Techniques de Lille.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'appui technique que m'ont apporté *Mesdames FOURMAUX* et *ROHART* dans de multiples domaines. Elles y ont mis toute leur intelligence et leur dévouement. Leur nom doit être associé à la réalisation de cette thèse. Je tiens ici à les remercier sincèrement et je souhaite que notre collaboration puisse se poursuivre longuement dans le futur.

Monsieur Maurice GUILLON de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, a tourné les séquences cinématographiques et assuré le montage du film présenté au cours de cette thèse. Ce n'est qu'une partie d'une collaboration de cinq années pour laquelle je tiens à le remercier vivement.

Mesdames C. DECHY et C. GEIRNAERT ainsi que *Mademoiselle M. TOMCZAK* ont assuré la dactylographie et les corrections de ce manuscrit avec beaucoup de soin et je tiens ici à leur exprimer tous mes remerciements.

Je remercie également *Monsieur DEWAILLY* pour le soin qu'il a apporté pour réaliser les diapositives illustrant mon exposé.

J'adresse également une pensée à tous ceux qui dans l'Unité I.N.S.E.R.M. 146 m'ont apporté leur aide et leur amitié à des titres divers.

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION	10
PREMIÈRE PARTIE : HISTORIQUE CRITIQUE	13
CHAPITRE I : LA NUTRITION CHEZ <i>COLPIDIUM</i> ET CHEZ LES PROTOZOAIRES CILIES	14
A - NUTRITION AXENIQUE DE <i>COLPIDIUM</i>	16
I - Culture sur milieux complexes	16
II - Les milieux synthétiques et les facteurs de croissance	18
III - Conclusions	24
B - NUTRITION HOLOZOIQUE CHEZ LES PROTOZOAIRES CILIES ...	26
I - Caractéristiques de la nutrition holozoïque	
1) Rôle des particules en suspension dans le milieu	26
2) Importance des bactéries dans la nutrition holozoïque	28
II - Etude qualitative de la nutrition bactérienne ...	28
1) Résultats généraux	28
2) Ingestion et digestion des bactéries	36
3) Refus d'ingestion ou rejet. Sélection des bactéries	38
4) Toxicité	40

	Page
III - Etude quantitative de la nutrition bactérienne	45
1) Vitesse de filtration du milieu	46
2) Vitesse d'ingestion des bactéries	47
3) Rendement de la croissance	48
4) Le taux de croissance	48
 CHAPITRE II : UTILISATION DES PROTOZOAIRES EN ECOTOXICOLOGIE	 50
I - Critères morphologiques	51
II - Critères ethologiques	52
III - Critères physiologiques	53
IV - Discussion et conclusions	58
 DEUXIÈME PARTIE : NUTRITION DE COLPIDIUM CAMPYLUM	 59
CHAPITRE I : CROISSANCE AXENIQUE DE <i>COLPIDIUM CAMPYLUM</i>	60
A - PARTIE EXPERIMENTALE	62
I - Influence des éléments nutritifs	62
1) Milieux standards	62
2) Action des protéides	64
3) Action des composés lipidiques	66
4) Action de facteurs divers	76
5) Définition de quelques milieux de culture	77

	Page
II - Effets de la température sur la croissance de <i>C. campylum</i>	80
1) Détermination de la température optimale de croissance et de la température maximale tolérée	80
2) Action de chocs thermiques sur la multiplica- tion de <i>C. campylum</i>	82
 B - DISCUSSION	 86
I - Croissance en milieu complexe	86
II - Croissance en milieu semi-synthétique	88
III - Conclusions	93
 CHAPITRE II : NUTRITION HOLOZOIQUE DE <i>COLPIDIUM CAMPYLUM</i>	 95
 A - ETUDE QUANTITATIVE DE LA NUTRITION HOLOZOIQUE	 96
I - Influence de la concentration bactérienne sur la croissance de <i>C. campylum</i>	96
1) Principe expérimental	97
2) Résultats	97
II - Activité phagotrophique de <i>Colpidium campylum</i> et de <i>Tetrahymena</i> en présence de particules non nutritives	102
1) Principe expérimental	104
2) Activité phagotrophique sur des suspensions monodimensionnelles	104

	Page
3) Activité phagotrophique sur des mélanges multi-dimensionnels	106
4) Influence du nombre de particules sur l'activité phagotrophique	109
 B - ETUDE QUALITATIVE DE LA NUTRITION BACTERIENNE CHEZ <i>COLPIDIUM CAMPYLUM</i>	111
I - Protocole expérimental	111
II - Résultats généraux	113
III - Phénomènes de toxicité observés	117
1) Toxicité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
2) Toxicité de <i>Chromobacterium violaceum</i>	121
IV - Croissance de <i>Colpidium campylum</i> sur des mélanges de bactéries	123
 C - DISCUSSION GENERALE	126
I - Nutrition quantitative de <i>C. campylum</i>	126
II - Nutrition qualitative de <i>C. campylum</i>	132
 TROISIÈME PARTIE : UTILISATION DE <i>COLPIDIUM CAMPYLUM</i> POUR LA MESURE DE LA TOXICITÉ	139
 CHAPITRE I : PARTIE EXPERIMENTALE	139
A - PENETRATION, ACCUMULATION ET TOXICITE DES PRODUITS POUR LES PROTOZOAIRES	141

	Page
I - Les produits solubles	141
1) La diffusion	142
2) Le transport	142
3) L'endocytose	143
II - Les produits insolubles	143
III - Le problème de la quantification de l'accumulation .	144
 B - MESURE DE TOXICITE PAR L'INHIBITION DE CROISSANCE	 147
I - Méthode	147
1) Principe général	147
2) Technologie et interprétation du test	149
II - Application aux polluants minéraux et organiques hydrosolubles	162
III - Application à l'étude des polychlorobiphényles	167
1) Méthodes	169
2) Résultats	170
3) Relation entre solubilité, structure et toxicité des P.C.B.	177
IV - Application à l'étude des pesticides	183
1) Toxicité aiguë	183
2) Endocytose des pesticides à l'état précipité	188
3) Identification intracellulaire des pesticides ...	193

	Page
V - Application à l'étude de mycotoxines	201
1) Toxicité de mycotoxines pures et de dérivés vis-à-vis de <i>C. campyllum</i>	201
2) Toxicité d'acides gras vis-à-vis de <i>C.</i> <i>campyllum</i>	207
 C - DEFINITION D'UN TEST DE VIABILITE MINIATURISE UTILISANT <i>C. CAMPYLUM</i>	208
I - Matériel et méthodes	208
II - Etude théorique et interprétation du test	211
1) Principe du test	211
2) Calcul du nombre réel de Ciliés ayant formé un clône	211
3) Calcul de la Dose de Viabilité 50 % (DV ₅₀)	212
III - Influence de la méthode de distribution et du matériel utilisé	212
IV - Application à la mesure de toxicité	221
 CHAPITRE II : DISCUSSION GENERALE	224
I - Les méthodes de test	225
II - Les applications	227
 CONCLUSION GÉNÉRALE	231

ANNEXES TECHNIQUES

ANNEXE I : MILIEUX DE CULTURE ET D'ETUDE DE *COLPIDIUM*

<i>CAMPYLUM</i>	239
1) Isolement de la souche	240
2) Milieux pour l'étude de la culture axénique de <i>C. campylum</i>	240
3) Milieu pour l'étude de la nutrition bactérienne quali- tative et pour les tests de toxicité	245

ANNEXE II : MILIEUX DE CULTURE POUR LES BACTERIES 247

1) Milieu standard	248
2) Milieu pour <i>Chromobacterium violaceum</i>	248
3) Milieu pour la production de pigment chez <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	248
4) Préparation de la pyocyanine	249
5) Liste des souches bactériennes utilisées	250

ANNEXE III : TECHNIQUES DE DENOMBREMENT ET D'ANALYSE DE

POPULATION	253
1) Préparation et numération des cellules bactériennes ...	254
2) Dénombrement des Protozoaires	254
3) Analyse dimensionnelle des populations de <i>Colpidium</i> ...	255

ANNEXE IV : TABLEAUX DONNANT LA CONCENTRATION REELLE EN <i>COLPIDIUM</i> PAR CUPULES EN FONCTION DU NOMBRE DE CUPULES POSITIVES DANS LE TEST VIABILITE ...	258
--	-----

INTRODUCTION

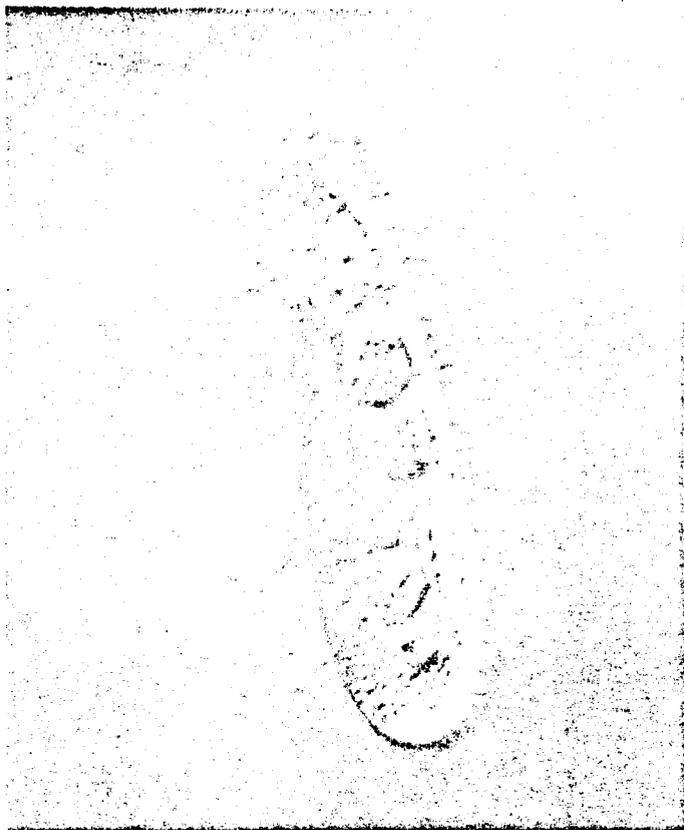


FIG. 1 *Colpidium campylum* :
contrasté interférentiel (x 1400)



FIG. 2 *Colpidium campylum* : imprégnation
par le protargol (x 2000). Le corti-
cotype est de 21-22 cinéties.
Document obtenu en collaboration av-
le Dr GROSLIERE (Clermont Ferrand)

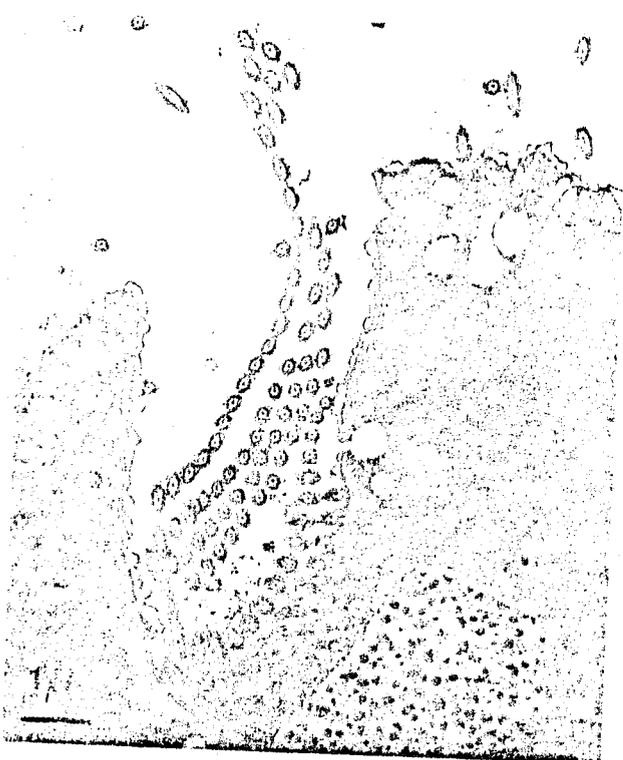


FIG. 3 *Colpidium campylum* : vue en microscopie électronique
la M1 est constituée d'une seule rangée de cinetosomes
Document obtenu en collaboration avec le Dr PORCHET (Lille)

SUS
LILLE

Si le Cilié holotriche *Colpidium* a été décrit par STOKES dès 1885 (208), il a fallu attendre 50 ans après cette découverte pour obtenir les premières cultures stériles de cet organisme. Cette difficulté de culture a détourné de nombreux chercheurs vers *Tetrahymena*, beaucoup moins exigeant, et ce Cilié est très rapidement devenu un modèle comme l'est *Escherichia coli* chez les bactéries.

La systématique même du genre *Colpidium*, ébauchée par STOKES et modifiée par BRESSLAU (25) est restée confuse jusqu'aux travaux de CORLISS (47, 48) qui a séparé nettement les genres *Tetrahymena*, *Colpidium* et *Glaucoma* tout en les regroupant dans la famille des *Tetrahymaenidae*. C'est le travail de Mc COY en 1974 (49) qui permettra de constater qu'il existe trois espèces de *Colpidium* dont l'une, *C. campylum* comprend probablement des espèces ou sous-espèces cryptiques.

Les travaux concernant la biologie de *C. campylum* sont demeurés très longtemps en nombre très limité. CHATTON et CHATTON (36, 37, 38) ont réalisé les premières observations sur les rapports entre *Colpidium* et les bactéries. Dix ans plus tard, vers 1935, des travaux importants ont été réalisés sur la nutrition bactérienne, la culture axénique et le métabolisme de *Colpidium campylum*, mais un certain nombre de publications de cette époque sont entachées de suspicion du fait de confusions probables avec *Tetrahymena*. Après 1950, ce dernier Cilié draine toutes les recherches et les études sur *Colpidium* deviennent très restreintes.

Au début de notre travail, nous avons découvert que *Colpidium campylum* (figures 1, 2, 3) était le Cilié le plus abondant dans un étang d'oxydation expérimental. Vu la documentation très réduite qui existait alors sur ce sujet, il nous a semblé intéressant de faire une étude approfondie sur sa nutrition. Nos buts étaient alors multiples : nous voulions obtenir ce Cilié en culture axénique afin de comparer ses besoins nutritifs à ceux de *Tetrahymena* dont il est très proche taxonomiquement ; ces travaux pouvaient nous permettre, en outre, d'aborder l'étude de la biochimie de cet organisme. Nous voulions étudier sa nutrition holozoïque à la fois sur le plan qualitatif et quantitatif, ceci afin de pouvoir estimer son rôle dans le milieu dont nous l'avions isolé.

Nous voulions enfin examiner sa sensibilité aux polluants de l'environnement afin d'approfondir ce domaine de connaissance alors peu exploré chez les Protozoaires. Pour cela, il nous fallait mettre au point des méthodes de mesure de toxicité, puis les éprouver sur un large éventail de substances.

Ces trois objectifs ont donc fait l'objet des travaux que nous nous proposons de rapporter ici.

PREMIERE PARTIE

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

LA NUTRITION CHEZ *COLPIDIUM* ET CHEZ
LES PROTOZOAIRES CILIES

On peut distinguer, chez les Protozoaires, trois types de nutrition :

- La nutrition holophytique ou autotrophique, caractéristique des Phytomastigia et, chez les Ciliés, de quelques représentants comme *Paramecium bursaria*. Il y a photosynthèse grâce à des chloroplastes (Phytomastigia) ou des algues symbiotiques (Zoochlorelles chez *Paramecium bursaria*, Zooxanthelle chez *Paraeuplotes tortugensis*). Chez certaines espèces, un complément alimentaire est indispensable.

- La nutrition saprozoïque, caractéristique des formes parasites ou dépourvues d'organe buccal, n'est pas leur apanage strict. *Tetrahymena* est probablement en partie saprozoïque dans la nature. Il l'est presque totalement en culture axénique.

- La nutrition holozoïque est le mode d'alimentation typique des Protozoaires munis d'organites d'ingestion. C'est la capture des aliments présents dans le milieu sous une forme particulière.

Beaucoup de Protozoaires utilisent simultanément divers types de nutrition ; ils sont nommés pour cette raison mixophytiques.

Nous examinerons successivement les données bibliographiques relatives à la nutrition axénique de *Colpidium campylum*, puis celles portant sur la nutrition holozoïque chez les Ciliés, qui est d'une portée très générale.

A - NUTRITION AXENIQUE DE COLPIDIUM CAMPYLUM

Parmi tous les Protozoaires Ciliés, *Colpidium* a été très tôt l'objet de tentatives de mise en culture axénique. Mais si des milieux très efficaces ont été mis au point pour la culture de *Tetrahymena* et de *Paramecium*, de nombreuses difficultés ont été rencontrées pour la culture de *Colpidium*, et tous les aspects de ses exigences nutritives n'ont pas encore été élucidés.

I - CULTURE SUR MILIEUX COMPLEXES

ELLIOT (67) constate que l'axénisation de *Colpidium striatum* doit se faire progressivement pour accoutumer le cilié à l'absence de bactéries. *Colpidium* peut se cultiver sur différents bouillons peptonés, le bouillon au dextrose de Difco étant excellent, il liquéfie la gélatine et coagule le lait tournesolé ; la tryptone Difco peut être couramment utilisée. Le pH optimal de culture est situé entre 5,5 et 6,4. Testant la valeur nutritive de différentes peptones Difco (70), ELLIOT établit la hiérarchie suivante : tryptone > protéose peptone > yeast extract > néopeptone > extrait de foie > bacto veal > bacto peptone > bacto-hémoglobine > bacto gélatine. Il existe un rapport entre acides aminés totaux et valeur nutritive. L'addition d'autolysat de levure est nécessaire pour obtenir une bonne croissance et l'optimum de concentration se situe

entre 1 et 3 %. Il existe des enzymes extra-cellulaires qui attaquent la caséine (67) et la gélatine (140).

HALL et ELLIOT (94) ont étudié la croissance de *Colpidium* sur des protéines incomplètes (zéine, gliadine, gélatine). La croissance y est très faible. L'addition d'extrait de levure est stimulante. La lysine, l'asparagine et la proline ne suffisent pas à compléter ces protéines, mais activent la croissance quand elles sont ajoutées à un mélange de protéine et d'extrait de levure.

En 1937, la revue technique sur les cultures d'invertébrés de GALSTOFF et coll. (78) mentionne une seule technique de culture axénique de *Colpidium* (un autolysat de levure à 9 % dans de l'eau de rivière).

En 1938, HALL et LOEFER (95) obtiennent après 15 jours de culture sur milieu à la tryptone, une population maximale de 15.000 cellules par ml. Ils mettent en évidence la libération dans le milieu de culture de substances stimulant la croissance des Ciliés. Ce dernier résultat sera confirmé ensuite par de nombreux travaux (96, 120, 134, 135, 206, 207).

Poursuivant l'étude des sources d'azote utiles à la croissance de *Colpidium campylum*, HALL (91, 93) met en relation l'action de l'extrait de levure avec sa richesse en vitamines du groupe B. ELLIOT (71) confirme ce résultat. PETERSON (157), travaillant sur une souche de *Colpidium*

différente de celle utilisée par HALL et KIDDER, montre l'absolue nécessité de l'extrait de levure pour compléter les peptones. KIDDER (121) signale le premier que *Glaucoma* et *Colpidium* sont tributaires de la présence de nutriments à l'état particulaire alors que *Tetrahymena* est capable d'utiliser les nutriments en solution. Pour PETERSON (157), quand les besoins en protides sont couverts, il existe un rapport inverse entre l'état de dégradation des protéines et la valeur nutritive de la peptone. Pour KIDDER, DEWEY et FULLER (124), *Colpidium* et *Glaucoma* sont incapables de se multiplier dans le milieu minimum utilisé pour cultiver *Tetrahymena*. Des corps azotés de fort poids moléculaire sont indispensables, particulièrement des protéines à l'état finement dispersé.

Le milieu de culture pour *Colpidium campylum* décrit en 1958 (4) comprend de la caséine précipitée et de l'autolysat de levure comme sources d'azote. Mc COY (49) et KEENAN et coll (119) utilisent comme source principale de nutriments des peptones et du lait en poudre.

II - LES MILIEUX SYNTHETIQUES ET LES FACTEURS DE CROISSANCE

Si plusieurs milieux synthétiques ont déjà été décrits pour *Colpidium* par KLINE (127), LILLY et STILWELL (134, 135, 206, 207) il faut reconnaître que les temps de génération obtenus avec ces milieux (24 à 48 h) sont restés très éloignés des vitesses de croissance observées sur les

milieux peptonés (10 à 20 heures). Des inocula très importants sont nécessaires et les populations maximales obtenues restent inférieures, le plus souvent à 10.000 cellules/ml.

1) BESOINS EN AMINOACIDES

KLINE (127) a étudié en détail les besoins en aminoacides de *C. striatum*. Les seuls acides aminés non indispensables sont l'histidine, la leucine, la lysine et la thréonine. STILWELL (206, 207), LILLY et STILWELL (134, 135) incorporent dans leur milieu l'histidine, la leucine, la lysine et la thréonine, mais n'ajoutent ni la cystéine, ni l'hydroxyproline. Leur milieu est directement dérivé de celui utilisé pour la culture de *Paramecium* (226).

2) BESOINS EN PRECURSEURS D'ACIDES NUCLEIQUES

Si KLINE (127) est parvenu à cultiver *C. striatum* en l'absence de tout précurseur d'acides nucléiques, ce cas reste totalement isolé. LILLY et STILWELL ajoutent dans le milieu des purines et des pyrimidines. KIDDER (123) a affirmé l'exigence de tous les Tétrahyméniés pour les purines.

TABLEAU 1. Influence des glucides sur la croissance de *Colpidium*.

	<i>Colpidium striatum</i>		<i>Colpidium campylum</i>	
	Fermentation	Rôle	Fermentation	Rôle
Inuline	/	/	-	/
Amidon	+	s	-	s
Dextrine	+	s	+	s
Maltose	+	s	+	s
Lactose	-	n	-	s
Cellobiose	/	/	-	/
Melezitose	-	n	+	s
Sucrose	-	/	- (+)	/
Dextrose	+	s	+	s
Levulose	+	s	+	s
Mannose	+	s	+	s
Galactose	-	n	-	n
Mannite	-	/	-	/
Rhamnose	-	n	-	s
Arabinose	-	i	-	n
Xylose	-	i	-	n
Salicine	-	n	-	s



Signification des signes : +, fermenté ; -, non fermenté ; s, stimulateur ; n, sans effet ; i, inhibiteur ; / non testé.

3) BESOINS EN GLUCIDES

Les glucides ne sont pas indispensables à la croissance de *Colpidium* mais beaucoup d'auteurs ont montré leur action stimulante. *Colpidium* apparaît apte à utiliser des hydrates de carbone très divers, même très complexes.

COLAS DELCOURT et LWOFF (41), ELLIOT (69) et KIDDER (121) ont réalisé à la fois la synthèse bibliographique et l'étude de l'action des sucres sur la croissance de *Colpidium*. Les résultats sont regroupés dans le tableau 1. (page 20)

On se rend compte que beaucoup de glucides stimulent la croissance de *Colpidium*, même s'ils ne sont pas fermentés ; amidon, dextrines et hexoses (galactose excepté) sont très bien utilisés. *C. campylum* est stimulé par un certain nombre de sucres qui sont inactifs ou même inhibiteurs pour *C. striatum*.

4) BESOINS EN LIPIDES

LILLY et STILWELL (134, 135, 206, 207) ont incorporé dans leur milieu synthétique les acides oléique et linoléique sans justifier leur présence en temps que facteurs indispensables.

TABLEAU 2. Influence de diverses vitamines sur la croissance de *Colpidium*.

Vitamines	Influence et référence
Thiamine	Indispensable (71)
Riboflavine	Indispensable (71, 92)
Pyridoxine	Effet très faible (71)
Acide pantothénique	Très important (68, 134)
Vitamine A	Non justifiée (127)
Acide nicotinique	Non justifiée (127)
Acide ascorbique	Non justifiée (127)
Vitostérol (vit. D ₃)	Non justifiée (127)



SEAMAN (186) a observé que *C. campylum*, cultivé sur un milieu totalement dépourvu en lipides, est capable de les synthétiser. HOLZ et coll. (112) ont montré que les lipides et les phospholipides sont nécessaires ou activateurs pour la croissance de certaines espèces de Ciliés. Ces résultats ont été confirmé récemment par RASMUSSEN et nous-même (168). Selon DEWEY et KIDDER (63) les acides gras auraient une influence très importante sur l'utilisation de l'acide folique par *Tetrahymena*.

5) BESOINS EN VITAMINES

Les résultats sont regroupés dans le tableau 2. La thiamine, la riboflavine et l'acide pantothénique sont réellement indispensables. Les autres vitamines ont été utilisées par analogie avec des milieux synthétiques utilisés pour *Tetrahymena* et *Paramecium*.

6) SELS MINERAUX

Aucune étude systématique n'a été réalisée sur *Colpidium*. HALL (88) a montré que le manganèse n'avait aucune influence.

7) ACTION DE SUBSTANCES DIVERSES (Tableau 3, P . 25)

Un certain nombre de substances très diverses ont été testées sur *Colpidium*. Le tableau 3 donne les principaux résultats obtenus.

De très nombreux acides organiques sont inhibiteurs vis-à-vis de *Colpidium*.

III - CONCLUSION

Les études sur la culture axénique de *Colpidium campylum*, même en milieu complexe, n'ont pas abouti à la définition d'un milieu ne contenant pas de particules et permettant l'obtention de densités cellulaires très élevées comme on a pu le réaliser avec *Tetrahymena*. Les besoins nutritifs de *Colpidium* ne sont pas connus encore avec suffisamment de précision pour qu'un milieu synthétique minimum satisfaisant ait pu être mis au point. Les rendements et la vitesse de croissance obtenus sur les milieux connus ne permettent pas de les considérer comme des milieux synthétiques satisfaisants.

Notre travail nous a permis d'améliorer notablement les milieux de culture complexes utilisables pour *C. campylum* et de dégager quelques aspects de la croissance de ce Protozoaire sur des milieux semi-synthétiques

TABLEAU 3. Action de substances diverses sur la
la croissance de *Colpidium*.

Produit	Action	Référence
Acide pimélique	s	(90)
Cholestérol	n	(212)
Ethanol	n	(70)
Glycérol	n	(70)
Acide pyruvique	i	(70)
Acide glycolique	i	(70)
Acide tartrique	i	(70)
Acétate	i	(70)
Propionate	i	(70)
Butyrate	i	(70)
Isobutyrate	i	(70)
Valérate	i	(70)
Caproate	i	(70)
Citrate	i	(70)

s, stimulateur ; n, sans effet ; i, inhibiteur



B - NUTRITION HOLOZOIQUE CHEZ LES PROTOZOAIREs CILIES

I - CARACTERISTIQUES DE LA NUTRITION HOLOZOIQUE

1) ROLE DES PARTICULES EN SUSPENSION DANS LE MILIEU

Chez un certain nombre de Protozoaires, le rôle capital joué lors de la nutrition par les éléments précipités présents dans le milieu a pu être mis en évidence. KIDDER (121) travaillant sur *Glaucoma scintillans* et *Colpidium colpoda* remarque que les cultures échouent dans un milieu dépourvu de particules. La présence de fragments de levures est indispensable à la croissance. Ultérieurement, KIDDER, DEWEY et FULLER (124) ont repris ces expériences et ont montré que *Glaucoma scintillans* pouvait être adapté à la culture axénique en milieu aparticulaire. Une culture témoin se développe en 96 heures alors que 10 jours sont nécessaires pour obtenir une culture abondante dans un milieu dépourvu d'éléments figurés ; dans les cultures ultérieures, la croissance est normale. Pour *Colpidium*, la présence de grosses molécules est indispensable pour amener la multiplication : la caséine finement précipitée donne d'excellents résultats alors que l'hydrolysate est inactif. RASMUSSEN et KLUDT (169) ont apporté des données complémentaires sur le rôle des particules dans l'alimentation de *Tetrahymena pyriformis*. Ce Cilié, cultivé normalement sur un milieu à la protéose peptone stérilisé par autoclavage, ne peut pas être maintenu en cultures indéfinies

sur un milieu stérilisé par filtration sur membrane de porosité 0,22 μm . Le temps de division (5 h sur un milieu témoin) passe à 40 heures sur milieu filtré. L'addition de substances insolubles à l'état particulaire (talc, quartz, argile, CO_3Ca) ou de sels produisant des particules par hydrolyse saline tels $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, FeCl_3 , FeSO_4 , accélère de façon significative la vitesse de division. Les produits hydrosolubles (aminoacides, purines, glucose) n'ont pas d'influence marquante. Le même phénomène a été observé chez *Acanthamoeba castellanii* (110). RICKETTS (175, 176, 177, 178, 179) a étudié en détail l'activité phagotrophique de *Tetrahymena pyriformis* : dans un milieu non nutritif, seules les particules ayant une valeur alimentaire induisent la formation des vacuoles digestives. Dans un milieu contenant des substances nutritives dissoutes, les particules inertes induisent l'endocytose. Ces résultats, observés également par d'autres auteurs (62, 111, 187), seraient la conséquence de l'adsorption de molécules nutritives sur la surface des éléments figurés réalisant un enrobage qui modifie la nature chimique de leur surface. DEMBOWSKI (62) a montré que de la porcelaine, du verre, du BaSO_4 , du CaCO_3 , habituellement refusés par *Paramecium caudatum*, sont absorbés après enrobage par du jaune d'oeuf ou de l'amidon. Si, dans un milieu non nutritif, la nécessité de particules possédant une valeur alimentaire apparaît évidente, il n'en est pas de même dans les cultures axéniques et RASMUSSEN (166, 167, 171, 172, 173) a montré que l'endocytose n'était pas la voie de pénétration principale de tous les nutriments, comme cela a été considéré pendant fort longtemps. Ce problème sera discuté en détail dans le chapitre consacré à la nutrition des ciliés en culture axénique.

2) IMPORTANCE DES BACTERIES DANS LA NUTRITION HOLOZOIQUE

Dans les milieux naturels, la nutrition holozoïque joue certainement un rôle fondamental chez les Protozoaires munis d'un organe d'ingestion. Le substrat alimentaire est constitué par des microorganismes, des algues et des diatomées, des débris divers et même, parfois, par d'autres Protozoaires. Les bactéries constituent l'aliment figuré principal des Protozoaires dont la capacité d'ingestion est limitée aux particules de petite taille. Dans certains cas, il n'est pas possible de cultiver ces organismes en absence de bactéries. Cela a été observé chez *Entodinium* (21, 22) et chez certains foraminifères (140). Dans de nombreux cas (225) l'addition de bactéries, vivantes ou tuées, dans un milieu de culture, constitue un activateur puissant pour la multiplication. Les microorganismes constituent pour les Protozoaires un apport de facteurs de croissance importants, sinon indispensables.

II - ETUDE QUALITATIVE DE LA NUTRITION BACTERIENNE (Tableaux 4,5,6 p. 29 à 33)

1) RESULTATS GENERAUX

De très nombreux travaux ont été effectués afin de déterminer les espèces microbiennes favorables à la croissance des Ciliés. Nous avons représenté dans les tableaux 4, 5, 6, les résultats les plus importants

TABLEAU 4. Croissance de Protozoaires aux dépens d'*Enterobacteriaceae*.
Première partie : *Colpoda* et *Tetrahymenidae*

	<i>Colpoda</i> sp.	<i>Colpidium</i> <i>colpoda</i>	<i>Colpidium</i> <i>campylum</i>	<i>Glaucoma</i> <i>scintillans</i>	<i>Glaucoma</i> <i>ficaria</i>
<i>Escherichia coli</i>	+ 43	+ 27, 29, 36, 106 36	+	+ 36, 38 38	+ 115
<i>Shigella dysenteriae</i>		+ 29			+ 115
<i>Shigella</i> sp.		+ 38, 106		+ 38	
<i>Salmonella typhi</i>		+ 27, 29, 38		+ 36, 38	+ 115
<i>Salmonella paratyphi</i> A		+ 27, 29 38		+ 38	+ 115
<i>Salmonella paratyphi</i> B		+ 38		+ 38	+ 115
<i>Salmonella enteritidis</i>					+ 115
<i>Klebsiella</i> sp.					+ 115
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+ 43, 216	+ 27, 30, 106	+ 215	+ 215	+ 115
<i>Enterobacter cloacae</i>	+ 126	+ 27			
<i>Serratia marcescens</i>	+ 43, 126, 216 126	+ 27, 106, 215 38	+ 215	+ 38, 215	
<i>Proteus</i> sp.	+ 216	+ 27, 106 215	+ 215	+ 38, 215	+ 115

+ bactérie favorable à la croissance
- bactérie n'autorisant pas la croissance
T bactérie toxique



TABLEAU 4. Croissance de Protozoaires aux dépens d'*Enterobacteriaceae*.

Deuxième partie : *Paramecium*

	<i>Paramecium caudatum</i>	<i>Paramecium aurelia</i>	<i>Paramecium multimicro-nucleatum</i>
<i>Escherichia coli</i>	- 54, 115, 137 T 54	+ 137 - 159 T 60	- 132, 133
<i>Klebsiella sp.</i>	+ 54		
<i>Citrobacter sp.</i>	- 215		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+ 215, 228	+ 228	+ 132, 133
<i>Enterobacter cloacae</i>	- 54 T 54	+ 228	+ 132, 133
<i>Serratia marcescens</i>	+ 215	+ 158, 228 - 60	+ 132, 133
<i>Salmonella enteritidis</i>	- 161	T 161	
<i>Proteus sp.</i>	- 215 T 54	- 159	+ 132, 133



TABLEAU 5. Croissance de Ciliés sur des bactéries Gram -
autres que les *Enterobacteriaceae*.

Première partie : *Colpoda* et *Tetrahymenidae*

	<i>Colpoda</i> sp.	<i>Colpidium</i> <i>colpoda</i>	<i>Colpidium</i> <i>campylum</i>	<i>Glaucoma</i> <i>scintillans</i>	<i>Glaucoma</i> <i>ficaria</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	T 125	+ 27	+ 153	T 38	+ 115
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+ 125, 216 T 125	+ 27, 106 - 215, 216	+ 216	+ 36, 37, T 38	+ 115
<i>Pseudomonas</i> sp.	+ 54				
<i>Flavobacterium</i> sp.	- 125	+ 27			
<i>Chromobacterium</i> sp.		T 27			+ 115
<i>Aeromonas hydrophila</i>	- 216	+ 216	+ 216	+ 216	
<i>Vibrio cholerae</i>		- 27		+ 38	
<i>Vibrio</i> sp.	+ 125		+ 153		
<i>Azotobacter</i> sp.		+ 56			



TABLEAU 5. Croissance de ciliés sur des bactéries Gram -
autres que les *Enterobacteriaceae*.

Deuxième partie : *Paramecium*

	<i>Paramecium caudatum</i>	<i>Paramecium aurelia</i>	<i>Paramecium multimicro-nucleatum</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+ 161 T 54, 161	+ 161 T 161	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+ 54, 137, 153, 215 - 137	+ 153	+ 133 - 133
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	- 54		
<i>Pseudomonas sp.</i>	- 54		+ 80, 132, 133
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+ 54		+ 132, 133
<i>Flavobacterium sp.</i>	+ 60	+ 228	
<i>Chromobacterium sp.</i>	T 54		
<i>Vibrio sp.</i>	+ 54		
<i>Spirillum</i>			- 132, 133
<i>Azotobacter</i>	- 54		



TABLEAU 6. Croissance des Ciliés sur des bactéries Gram positif
Première partie : *Colpoda* et *Tetrahymenidae*

	<i>Colpoda</i> sp.	<i>Colpidium</i> <i>colpoda</i>	<i>Colpidium</i> <i>campylum</i>	<i>Glaucoma</i> <i>scintillans</i>	<i>Glaucoma</i> <i>ficaria</i>
<i>Micrococcus aureus</i>				T 38	
<i>Micrococcus</i> sp.	+ 215 - 43, 215	+ 27 - 27, 216	+ 216	+ 216 - 38 T 38	
<i>Sarcina lutea</i>	+ 216	- 27	+ 153	+ 38	- 115
<i>Sarcina flava</i>		+ 27			
<i>Sarcina aurantica</i>					+ 115
<i>Staphylococcus aureus</i>	+ 126	+ 27	+ 153		+ 115
<i>Staphylococcus</i> sp.		+ 27 - 27		+ 38	+ 115
<i>Corynebacterium</i> sp.			- 153		
<i>Bacillus subtilis</i>	+ 215	+ 216 - 27	+ 153, 216	+ 216 T 38	+ 115
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i>	+ 106 T 126				
<i>Bacillus megatherium</i>		+ 27			
<i>Bacillus mycoïdes</i>		- 27		T 38	
<i>Bacillus cereus</i>	- 215	- 216	- 216	+ 216	
<i>Bacillus mesentericus</i>		- 27		- 38	
<i>Mycobacterium phlei</i>					- 115
<i>Mycobacterium</i> sp.					- 115
<i>Arthrobacter</i> sp.	+ 43 - 45				

TABLEAU 6. Croissance de Ciliés aux dépens de bactéries Gram positif
Deuxième partie : *Paramecium*

	<i>Paramecium caudatum</i>	<i>Paramecium aurelia</i>	<i>Paramecium multimicro-nucleatum</i>
<i>Micrococcus sp.</i>	+ 215 - 215		- 132, 133
<i>Staphylococcus sp.</i>			- 132, 133
<i>Streptococcus faecalis</i>	+ 54		
<i>Corynebacterium sp.</i>	+ 161	+ 161	- 132, 133
<i>Bacillus subtilis</i>	+ 54, 137, 215, 228	+ 228	+ 132 - 132, 133
<i>Bacillus subtilis</i> <i>var. niger</i>	+ 54	+ 60	T 132, 133
<i>Bacillus megatherium</i>		+ 228	
<i>Bacillus mycoïdes</i>			- 132, 133
<i>Bacillus cereus</i>	+ 54, 215 - 54	+ 60 - 60	+ 132, 133
<i>Bacillus mesentericus</i>			- 132, 133
<i>Mycobacterium phlei</i>			- 132, 133
<i>Mycobacterium sp.</i>			- 132, 133

BUS
LILLE

trouvés dans la littérature. Nous avons divisé les bactéries en trois catégories, fondées sur la systématique et sur la structure pariétale, à chacune desquelles répond un tableau :

Tableau 4 : *Enterobacteriaceae* (bactéries Gram -)

Tableau 5 : Autres bactéries Gram négatif

Tableau 6 : Bactéries Gram positif

Trois types de réponses ont été distinguées : croissance, absence de multiplication mais survie, mort rapide, en accord avec les observations de CHATTON et CHATTON (38). Nous avons retenu parmi les Ciliés Hyménostomes les Tétrahymenidés auxquels appartient *Colpidium campylum*, 3 espèces de *Paramecium* (*P. caudatum* et *P. aurelia* et *P. multimicronucleatum*). Nous avons donné par comparaison les résultats obtenus chez *Colpoda* sp.

Si la nutrition de *Colpidium colpoda* a été étudiée avec quelques détails (27, 29, 31, 36, 38, 106, 216, 217), celle de *Colpidium campylum* n'a donné lieu qu'à des études relativement restreintes (153, 216, 217) et souvent très anciennes. Les travaux ont été en général plus complets sur les Paramécies.

Les *Enterobacteriaceae* constituent, en général, une bonne nourriture pour les Ciliés. Quelques cas de toxicité ont été mis en évidence en particulier avec *Escherichia coli* (38, 54, 60, 181) et *Serratia marcescens* (38, 60). Chez les autres bactéries Gram négatif, les résultats sont très

variables suivant les souches. *Chromobacterium* est toxique pour toutes les souches testées (27, 54, 84) ; seul JOHNSON (115) a pu cultiver *Glaucoma ficaria* sur cette bactérie. *Pseudomonas aeruginosa* a été trouvé toxique à plusieurs reprises (38, 54, 125, 161) pour de très nombreux Protozoaires alors que *Pseudomonas fluorescens* donne des résultats très variables : souvent impropre à la croissance (54, 137, 216, 217) ou toxique (38, 125) il constitue dans la plupart des cas un excellent substrat (27, 54, 106, 115, 125, 132, 133, 137, 153, 216, 216). Les bactéries Gram positif (tableau 3) ont en général une moins bonne valeur nutritive que les bactéries Gram négatif , en particulier pour *Colpidium colpoda* (27, 216, 217). *Bacillus subtilis* v. *niger* serait toxique vis-à-vis de *Colpoda* sp. (125) et *Paramecium multimicronucleatum* (132, 133), mais ces résultats n'ont pas été confirmés par WICHTERMAN (228) et KIDDER (125).

L'analyse des résultats précédents nous a permis de constater l'existence de plusieurs phénomènes liés à la nutrition des Protozoaires et signalés par DE PUYTORAC (61), à savoir l'ingestion et la digestion des bactéries, le rejet et la sélection, la toxicité des microorganismes vis-à-vis des Protozoaires. Nous examinerons rapidement ces phénomènes.

2) INGESTION ET DIGESTION DES BACTERIES

La vitesse de croissance d'un protozoaire varie avec l'espèce de microorganisme apportée comme nutriment (29, 216). Certaines espèces

peuvent s'adapter à un substrat au départ peu favorable à leur croissance. Cela a pu être réalisé avec des amibes (35), mais n'a pas été possible avec *Tetrahymena* (102).

Les processus de digestion débutent très rapidement à l'intérieur des vacuoles digestives. COLEMAN (42) signale que 88 % des bactéries absorbées par *Entodinium caudatum* ne sont plus viables trente minutes après leur ingestion. De nombreuses enzymes digestives ont été isolées chez les Protozoaires (128) mais leur activité sur les bactéries a été, dans l'ensemble, peu étudiée. UPADHYAY (221, 222), BERGER et MANNHEIM (15), ont exploré l'action des extraits enzymatiques bruts ou purifiés d'amibes sur les bactéries. Ils ont obtenu un spectre d'activité voisin de celui du lysosyme. Ce résultat est différent de celui observé sur des amibes vivantes qui utilisent beaucoup plus facilement les bactéries Gram négatif (221). ROSENTHAL, REED et WEISMAN (150) ont étudié l'action lytique des extraits d'*Acanthamoeba castellanii* sur des parois purifiées de bactéries, en particulier de *Micrococcus lysodeikticus*. Ils notent l'apparition, dans le digestat, de N-acetyl-glucosamine, d'acide N-acétyl muramique, d'acides aminés libres comme la lysine, le glycolle, l'alanine et l'acide glutamique. Ceci implique l'intervention de plusieurs enzymes dans l'assimilation. L'extrait est totalement inactif sur des parois purifiées d'*Escherichia coli*. RICKETTS (175) et ESTEVE (72) ont bien mis en évidence les rapports existant entre la phosphatase acide et la digestion intracellulaire chez *Tetrahymena* et *Paramecium* : l'augmentation de l'activité enzymatique dépend de la nature du contenu des vacuoles digestives. Cette enzyme se fixe à

la surface des bactéries en début de digestion. L'utilisation des microorganismes par les Protozoaires fait donc intervenir un système multi-enzymatique attaquant le mucocomplexe pariétal. Chez les bactéries Gram négatif, un autre phénomène s'ajoute probablement pour permettre l'attaque de la paroi, en général réfractaire aux enzymes de type lysozyme.

3) REFUS D'INGESTION OU REJET, SELECTION DES BACTERIES

Certains microorganismes ne constituent pas un substrat favorable à la croissance d'un Protozoaire. Celui-ci peut ne pas les ingérer ; il s'agit là d'un mécanisme de défense qui intervient également dans le cas d'une trop forte concentration en bactéries dans le milieu ; il se manifeste le plus souvent soit par l'arrêt de l'endocytose, soit par la formation de vacuoles digestives ne contenant pas de bactéries (54, 106, 125, 200). Le refus d'ingestion de certaines espèces microbiennes par les Protozoaires entraîne souvent une sélection de la nourriture quand les animaux sont mis en présence de mélanges de bactéries. KIDDER et STUART (106) signalent que *Colpoda steini* sélectionne sa nourriture et que les bactéries non absorbées s'accumulent dans le milieu et deviennent prépondérantes. SINGH (194 à 203) a étudié de façon approfondie la nutrition des amibes du sol : ces protozoaires sélectionnent leur nourriture aussi bien dans les cultures sur milieu solide qu'après inoculation dans un sol stérile. WICHTERMAN (228) a passé en revue les nombreux travaux effectués sur le comportement des Paramécies lors de

leur nutrition ; certaines espèces comme *Paramecium trichium* sont plus sélectives que *Paramecium caudatum* vis-à-vis d'un mélange de carmin et de bactéries. Une partie seulement des bactéries pénétrant dans l'entonnoir buccal passe réellement dans le cytopharynx puis dans les vacuoles digestives ; le reste est rejeté par la bouche. L'origine du phénomène tiendrait dans la sensibilité des cils du cytopharynx et de l'entonnoir buccal. Pour GUTIERREZ et HUNGATE (87), GUTIERREZ (85), GUTIERREZ et DAVIS (86), les Ciliés du rumen *Dasytricha ruminantium*, *Isotricha prostoma*, *Entodinium* et *Diplodinium* n'absorbent que quelques espèces parmi toutes celles constituant la flore de la panse des ruminants. COLER et GUNNER (43) à partir d'études sur la nutrition de *Colpoda*, expliquent par la sélection, la disparition rapide, dans les milieux naturels, de certaines bactéries (Coliformes) et la persistance d'autres types (*Arthrobacter*). Les conditions physiologiques des Protozoaires semblent jouer un rôle sur la sélection. RICKETTS (175) l'a constaté chez *Tetrahymena pyriformis* qui, à l'état de jeûne, sélectionne strictement sa nourriture alors que les cellules normalement nourries ingèrent indifféremment les particules présentes dans le milieu en fonction de leurs concentrations respectives. COLEMAN (42) conclut qu'*Entodinium caudatum* ne sélectionne pas réellement les bactéries, mais qu'il les absorbe proportionnellement à leur nombre et à leur taille. MUELLER, ROHLICH et TORO (147) n'ont observé qu'une faible différence dans l'activité phagotrophique entre des *Tetrahymena* à l'état de jeûne et des cellules alimentées normalement. Si le phénomène de la sélection apparaît probable lors de la nutrition chez les Protozoaires, son mécanisme et ses manifestations sont encore très diffi-

les à interpréter. La sélection ne semble pas toujours stricte et, dans les observations de RICKETTS (175) et de COLEMAN (42) elle ne correspond qu'à la conséquence des différences relatives de densité numérique ou de volume entre les éléments figurés du milieu et non à un choix entre ces éléments. FENCHEL (73, 74, 75) travaillant sur des modèles en perles de polystyrène, a dégagé plusieurs aspects importants de la nutrition holozoïque chez les Ciliés : sur 17 espèces de Ciliés, il a pu montrer que les particules sont entraînées dans l'entonnoir buccal et retenues par une des membranelles (la parorale chez les Oligohymenophora). Les particules dont la taille est supérieure à l'espacement des cils sont retenues. Il existe, pour tous les Ciliés, une relation proportionnelle entre la taille minimale des particules retenues efficacement et l'écartement des cils constituant la membranelle supposée intervenir.

4) TOXICITE

L'effet létal de certains germes sur les Protozoaires a été signalé très tôt sans que sa cause ait été précisée (101). Il est possible de classer en trois groupes les bactéries toxiques : les bactéries pigmentées, celles qui sécrètent des exotoxines et celles qui possèdent un constituant pariétal ou intracytoplasmique incolore et toxique vis-à-vis des Protozoaires.

a) Bactéries pigmentées :

Parmi les nombreuses espèces de microorganismes pigmentés, quelques unes seulement ont manifesté une action létale sur les Protozoaires.

- *Pseudomonas aeruginosa* : Les facteurs toxiques les plus fréquemment incriminés sont les produits exocellulaires solubles de ce microorganisme. En effet, BURBANK (27), CHANG (35), MUELLER (145) ont constaté que les bactéries lavées n'avaient qu'une nocivité réduite ou nulle alors que l'extrait de culture est extrêmement toxique à des doses très faibles. L'effet létal des pigments phénaziniques de cette bactérie a été démontré à partir des extraits bruts (35, 84, 125, 197). MUELLER (145) a constaté un effet sur la division cellulaire chez *Paramecium aurelia*. Le mode d'action des pigments phénaziniques a été étudié par ARMSTRONG et STEWART-HULL (10, 11, 205). Deux étapes se succèderaient : la pyocyanine perméabilise d'abord la membrane cellulaire et provoque des troubles d'osmorégulation, puis le pigment est métabolisé à l'intérieur de la cellule et le produit transformé agirait sur les mitochondries.

CHATTON et CHATTON (38) ont apporté les premiers renseignements sur l'existence d'une substance toxique incolore chez *Pseudomonas aeruginosa* ; l'eau de condensation des cultures sur milieu solide est plus active que la suspension elle-même. La substance responsable résiste à la température de 100°C pendant 30 mn, elle est adsorbée sur une bougie L₁. Son action est

identique à celle d'une solution faible de digitonine ou de saponine. La synthèse de cette substance est liée à la chromogénèse chez la bactérie. La présence de composés incolores secrétés par *Pseudomonas aeruginosa* et toxiques pour les Protozoaires a été confirmée par SINGH (197) et par GROSCOP et BRENT (84). PAVLOVSKIS (155) a montré que la substance toxique visible à-vis des mitochondries de souris est un découplant des oxydations phosphorylantes. Elle provoque une modification de perméabilité de la membrane mitochondriale et le gonflement de l'organite. Il s'agit d'une substance incolore, thermolabile, d'un poids moléculaire supérieur à 30.000, donc très différente de la pyocyanine. Ces observations peuvent expliquer les résultats obtenus par CHATTON et CHATTON (38).

L'origine de la toxicité des extraits de culture de *Pseudomonas aeruginosa* n'apparaît donc pas simple. Il est probable que certains des effets toxiques attribués antérieurement aux pigments phénaziniques ont pour origine les substances toxiques incolores, de haut poids moléculaire, décelées uniquement par leur toxicité par CHATTON et CHATTON dès 1927 (38) et étudiées par PAVLOVSKIS.

Les pigments xanthéniques (pyoverdine et fluorescéine) ne se sont pas montrés constamment toxiques pour les Protozoaires. Ces résultats ont été confirmés par les études exécutées sur *Pseudomonas fluorescens* dont les effets sont très variables.

- *Chromobacterium* : Ce microorganisme s'est montré constamment toxique vis-à-vis de tous les types de Protozoaires. Le mode d'action du pigment n'est pas encore connu : si KIDDER et STUART (125) constatent chez *Colpoda steini* une concentration intra-cytoplasmique du pigment, SINGH (197) n'a pu obtenir ces résultats avec les amibes bien que les cellules soient tuées en 1 à 2 heures.

Dans le genre *Chromobacterium*, il existe deux espèces également pigmentées : *Chromobacterium violaceum* secrète de l'acide cyanhydrique, très toxique pour les cellules ; *Chromobacterium lividum* ne secrète pas d'acide cyanhydrique et n'est toxique que par sa production de violacéine.

Ces deux espèces de *Chromobacterium* n'ayant été distinguées que tardivement il est tout à fait possible que SINGH (197) ait utilisé une souche de *C. violaceum* et GROSCOP et BRENT (84) une souche de *C. lividum*, ce qui expliquerait les divergences observées dans les résultats.

- *Serratia marcescens* : KIDDER et STUART (125) ont observé la mort de *Colpoda steini* à la suite de la concentration de la prodigiosine (pigment rouge secrété par les variétés chromogènes de *Serratia marcescens*) à l'intérieur du cytoplasme. BALAMUTH et BRENT (13) ont constaté une vacuolisation très nette du cytoplasme d'*Entamoeba histolytica* par action d'une concentration de prodigiosine de 0,5 mg/l. La mort survient à partir de 2,5 mg/l. Selon GROSCOP et BRENT (84), l'action toxique du pigment est

limitée par sa trop faible solubilité. Il doit exister une autre substance, incolore et soluble, qui est responsable de la plupart des phénomènes observés. Toutefois, de nombreux Ciliés ont été cultivés sur des variétés pigmentées de *Serratia marcescens* ; on constate alors une croissance plus limitée que sur d'autres Entérobactéries mais aucun effet toxique aigu. Le mécanisme de la létalité de certaines souches de *Serratia marcescens* n'est donc pas encore déterminé de façon certaine.

b) Bactéries secrétant des exotoxines :

- *Corynebacterium diphtheriae* : Selon PHILPOTT (160) la toxine diphtérique aurait un effet sur le métabolisme des Paramécies mais aucune conséquence sur la multiplication et la survie des Ciliés.

Au contraire, TUNNICLIFF (219) a montré que le filtrat de culture tuait les Paramécies en cinq heures. Les souches non pathogènes pour le cobaye sont inoffensives pour les Protozoaires. SICKELS et SHAW (193) par ultrafiltration et lavage, ont obtenu un résidu inactif alors que l'ultrafiltrat est aussi toxique que le produit brut isolé des cultures.

- Autres bactéries : TAKENOUCI (213) a tenté d'explorer la toxicité vis-à-vis de la Paramécie des filtrats de cultures de différentes bactéries pathogènes ; il n'a pas mis en évidence d'effets toxiques pour *Corynebacterium diphtheriae*, *Plectridium tetani*, les *Staphylococcus* et *Streptococcus* hém-

lytiques. TUNNICLIFF (220) a utilisé les Ciliés pour le dépistage et la mesure de toxines. Dans le cas de la scarlatine, seize souches de streptocoques sur dix huit étaient toxiques pour les Protozoaires.

c) Toxicité d'origine inconnue :

Escherichia coli, *Salmonella enteritidis* et *Proteus* sp. sont les plus souvent incriminés dans ces phénomènes. CHATTON (36) a découvert une souche particulière d'*E. coli* provoquant l'apparition d'individus dystomes, de chaînes d'individus ou de monstres plurinucléés chez *Colpidium*. Les autres Ciliés testés n'ont pas été sensibles à l'action de cette souche. COLER et GUNNER (43) ont démontré que, chez *Arthrobacter globiformis*, la substance inhibant la croissance de *Colpoda* était localisée dans le cytoplasme bactérien. Dans quelques cas, une accoutumance à l'égard de la bactérie toxique peut être obtenue : chez *Tetrahymena pyriformis*, l'acquisition de la résistance vis-à-vis d'*E. coli* O₁₁₁ B₄ s'accompagne de l'apparition de réactions immunologiques nouvelles (181).

III - ETUDE QUANTITATIVE DE LA NUTRITION BACTERIENNE

Si l'étude qualitative de la nutrition chez les Protozoaires a été entreprise très précocement, les études quantitatives ne se sont développées que beaucoup plus tardivement et les données les plus importantes connues actuellement datent des douze dernières années. Chez les Ciliés,

la capacité de filtration du milieu environnant est limitée par plusieurs facteurs en particulier la taille de l'appareil buccal et le volume filtré par unité de temps. La quantité de bactéries ingérées dépend aussi de la concentration des microorganismes dans le milieu. Nous examinerons successivement la nutrition individuelle, puis les besoins nutritifs et la croissance des populations.

1) VITESSE DE FILTRATION DU MILIEU

SEAMAN (187) a calculé que *Tetrahymena pyriformis* cultivé sur bouillon à la protéose peptone filtrait, en une heure, un volume de milieu égal à son propre volume. RICKETTS (175) a trouvé des valeurs beaucoup plus faibles (8 % du volume propre par heure) ; ces résultats sont proches de ceux obtenus par HOLTER (111) avec les amibes. Selon les résultats de FENCHEL (73) obtenus avec *Glaucoma scintillans*, si l'on se base sur le volume de ce Cilié donné dans la littérature, le rythme de filtration maximum est de 5,4 fois son volume par heure. Ces derniers résultats ont été obtenus avec des particules de polystyrène. La variabilité des données chiffrées montre la difficulté de mesure de la filtration chez les Ciliés. Les résultats de FENCHEL apparaissent en bon accord avec la théorie générale de filtration exposée par l'auteur. Il faut toutefois souligner que l'abondance de la proie doit jouer un rôle dans la vitesse de filtration. RICKETTS (176)

a mis en évidence un cycle dans la formation des vacuoles digestives chez *Tetrahymena pyriformis* en présence d'un mélange de peptone et de latex de 1 μ de diamètre ; la réduction de la vitesse de formation serait liée à l'épuisement de la réserve en lysosomes non combinés et à l'énergie disponible.

2) VITESSE D'INGESTION DES BACTERIES

COLEMAN (42) a calculé la vitesse d'ingestion chez *Entodinium caudatum* nourri avec *Escherichia coli*. Le Cilié ingère 200 bactéries par minute et possède une capacité maximale d'absorption de 10^4 organismes par cellule. CURDS (51), CURDS et COCKBURN (52, 53) ont étudié expérimentalement la quantité de bactéries absorbées par *Tetrahymena pyriformis* cultivé sur *Klebsiella aerogenes*. La quantité maximale de germes ingérés par chaque Cilié est de 28 pour 100 du poids sec de chaque individu par heure en présence de $50 \cdot 10^{-6}$ g de bactéries disponibles par individu. La vitesse d'ingestion des bactéries varie avec la densité bactérienne suivant une loi de type Michaelien. CURDS et COCKBURN (53) ont montré que la vitesse d'ingestion, pour une concentration en substrat constante, était proportionnelle à la fois à la taille et au taux de croissance de *Tetrahymena*. FENCHEL (73) a observé les mêmes résultats avec *Colpidium campylum* en présence de particules de polystyrène et LAYBOURN a obtenu des résultats similaires en présence de bactéries (129, 130, 131).

3) RENDEMENT DE LA CROISSANCE

COLEMAN (51) a observé que 50 % du carbone bactérien est incorporé dans le cytoplasme d'*Entodinium caudatum*. PROPER et GARVER (165) ont calculé pour *Colpoda steini* un rendement de 0,78, particulièrement élevé. Avec *Tetrahymena pyriformis* les valeurs sont de 0,5 (52, 53). Chez *Vorticella microstoma* le rendement serait de 0,47 avec *Alcaligenes faecalis* (209). La valeur 0,5 apparaît la plus vraisemblable pour le rendement de la croissance des Ciliés sur un substrat bactérien. Cette valeur est très élevée et rapproche, du point de vue métabolique, les Protozoaires des bactéries.

4) LE TAUX DE CROISSANCE

Dès 1923, CUTLER et CRUMP (57,58) ont observé que le taux de croissance des Ciliés variait avec la quantité de nourriture disponible dans le milieu et tendait vers une limite supérieure pour les très fortes concentrations en substrat. HARDING (100), COLEMAN (42), PROPER et GARNER (165) sont arrivés à la même conclusion. CURDS et COCKBURN (51, 52, 53) ont postulé que le taux de croissance de *Tetrahymena pyriformis* cultivé sur *Klebsiella aerogenes* suivait une loi de type Michaelien. Beaucoup d'auteurs ont obtenu les mêmes résultats (12, 33, 53, 98, 165, 211, 223), alors que d'autres ont constaté qu'il existait probablement une concentration minimale au dessous de laquelle aucune croissance n'est possible (18, 131). JOST et coll. (116, 117)

ont introduit un modèle pouvant rendre compte de l'existence d'un seuil et ce modèle a été appliqué récemment à *Colpoda steini* (66).

Lors de notre étude de la nutrition de *Colpidium campylum*, nous avons pu préciser ses préférences nutritionnelles et retrouver, à partir d'un très large échantillon de microorganismes, les phénomènes classiquement observés lors de l'alimentation des Ciliés. Nous nous sommes efforcés de préciser certains aspects de la sélection et de la toxicité. Nous discuterons également de la valeur nutritive des différents microorganismes pour le *Colpidium*.

Sur le plan quantitatif, l'utilisation de particules de polystyrène nous a permis d'expliquer certains résultats obtenus lors de la nutrition qualitative, mais aussi d'avancer une théorie sur le problème de la concentration minimale nécessaire à la croissance.

CHAPITRE II

UTILISATION DES PROTOZOAIRES
EN ECOTOXICOLOGIE

De nombreux travaux ont porté sur l'utilisation des Protozoaires comme animaux tests pour des essais biologiques. De très nombreuses espèces et des critères très variés ont été proposés : morphologie, ultrastructure, éthologie et métabolisme, ce dernier critère incluant la croissance et la reproduction. A la lecture des travaux, il apparaît que la technologie adoptée pour chaque méthode est très dépendante de l'espèce choisie et le champ d'application dépend à son tour de la technologie. De l'ensemble de la littérature qui a déjà été analysée en détail dans notre thèse de 3ème cycle (65) nous extrairons ici les méthodes présentant les potentialités d'application les plus intéressantes pour un travail de routine. Le principe de chaque méthode sera discuté brièvement.

I - CRITERES MORPHOLOGIQUES

MORRISSON et TOMKINS (144) ont montré que l'évolution du volume cellulaire de *Tetrahymena pyriformis* au cours de sa croissance est perturbée en présence de toxiques. La mesure du volume moyen cellulaire est précise et rapide (1 mn) si l'on utilise un système électronique d'analyse. Cette méthode présente plusieurs désavantages :

- Les Ciliés sont très sensibles à l'action de l'électrolyte et la pression osmotique des liquides de dilution doit être soigneusement ajustée pour éviter des erreurs importantes lors des mesures.

- Il faut opérer sur des populations denses et dans des liquides très propres. Cette condition exclut les essais sur les rejets car ceux-ci sont généralement très chargés de particules en suspension.

II - CRITERES ETHOLOGIQUES

1) MOBILITE

BERGQUIST et BOVEE (16, 17) ont conçu une méthode originale pour mesurer la mobilité des Ciliés par microphotographie. Une multiexposition est réalisée à l'aide de deux disques stroboscopiques à fentes dont la vitesse de rotation peut être ajustée. La distance entre deux images successives du Cilié sur un négatif multiexposé peut être mesurée très facilement. La variation de la mobilité des organismes est liée à la concentration en toxique. Comme pour la méthode précédente, la présence de grosses particules dans le milieu est une contre-indication d'emploi car les cellules peuvent être perturbées dans leur mouvement. Elle nécessite également un appareillage spécialisé et le traitement de pellicules photographiques. Ce dernier inconvénient peut être supprimé en utilisant des films type Polaroid.

2) ACTIVITES NUTRITIONNELLES

La méthode développée par BRINGMANN et KUHN (26) est basée sur l'ingestion de bactéries par le Cilié *Colpoda maupasi* ; cette ingestion est

suivie en mesurant la densité optique des cultures, les toxiques diminuant l'activité phagotrophique. Le matériel utilisé (spectrophotomètre ou néphélomètre) est très courant et la mesure très rapide. Cet essai est donc très pratique pour la routine et il a été adopté en Allemagne Fédérale. Il est limité aux solutions limpides et non colorées. La standardisation de la nourriture bactérienne doit être également bien réalisée.

III - CRITERES PHYSIOLOGIQUES

1) TEST DE TOXICITE AIGUE (DETERMINATION DE LA DOSE LETALE 50 %)

C'est une méthode classique appliquée à de nombreux organismes. Comme ce test peut être exécuté avec n'importe quelle espèce de Cilié et n'importe quel type de toxique, c'est une des techniques les plus utilisées (6, 7, 8, 9, 28, 30, 32, 182). La difficulté majeure des tests de mortalité est la discrimination entre cellules vivantes et cellules mortes à la fin du test. L'examen au microscope est long et difficile. Le comptage électronique, non discriminant, ne peut être utilisé.

2) TEST DE VIABILITE : APTITUDE A FORMER DES CLONES

HEAF et LEE (105) ont développé une méthode intéressante pour mesurer la viabilité de *Tetrahymena pyriformis* après conservation en azote liqui-

de. Les Ciliés sont isolés dans des cupules de plaques de microtitration dans un milieu convenable. Après incubation, le nombre de clones est déterminé sous microscope. Ce test est, en un certain sens, analogue au test MPN couramment en usage en microbiologie. La méthode de HEAF et LEE utilise des cultures axéniques et cela limite ses applications. Nous l'avons modifiée pour rechercher une méthode plus simple qui sera exposée plus loin.

3) MODIFICATION DE LA CROISSANCE

La croissance des populations de Ciliés peut être mesurée directement ou indirectement.

a) Mesure indirecte de la croissance :

La néphélométrie (44) est bien connue et a été utilisée par de nombreux chercheurs. Son usage est limité aux solutions limpides et exclut les tests sur les eaux usées.

Le dosage des protéines selon LOWRY (229) est une méthode précise et reproductible mais longue et sensible aux sources extérieures de matière organique.

Le dosage de l'ATP cellulaire, employé déjà pour les bactéries (114) est intéressant, mais les résultats peuvent être biaisés par la présence d'autres organismes vivants.

b) Méthode directe de mesure :

Les deux techniques possibles sont le comptage manuel et le comptage électronique. La numération manuelle, après fixation, est effectuée en cellule de SEGDEWICK RAFTER, de FUCHS ROSENTHAL ou de NAGEOTTE. Bien étudiée par SCHERBAUM (184) elle est longue et fastidieuse. La méthode de CURDS et VANDYKE (54), que nous avons utilisée pour certaines études de nutrition, ne nécessite qu'une loupe puissante, mais elle est très lente et se limite à des concentrations de cellules inférieures à 200/ml ; au delà, il faut faire des dilutions. Néanmoins, en dépit de sa longue durée, le dénombrement direct est le plus facile à appliquer dans toutes les circonstances. Le comptage électronique est très rapide et permet le traitement de grandes séries en un temps réduit. Mais la numération est aveugle et il faut travailler sur des milieux exempts de particules pouvant introduire des interférences.

Dans la pratique, la croissance des populations peut être exprimée de différentes manières :

- par comparaison directe des courbes de croissance (6). Il faut

alors intégrer les courbes obtenues en présence de toxique et comparer les résultats à l'intégration du témoin.

- par comparaison des taux de croissance (83, 210, 229). Ce paramètre est très significatif quand il est mesuré correctement. Le problème est de déterminer entre quels points de la courbe le calculer. En effet, un stress initial dû au toxique peut allonger la phase de latence. Il faut donc multiplier les points de prélèvement.

-Par comparaison du nombre de générations (65, 156). Sa détermination ne requiert que 2 mesures (1 seule si la densité initiale de Protozoaires est fixée une fois pour toute). Le nombre de générations (NG) peut être obtenu à partir des populations initiale N_0 et finale N_t par la relation :

$$NG = \log_{(2)} \frac{N_t}{N_0}$$

Le pourcentage d'inhibition est calculé par le rapport entre NG témoin et NG en présence de toxique.

Le nombre de générations mesure un effet global du toxique à un temps donné sans considération de l'aspect de la courbe de croissance des cultures.

TABEAU 7. Analyse comparative des diverses méthodes de test de toxicité.

Critère	Equipement spécifique	Vitesse de mesure	Nombre de mesures	Utilisation des résultats	Interférence particules	Interférence colorée
Volume moyen cellulaire	Coulter counter	+	1	Analyse de variance	+	-
Mobilité	Microphotographie	-	1	Analyse de variance	+	-
Phagotrophie	Photomètre	+	Plusieurs	Directe	+	+
Toxicité aiguë	Néant	-	1	Directe	-	-
Formation de clones	Néant	+	1	Directe	-	-
Courbes de croissance	(a)	(a)	Plusieurs	Intégration	(a)	(a)
Taux de croissance	(a)	(a)	Plusieurs	Régression linéaire	(a)	(a)
Nombre de générations	(a)	(a)	1	Transformation log + Analyse de variance	(a)	(a)
Dosage des protéines	Photomètre	-			+	+
Dosage de l'ATP	ATP metre	+			+	+
Comptage manuel	Microscope	-			-	-
Comptage électronique	Coulter counter	+			+	-

(a) dépend de la technique de numération.

IV - DISCUSSION ET CONCLUSIONS (Tableau 7, p. 57)

Nous avons réuni dans le tableau 7 les caractères principaux des méthodes en fonction des critères suivants :

- Pour la méthode : nombre de mesures et temps requis.

- Pour les applications : la possibilité d'interférence par des particules en suspension ou des produits colorés.

La réponse dépend, selon les méthodes, de la technique de mesure, de la sensibilité recherchée et du matériel disponible.

A partir de cette revue rapide, on peut conclure que, parmi les méthodes proposées, plusieurs peuvent être recommandées pour un essai Protozoaire standard. Nous en avons examiné deux en détail en recherchant leur possibilité d'application pour des tests de toxicité. La première est un test basé sur la croissance. Elle nous a permis d'explorer l'action de nombreux toxiques. La seconde est un test de viabilité dérivé de la méthode de HEAF et LEE (105).

DEUXIEME PARTIE

NUTRITION DE COLPIDIUM CAMPYLUM

CHAPITRE I

CROISSANCE AXENIQUE DE *COLPIDIUM CAMPYLUM*

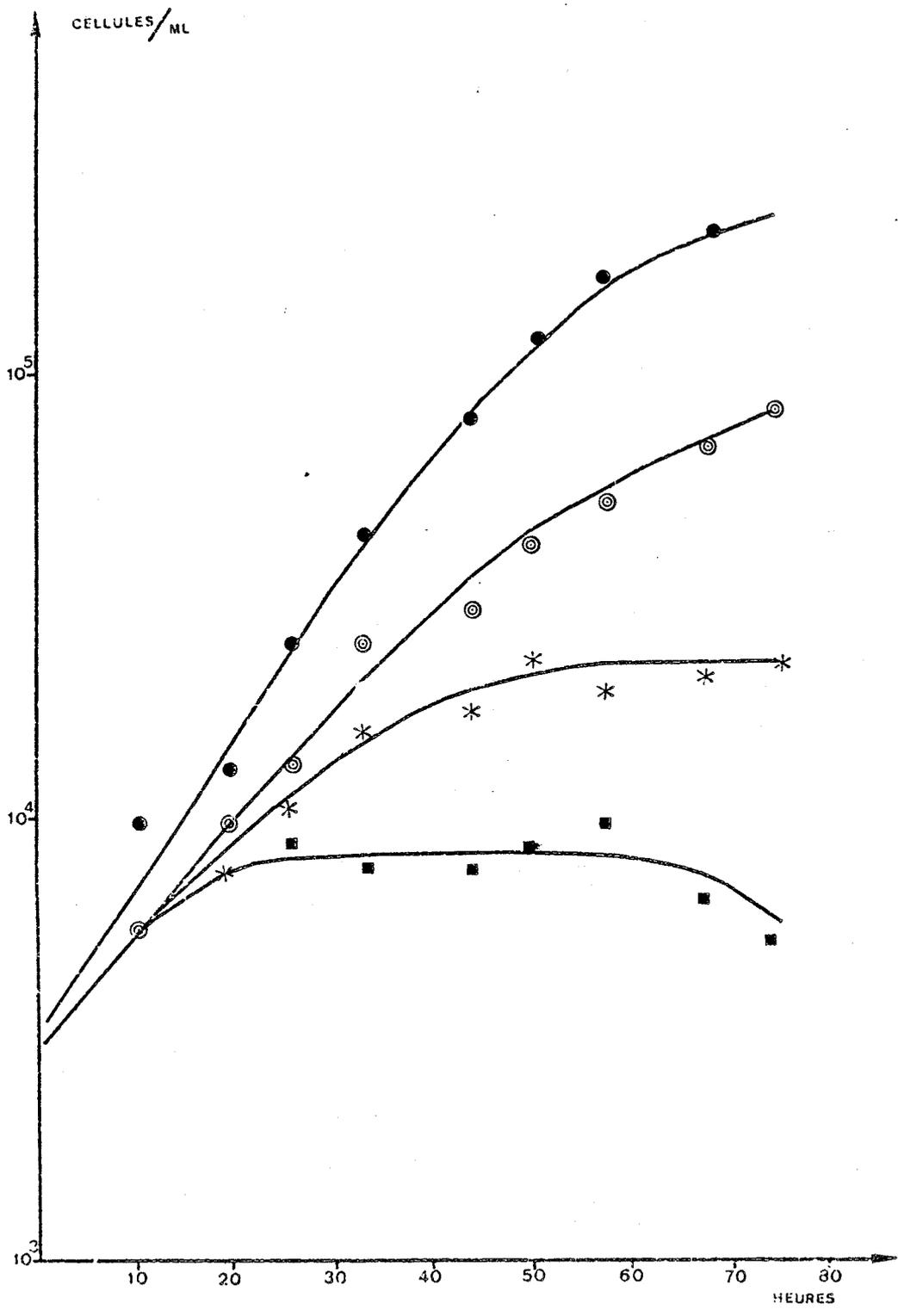


FIG. 4 - Croissance de *C. campylobacter* sur différents constituants du milieu PPYS par comparaison avec le milieu axénique (AXM)



- : Protéose Peptone 0,75 %
- * : AXM
- ⊙ : PPYS
- : PPYS + 1 % Albumine Bovine

Notre travail a consisté à étudier des milieux axéniques permettant d'obtenir des cultures très denses avec un temps de génération le plus court possible. Il nous fallait également étudier les possibilités de culture sur un milieu synthétique. Pour ce travail, nous sommes partis des deux milieux standards utilisés pour la culture de *Tetrahymena* : le milieu à la protéose peptone (PPYS) et le milieu minimum (MD). Le milieu à la caséine précipitée (AX (4) a été pris comme référence. La composition de tous ces milieux est donnée dans l'Annexe I. A partir des cultures axéniques, nous avons étudié l'influence de la température sur la croissance de *Colpidium campylum* et, par l'action de chocs thermiques, nous avons essayé de synchroniser ces cultures.

A - PARTIE EXPERIMENTALE

I - INFLUENCE DES ELEMENTS NUTRITIFS

1) MILIEUX STANDARDS

La figure 4 montre les résultats obtenus avec des cellules ayant préalablement jeûné 24 heures. Les cellules se multiplient très peu sur la protéose peptone seule (1 division). L'addition d'extrait de levure fournit un milieu de culture déjà supérieur à celui utilisant la caséine précipitée. L'apport essentiel de l'extrait de levure dans le milieu réside

TABLEAU 8. Croissance de *Colpidium campylum* sur milieu PPYS enrichi en diverses protéines.

Protéine ajoutée	Nombre de cellules initial / ml	Nombre de cellules après 41 h de culture
PPYS témoin	3000	35000
Gélatine 1 %	3000	50000
Gélatine 1 % hydrolysée	3000	34000
Albumine bovine 1 %	3000	71000

TABLEAU 9. Croissance de *Colpidium campylum* en milieu défini enrichi en protéines.

Protéine et concentration	Temps de génération	Densité cellulaire finale/ml
Albumine bovine Sigma A 4503 1 %	16 h	40.000
Albumine A 4503 ultrafiltrée sur membrane PM 10.000 1 %	27 h	18.000
Albumine bovine Serva 1 %	16 h	30.000
Albumine d'oeuf Sigma A 5378 1 %	14 h	30.000



dans ses précurseurs d'acides nucléiques, indispensables à la croissance des Tétrahyméniés. L'apport vitaminique déjà souligné par d'autres auteurs (71, 157) n'est certainement pas négligeable.

Quelles que soient les conditions physiologiques au moment de la mise en culture, *Colpidium* est incapable de se développer sur le milieu synthétique.

2) ACTION DES PROTIDES SUR LA CROISSANCE DE *C. CAMPYLUM*

Sur le milieu PPYS nous avons testé l'action de l'albumine sérique bovine (Sigma A 4507), de la gélatine (Sigma G 2500) et de la gélatine hydrolysée. Le tableau 8 montre que l'albumine bovine constitue un meilleur apport que la gélatine. La gélatine hydrolysée possède une valeur nutritive nettement plus faible. L'albumine d'oeuf (Sigma A 5378) possède une action stimulante identique à celle de l'albumine sérique bovine.

L'addition d'albumine bovine sérique à 1 % permet une multiplication active de *Colpidium* sur le milieu synthétique. Le tableau 9 regroupe les résultats d'expériences réalisées avec différents types d'albumine. Les trois types d'albumine brute favorisent d'une façon identique la croissance. L'ultrafiltration contre une membrane laissant passer les molécules jusqu'à un poids moléculaire de 10.000 entraîne un certain nombre de composés utiles à la croissance car le temps de génération est nettement allongé et la population finale obtenue est plus faible.

contenant 1 % d'albumine en fonction
de la quantité d'acides aminés ajoutée.

Nombre de cellules obtenues en 70 h de culture.

Milieu	Nombre de cellules initial (10^3)	Nombre de cellules après 70 h (10^3)
DM - aa + 1 % AB	3	80
DM + aa + 1 % AB	3	134,5
DM + aa/4 = 1 % AB	3	121
DM + aa/10 + 1 % AB	3	105
DM + aa/20 + 1 % AB	3	85,5

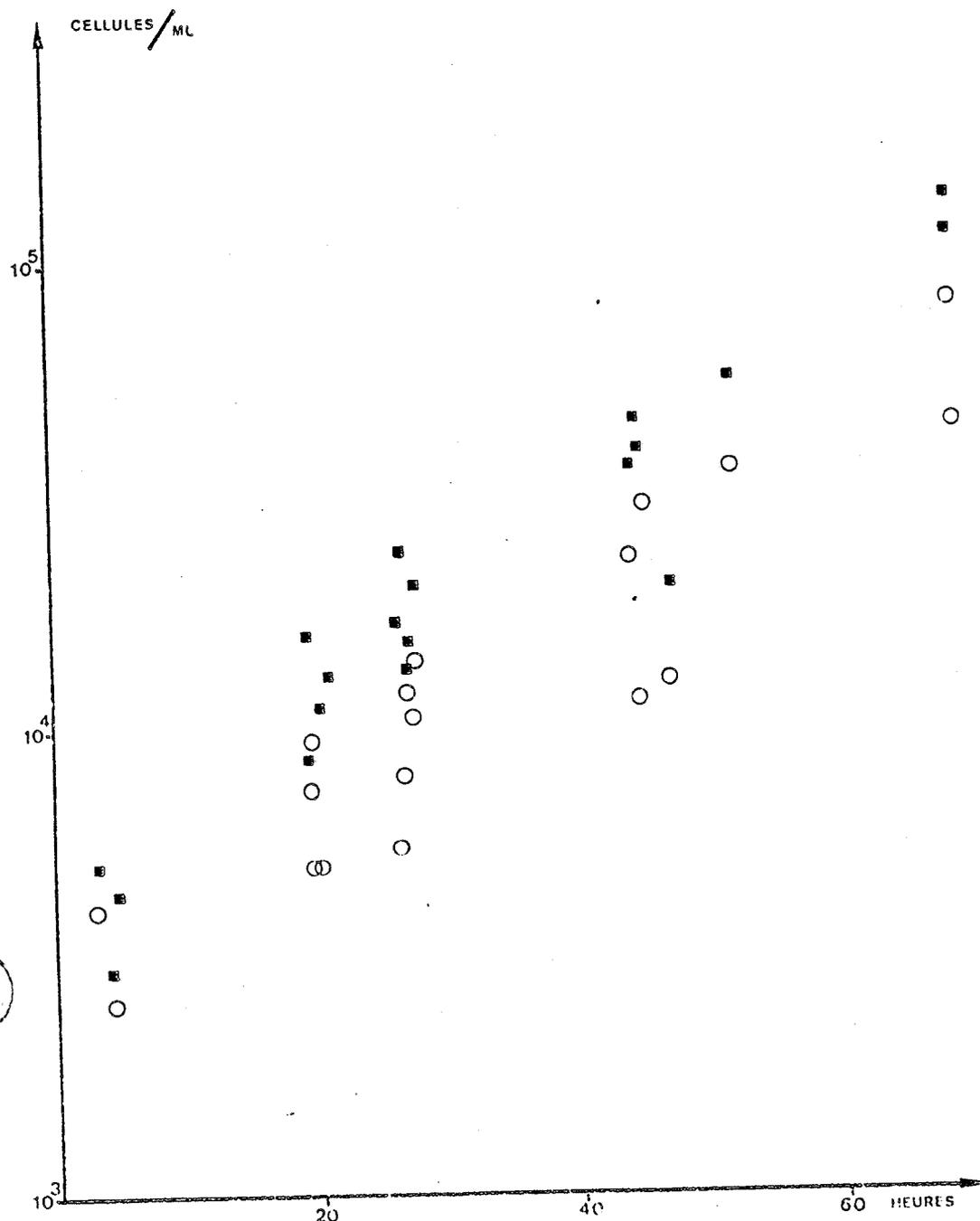


FIG. 5 Croissance de *C. campyllum* en milieu DM + 1 % Albumine bovine (■) ou avec l'albumine comme seule source d'acides aminés (○)

Si l'on enlève les aminoacides du milieu, le *Colpidium*, qui ne dispose plus que de la protéine comme source d'acide aminé, est capable de l'utiliser efficacement (figure 5). Le temps de génération est toutefois plus long qu'avec les acides aminés. La croissance apparaît proportionnelle à la quantité d'acides aminés ajoutée dans le milieu (tableau 10). Le tableau P. 67 montre les résultats obtenus avec différents ajouts d'acides aminés ou de protéines dans le milieu synthétique.

Le *Colpidium* est capable d'utiliser les aminoacides en présence d'albumine ou de peptones mais ne se multiplie pas dans le milieu synthétique en absence de protéine. On peut se demander si c'est l'apport d'acides aminés indispensables (tyrosine, cystéine), l'exigence de *Colpidium* pour des peptides ou des protéines ou la présence d'impuretés stimulantes dans la protéine utilisée qui sont à l'origine des bons résultats observés en présence d'albumine.

3) ACTION DES COMPOSES LIPIDIQUES

Nous avons pu obtenir l'albumine bovine et l'albumine d'oeuf débarrassées des acides gras qui les contaminent. Employées à la même concentration que les albumines non traitées, ces produits stimulent nettement moins la croissance de *Colpidium* (fig. 6 P. 68). En milieu PPYS, la différence est nettement moins sensible. Ceci montre que l'impureté lipidique présente dans l'albumine joue un rôle très important dans la nutrition de *Colpidium*.

TABLEAU 11. Croissance de *Colpidium* dans le milieu synthétique enrichi en différents aminoacides ou en protéines.

Produit ajouté	Croissance observée
Tyrosine	0
Cystéine	0
Acide cystéique	0
Cystine	0
Tyrosine + Cystine + Cystéine	0
Acides aminés quaduple concentration	0
Tyrosilglycine	0
Tyrosylglycine + Acide cystéique	0
Extrait de levure 0,75 %	+
Protéose peptone 0,75 %	++
Albumine d'oeuf 1 %	+++
Albumine d'oeuf coagulée à la chaleur 1 %	+++
Albumine de poulet 1 %	+++
Albumine d'oeuf purifiée 1 %	+++

0 = pas de multiplication

+ = croissance faible (1 à 2 division)

+ + = croissance moyenne

+ + + = croissance forte



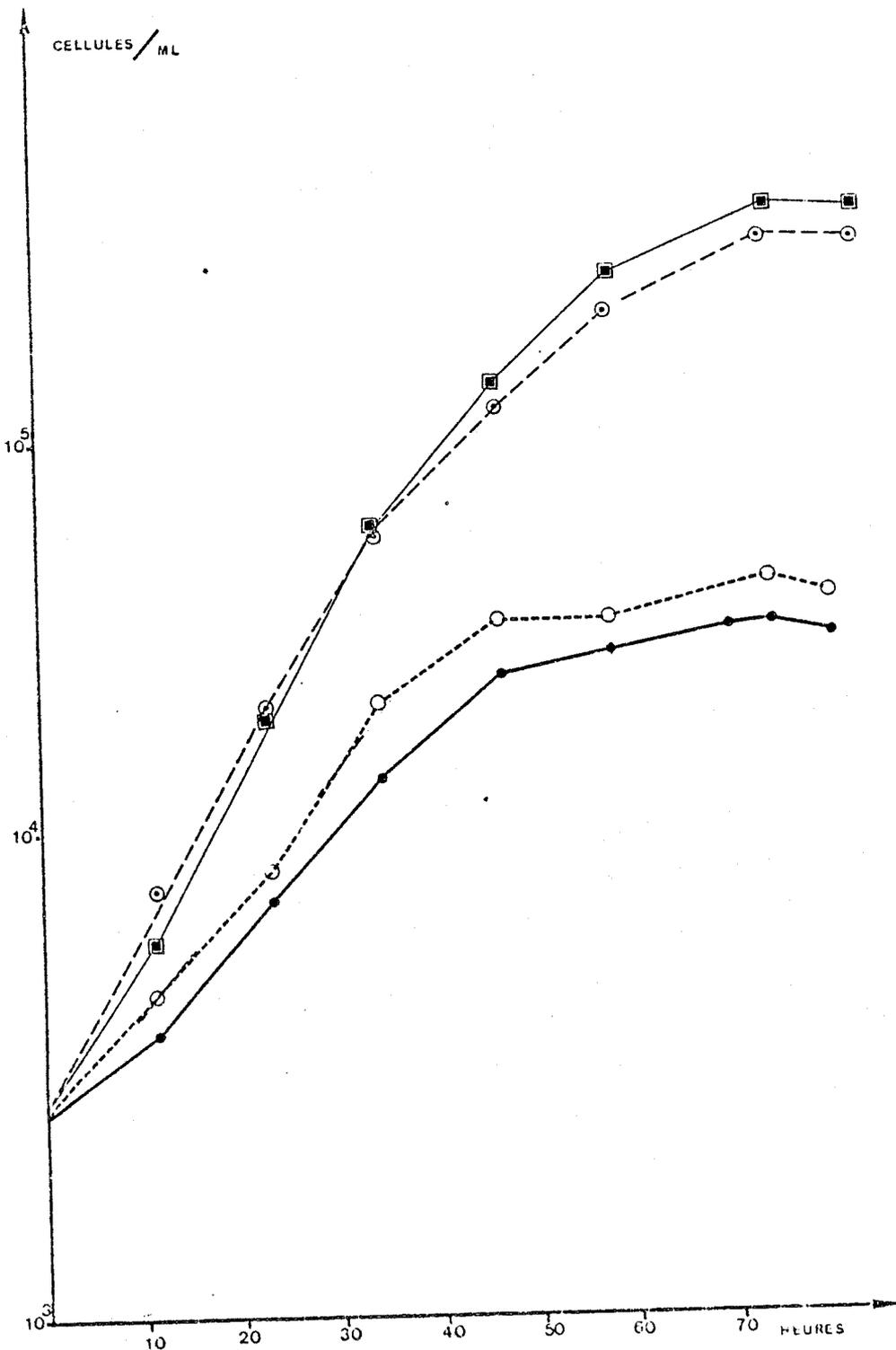


FIG. 6 Croissance de *C. campyllum* en milieu défini (MD) additionné d'albumine bovine ou d'albumine d'oeuf avec ou sans acides gras

- : MD + 1 % d'albumine bovine
- : " " " sans acides gras
- : MD + 1 % d'albumine d'oeuf
- : " " " sans acides gras



Nous avons recherché quels produits éventuellement présents dans la fraction lipidique de l'impureté pouvaient être les agents stimulants : nos expériences ont porté essentiellement sur les acides gras et leurs ester sur les phospholipides et les stérols.

Nos premiers essais ont porté sur l'huile de germe de maïs contenant 98 % d'acide oléique et environ 5 mg/litre de vitamines du groupe D. Nous avons testé cette huile en combinaison avec l'albumine suivant un plan factoriel. La croissance observée au bout de 48 à 72 heures est représentée sur la figure 7. L'action stimulante de l'acide oléique se manifeste de plus en plus nettement au fur et à mesure de la multiplication. Cette stimulation est affaiblie en présence d'albumine et n'est plus sensible quand on emploie 1,5 % de protéine. L'action de l'albumine, à toute concentration, prédomine sur celle des lipides. Le temps de génération de *C. campyllum* sur milieu PPYS est diminué de 16 % en présence de 125 µg/ml d'huile de maïs.

L'acide oléique pur a été testé sur la croissance de *Colpidium*. En milieu PPYS (fig.8 P.71) le temps de génération est réduit de 20 % en présence de 10 µg/ml d'acide oléique. L'action stimulante n'est plus sensible en présence d'albumine. En milieu synthétique (figure 9) aucune action n'a été décelée. Le Tween 80 exerce une action nette sur la croissance, particulièrement sur la population finale observée.

Plusieurs types de phospholipides ont été testés au cours de notre étude. Certains sont des substances pures comme l'oleyl sarcosine, la L-α-

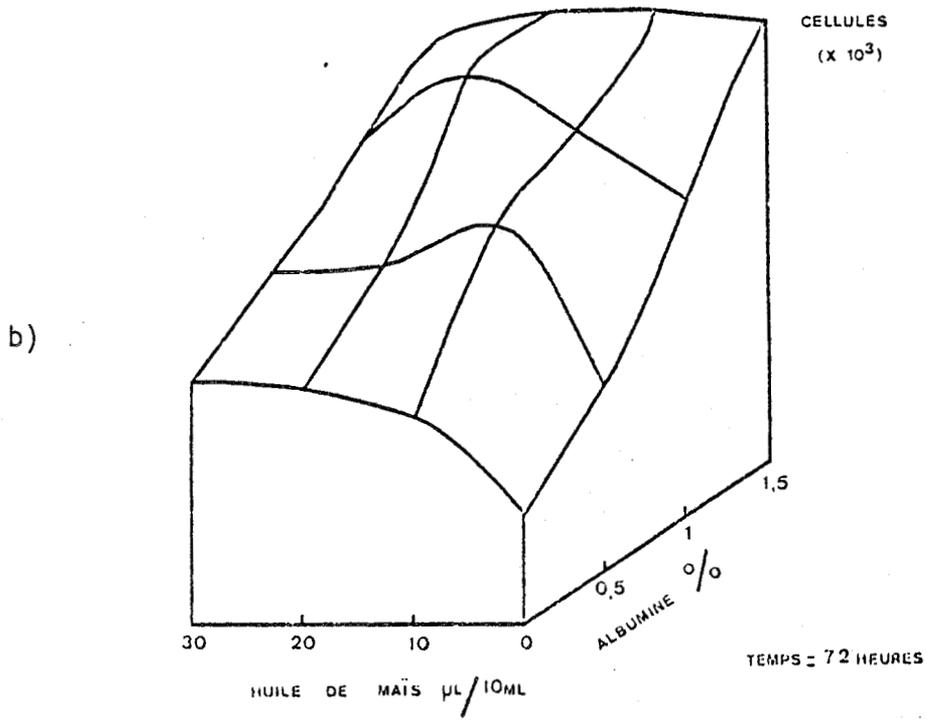
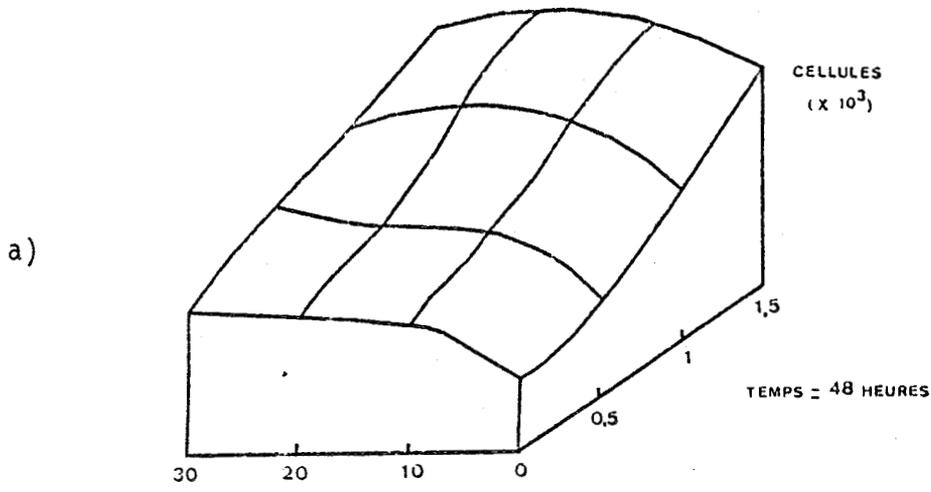


FIG. 7 Croissance de *C. campyllum* en milieu PPYS enrichi en huile de maïs et en albumine bovine

a) population à la 48^{ème} heure

b) population à la 72^{ème} heure



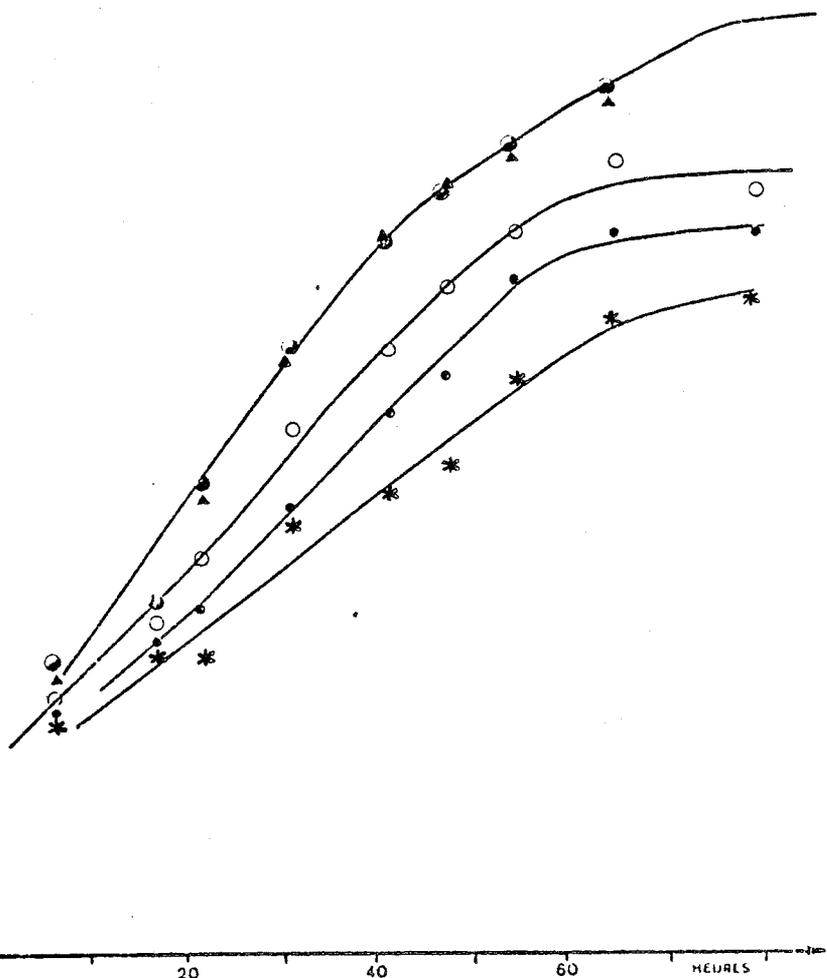


FIG. 8

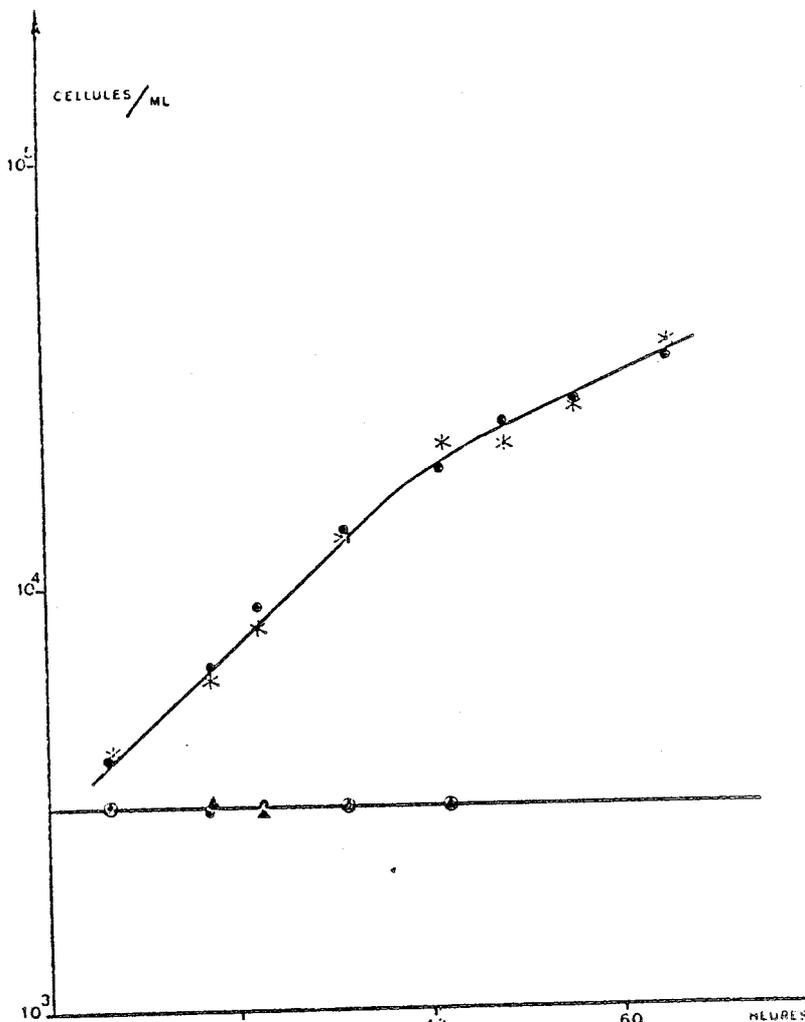
Croissance de *C. campyllum* en milieu PPYS en présence d'acide oléique

- * : PPYS
- : " + 3 µg/ml d'acide oléique
- : " + 10 µg/ml " "
- : PPYS + 1 % d'albumine bovine
- ▲ : " " + 10 µg/ml d'acide oléique

FIG. 9

Croissance de *C. campyllum* en milieu défini (MD) en présence d'acide oléique

- : MD
- ▲ : MD + 10 µg/ml d'acide oléique
- : MD + 1 % d'albumine bovine
- * : " " + 10 µg/ml d'acide oléique



céphaline et ses esters ; d'autres, comme l'asolectine, sont des mélanges complexes. L'asolectine a été utilisée pour la culture de divers Ciliés (112, 226), sa composition est indiquée dans le tab.12(P.73) . Enfin nous avons testé des extraits aqueux et acétoniques de jaune d'oeuf (Bacto Egg Yolk Difco). L'extrait aqueux a été préparé par ébullition d'une décoction à 20 % de jaune d'oeuf pendant 10 minutes. L'extrait a été ensuite filtré sur papier filtre puis stérilisé sur membrane. L'extrait acétonique a été préparé par contact de 48 heures avec l'acétone (2 g de jaune dans 10 ml sous agitation) suivi de filtration.

En milieu défini (MD) aucun des phospholipides testés n'a stimulé la croissance de *Colpidium*, que ce soit en présence ou en absence d'albumine bovine. En utilisant de l'albumine sans acide gras, nous avons observé une influence très nette de l' α -céphaline (fig.10 P.74) et de l'extrait aqueux de jaune d'oeuf.

Dans le milieu PPYS l'oleyl sarcosine est toxique pour le *Colpidium* L'asolectine exerce un effet stimulant. Si de l'albumine est ajoutée simultanément, le taux de croissance n'est pas modifié mais la population finale est plus élevée.

Nous avons testé l' α -tocophérol et le calciférol, présents dans l'huile de maïs, et le stigmastérol qui est un facteur de croissance pour *Paramecium* (226). Seul le stigmastérol exerce une action sensible en milieu

TABLEAU 12. Analyse qualitative et semi quantitative de l'Asolectine. (Analyse de J.J. HOLZ Jr. - communication personnelle de L. RASMUSSEN).

Les substances marquées par * ont été identifiées mais non quantifiées car en trop faible quantité.

Composants	% des lipides totaux
- <u>Lipides neutres</u>	2
. Composants majeurs	
Triacylglycérol	*
Stérols	*
. Composants mineurs	
Hydrocarbures	*
Acides gras non estérifiés	*
Mono et diacylglycérols	*
- <u>Lipides polaires</u>	
. Glycolipides	10
Galactolipides	*
Sulfolipides	*
. Phospholipides	88
Phosphatidylcholine	33
Phosphatidylethanolamine	33
Phospholipides acides	15
Phosphatidyl inositol	*
Phosphatidyl glycérol	*
Acide phosphatidique	*
. Phytosphingolipides	2
- Lipides polaires non identifiés	5
Acides gras des lipides totaux	% des acides gras totaux
Acide myristique	1
Acide palmitique	20
Acide stéarique	4
Acide oléique	9
Acide linoléique	57
Acide γ linoléique	7
Autres	2



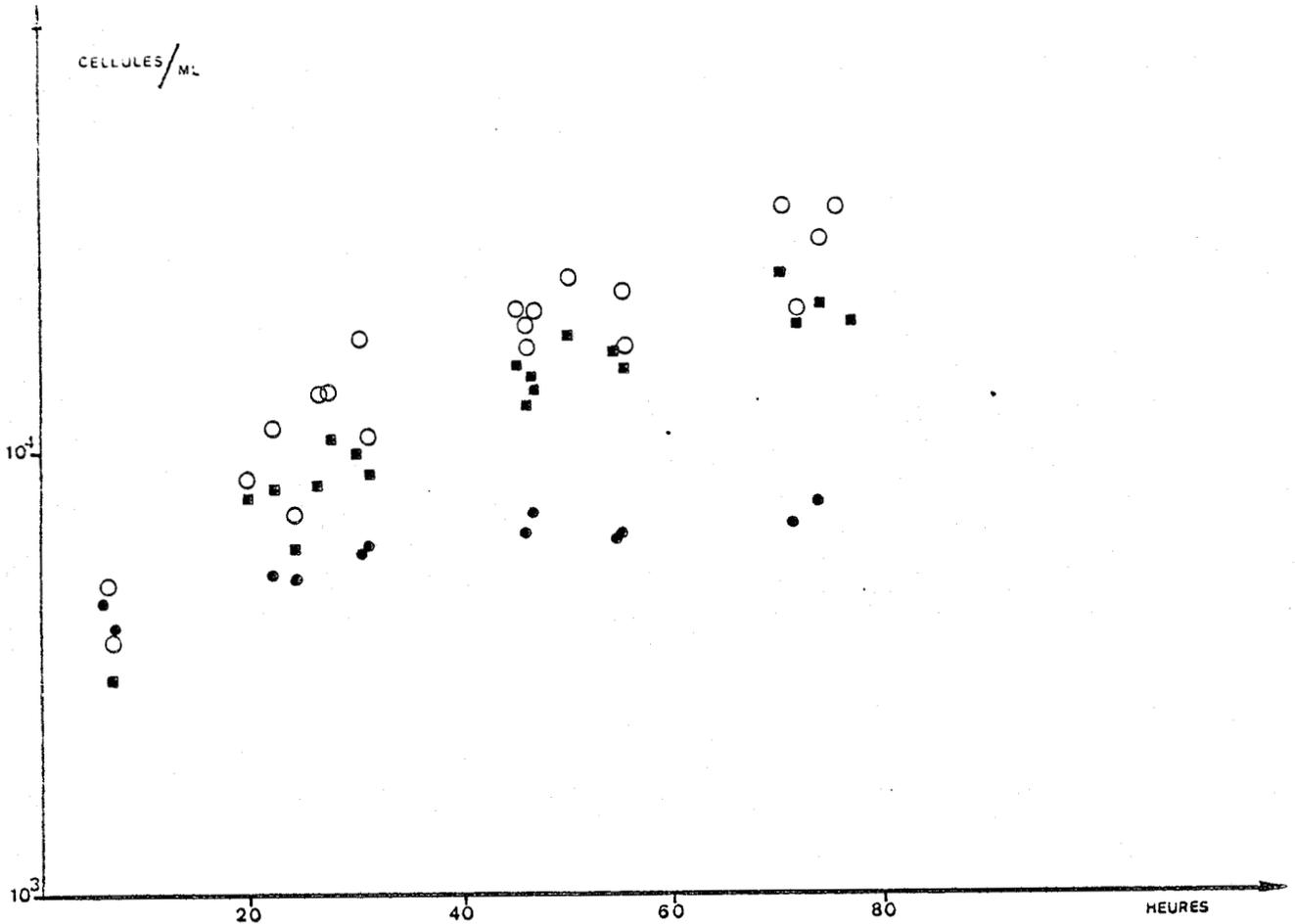


FIG. 10

Croissance de *C. campyllum* en milieu défini (MD) en présence d'α cephaline

- : MD + 1 % d'albumine bovine
- : " " " sans acide gras
- : " " " + 20 µg/ml d'α cephaline

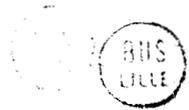


TABLEAU 13. Influence de différents composés lipidiques sur la croissance de *C. campyllum*.

Produit	Milieu synthétique (MD)			Milieu peptoné (PPYS)	
	MD	MD + 1 % Albumine	MD + 1 % Albumine sans acides gras	PPYS	PPYS + Albumine 1
Huile de maïs	-	-		+	-
Acide oléique	-	-		+	-
Tween 80	-	-		+	-
Oleyle sarcosine				t	t
L α céphaline	-	+ (faible)	+		
Lécithine	-	-		-	-
Extrait aqueux de jaune d'oeuf	-	+ (faible)	+		
Extrait acétonique de jaune d'oeuf	-	-	-		
α céphaline dipalmitique	-	-	-	-	-
Asolectine	-	+ (faible)		+	+ (faible)
α tocopherol	-	-		-	-
Calciférol	-	-		-	-
Stigmasterol	-	+			+

- : aucune action ; + : action stimulante ; t : toxique

PPYS. Il permet d'obtenir, associé à l'asolectine ou à l'albumine, des densités finales plus élevées. Le stigmastérol ne semble pas indispensable à la croissance chez *Colpidium*.

Le tableau 13 permet d'examiner l'ensemble des résultats obtenus avec les composés lipidiques. On se rend compte qu'un nombre restreint de substances se sont montrées actives. Les trois produits intervenant efficacement sont: l'acide oléique, l' α -céphaline et le stigmastérol.

4) ACTION DE FACTEURS DE CROISSANCE SUR LA MULTIPLICATION DE

COLPIDIUM CAMPYLUM

Nous avons testé, sans succès, sur les cultures de *Colpidium*, les substances suivantes :

<u>Minéraux</u>	:	NaCl
		MgCl ₂ + CaCl ₂
		FeCl ₃
		CuSO ₄
		FeCl ₃ + CuSO ₄
<u>Protéines riches en fer</u>	:	Hémine
		Hématine

Vitamines : Acide pantothénique
Acide folinique
Acide folique

Autres substances : Thymidine
Triéthanolamine
Acide pimélique
Acide diaminopimélique

5) DEFINITION DE QUELQUES MILIEUX DE CULTURE DE COLPIDIUM CAMPYLUM

a) Le milieu synthétique (MS) :

Notre milieu actuel nous permet d'obtenir des résultats équivalent à ceux de LILLY et STILWELL. Le milieu de base (MD) est enrichi en NaCl (0,9 mg/ml), en thymidine (0,9 mg/ml), en tyrosine (0,2 mg/ml), en asolec-tine (0,1 mg/ml) et en acide folique (1 µg/ml). Les temps de génération res-tent très longs (40 heures) et les populations maximales restent faibles (15.000 cellules/ml) soit 5 générations en 200 à 250 heures. Toutefois, ces résultats sont obtenus avec des inocula normaux (500 cellules/ml) alors que LILLY et STILWELL inoculent à plus de 2000 cellules/ml pour plafonner à environ 8000 cellules/ml.

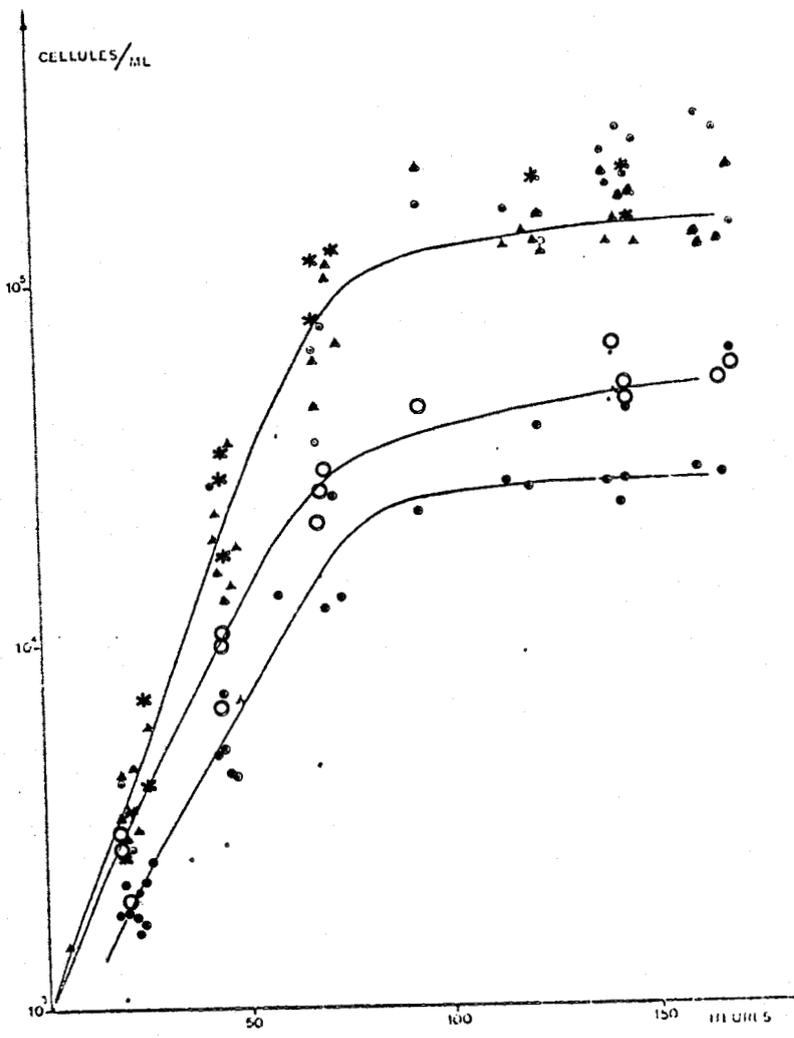


FIG. 12

Croissance de *C. campyllum* sur différents milieux peptonés

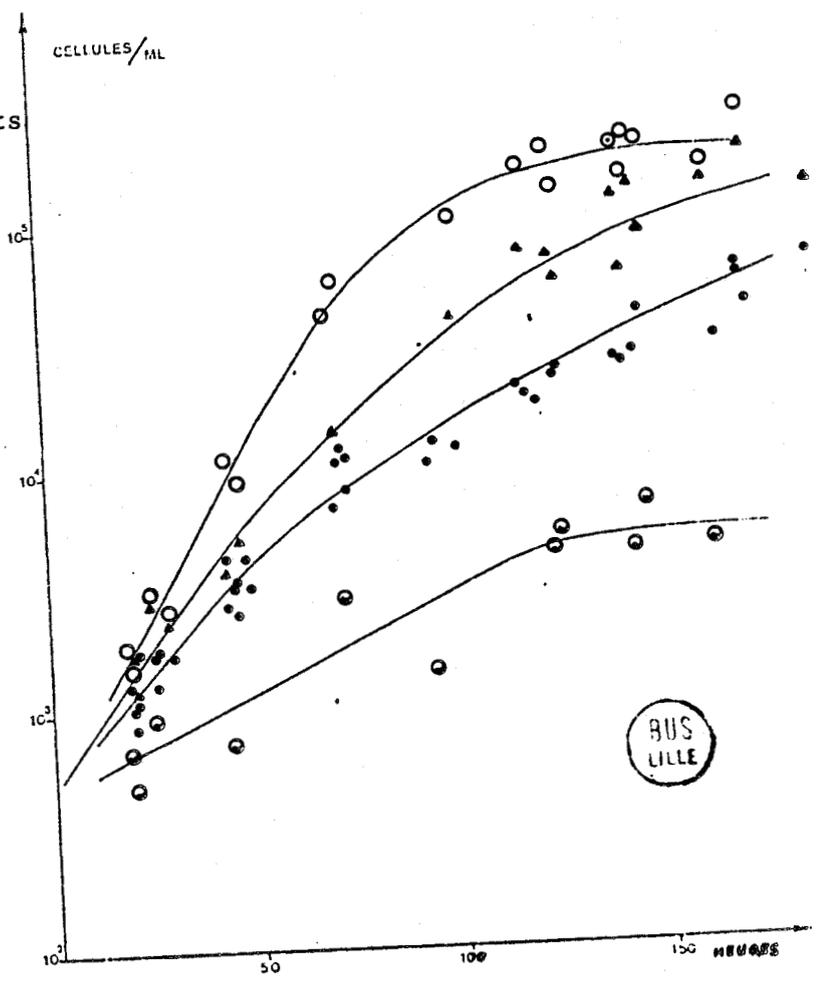
- : PPYS
- : PPYS + 0,1 mg/ml d'Asolectine
- ▲: PPYS + 1 % d'albumine bovine
- *: PPYS + " " + 0,1 mg/ml d'Asolectine
- ⊙: PPYS + 1 % d'albumine bovine + 0,1 mg/ml d'Asolectine + 4 µg/ml de Stigmasterol

FIG. 11

Croissance de *C. campyllum* sur différents milieux semi synthétiques

- ⊙: MS
- : MD + 1 % d'albumine bovine
- ▲: MS + 1 % d'albumine bovine
- : milieu MDR

voir composition P. 79



b) Milieux semi-synthétiques et milieux peptonés (fig. 11 et 12 P.7.)

A partir du milieu synthétique (MS) nous avons élaboré plusieurs milieux permettant une excellente croissance de *C. campyllum*. La figure 11 montre les croissances obtenues avec plusieurs milieux semi-synthétiques, respectivement MD + 1 % d'albumine bovine, MS + 1 % d'albumine bovine, et MS + 1 % d'albumine bovine enrichie avec de la cystéine (0,1 mg/ml), de la cystine (0,1 mg/ml) et de la tyrosine (0,2 mg/ml) (MDR). Ce dernier milieu nous permet d'obtenir des temps de génération très courts et des populations finales pratiquement identiques à celles obtenues sur le milieu PPYS enrichi en albumine. Ce dernier milieu montre également que la tyrosine, la cystéine et la cystine jouent un grand rôle, soit seules, soit en association, et que le *Colpidium* est probablement exigeant vis-à-vis de l'un de ces amino acides

La figure 12 montre les performances obtenues avec divers milieux peptonés. Ils permettent d'obtenir de fortes populations de *Colpidium*, des temps de génération courts et ont l'avantage d'une grande simplicité de préparation. Ils sont dépourvus de particules protéiniques en suspension et la récolte et le lavage des cellules en sont grandement facilités.

II - EFFETS DE LA TEMPERATURE SUR LA CROISSANCE DE *COLPIDIUM CAMPYLUM*

1) DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE DE CROISSANCE ET DE LA TEMPERATURE MAXIMALE TOLEREE

Ces travaux ont été réalisés sur des cultures axéniques de *C. campylum* en milieu PPYS enrichi de 1 % d'albumine.

a) Température optimale de croissance : (fig. 13 P. 81)

La figure 13 montre le temps de génération obtenu en fonction de la température entre 24°C et 31°C. Le temps de génération passe par un minimum à 28°C puis augmente très rapidement quand la température s'élève. Les techniques de culture ne permettent que très difficilement de déterminer la température limite tolérée par *Colpidium campylum*.

b) Température maximale tolérée :

Une technique de polarisation de fluorescence nous a été proposée par HILL et ZEUTHEN lors d'un stage au Biological Institute of the Carlsberg Foundation à Copenhague.

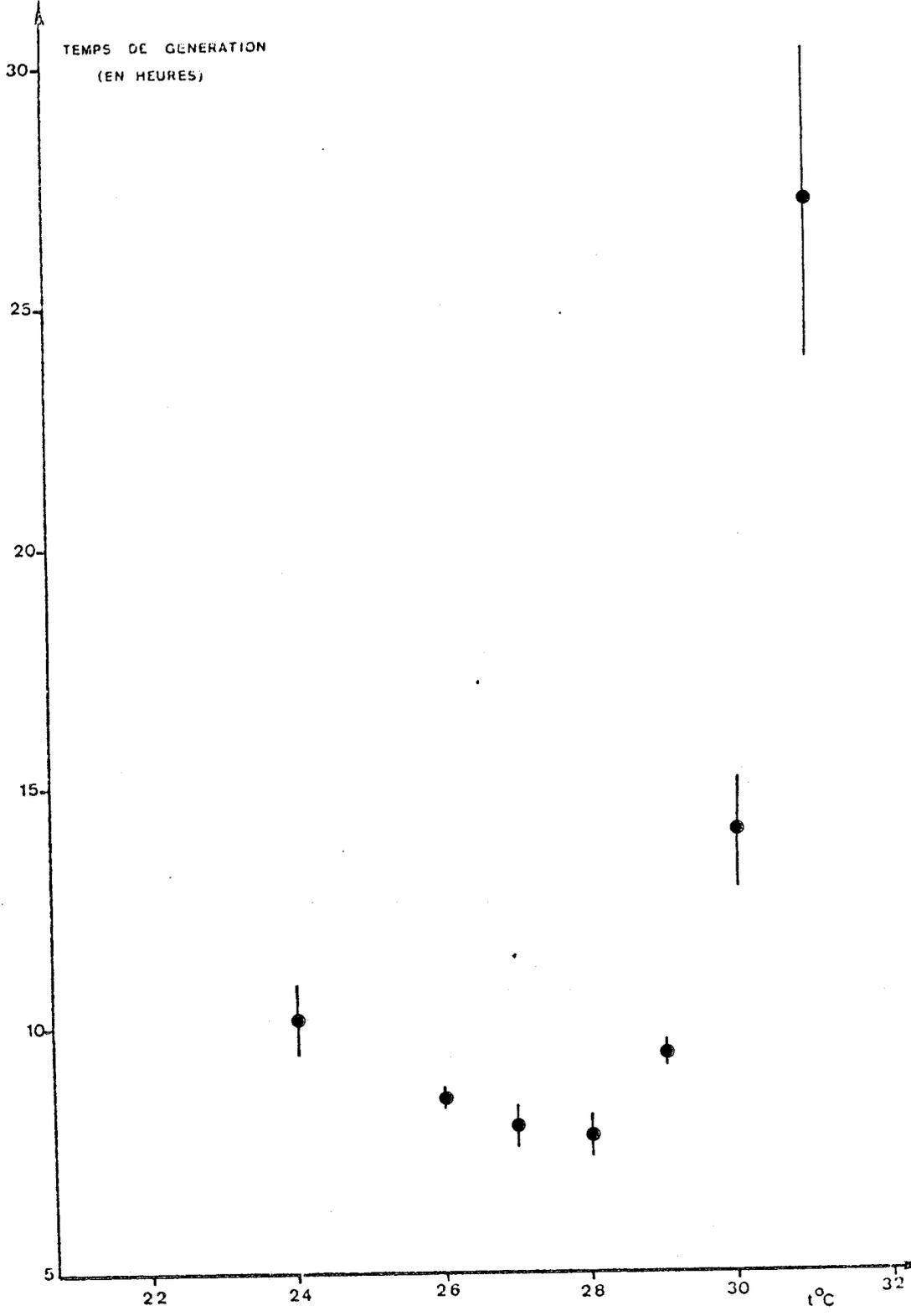


FIG. 13. Croissance de *C. campyllum* en fonction de la température
(Moyenne et écart type de 8 expériences)

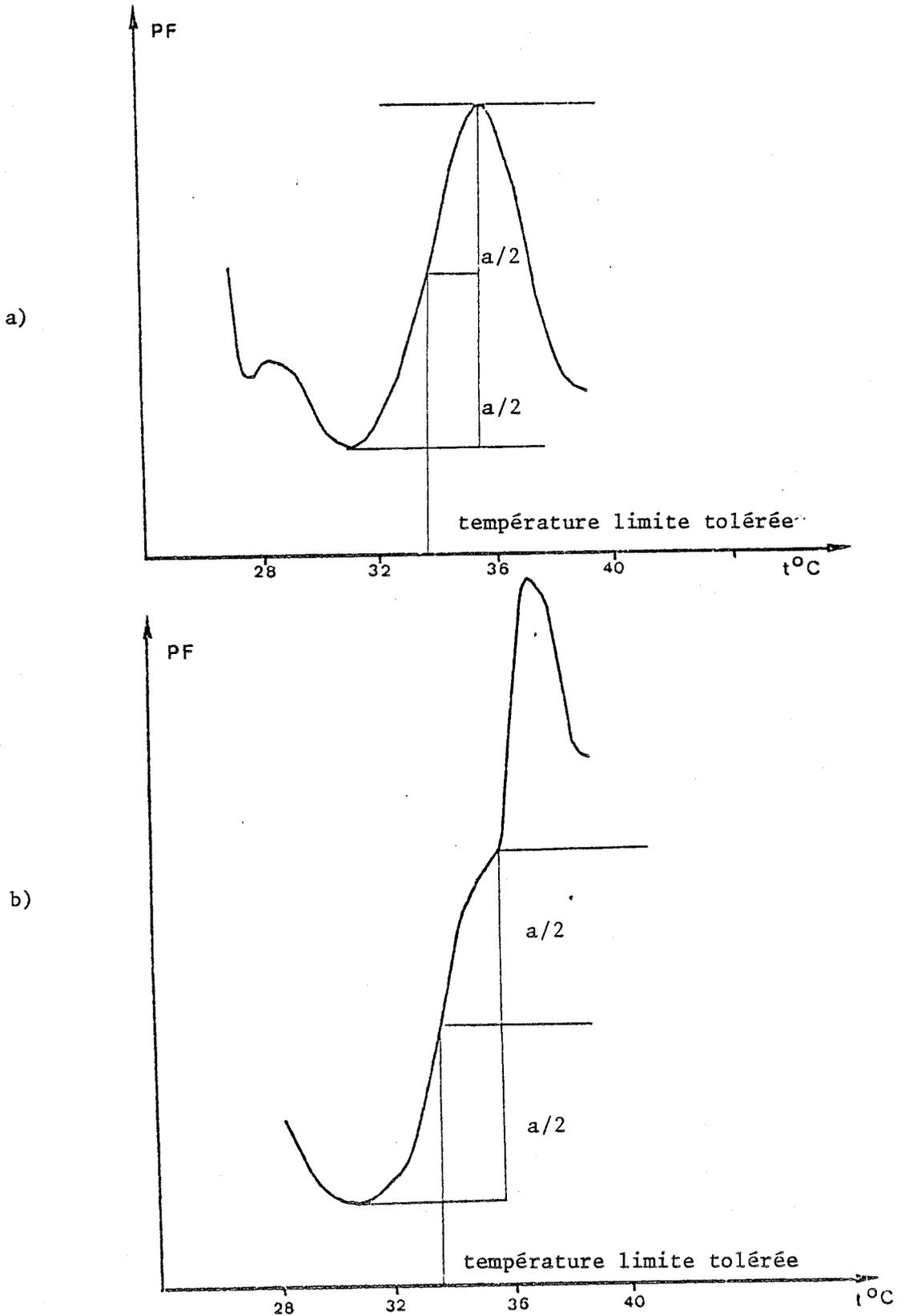


L'appareil utilisé est un fluorimètre Aminco Bowman très modifié par HILL et ZEUTHEN (communication personnelle, R. HILL, en préparation). Les cellules cultivées à 28°C sont lavées trois fois avec précaution dans du tampon Tris pH 7,0 10mM rigoureusement maintenu à 28°C. Elles sont placées dans une cuve en quartz. La cuve est ensuite chauffée progressivement (2°C/mn) et on excite les cellules à une longueur d'onde de 285 nm. La fluorescence des cellules est mesurée à 340 nm. Le résultat est indiqué sur la fig.14b P.83. Par comparaison, nous donnons (figure 14 a) l'enregistrement obtenu avec *Tetrahymena*. La température limite tolérée, qui est très proche de la température de synchronisation, correspondant à la valeur moyenne entre le minimum et le maximum de fluorescence observés. Avec le *Colpidium* nous avons déterminé la demi-mesure de l'épaule qui correspond à une température située entre 33,5° et 34°C.

D'après Robin HILL (communication personnelle), l'origine du phénomène de fluorescence et la détermination de la température limite n'ont pas encore reçu d'explication. Cet auteur a retrouvé grâce à cette technique la température de synchronisation de plusieurs souches de *Tetrahymena*.

2) ACTION DE CHOCS THERMIQUES SUR LA MULTIPLICATION DE *C. CAMPYLUM*

Nous avons appliqué des chocs thermiques selon la technique appliquée par ZEUTHEN (233, 234) pour synchroniser *Tetrahymena* et nous avons observé les effets obtenus sur la multiplication de *Colpidium*. Nous avons travaillé



BUS
LILLE

FIG. 14. Polarisation de fluorescence mesurée chez *C. campylum* et *T. pyriformis* G.L. en fonction de la température.

Fluorescence 285/340 nm avec $\lambda/2 = 9$ nm

Filtre interférentiel 288 nm et filtre additionnel Zeiss U.G.I.

Incrémentation de $t^\circ 2^\circ \text{C/mn}$

a) Spectre de *T. pyriformis* G.L.

b) Spectre de *C. campylum*

à 32,5°C (avant les analyses en fluorimétrie) puis à 33,5°C en utilisant différentes combinaisons de chocs et d'interchocs. Les résultats sont regroupés dans la fig. 15P.85. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la combinaison de 2 chocs à 33,5°C de 1 heure, séparés par 1 heure à 28°C. On observe alors 60 % de cellules divisées à la phase de plateau. Si l'on augmente le nombre de chocs afin d'obtenir une synchronisation semblable à celle obtenue chez *Tetrahymena* par ZEUTHEN (232), la culture est totalement bloquée. L'augmentation de l'espace interchoc diminue la qualité de la réponse. Nous avons également essayé la méthode de un choc par génération (234) ou un double choc, en fonction des résultats obtenus précédemment, mais ces essais n'ont donné aucun résultat.

Nos observations montrent que notre souche de *Colpidium campylum* possède des températures optimales et limites très proches de celles de *Tetrahymena pyriformis* G.L. Les premiers résultats obtenus en soumettant les cultures à des chocs thermiques montrent clairement que notre culture peut être synchronisée. Cette synchronisation présenterait un intérêt considérable pour la connaissance du cycle cellulaire de *Colpidium* et particulièrement pour l'étude précise de la morphogénèse et des cycles nucléaires. D'autre part, la durée du cycle (8 h) plus longue que celle de *Tetrahymena pyriformis* (3 h) permettrait d'en visualiser plus facilement certaines phases.

La durée de l'interchoc (1 h) semble être une limite supérieure. Il faut encore préciser les durées respectives et le nombre de chocs permettant d'obtenir les résultats les meilleurs possibles. Si la méthode multichoc

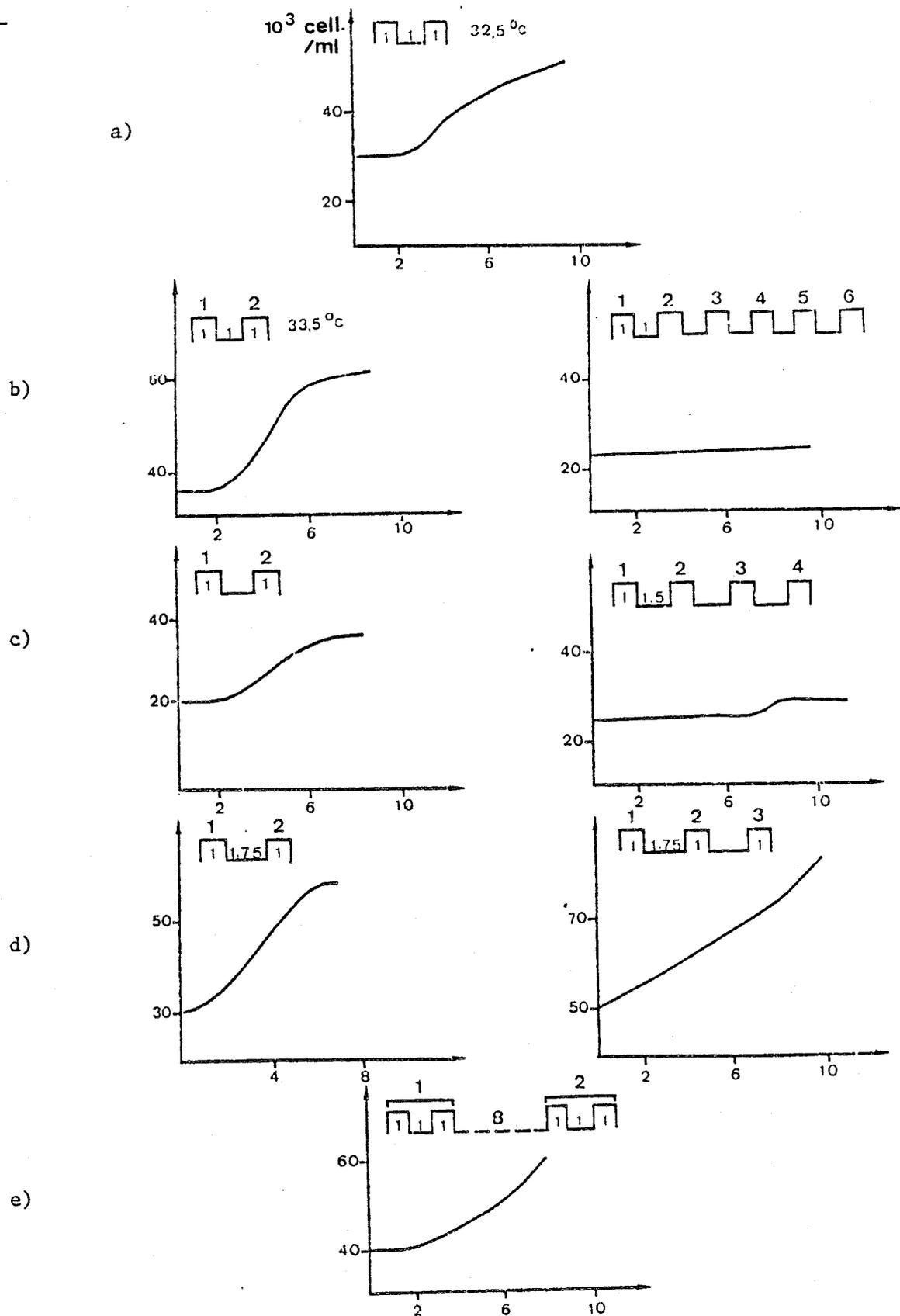


FIG. 15. Effets de chocs thermiques sur la multiplication de *C. campyllum*

- a) intervalle interchoc 1 H, t° choc 32°5
- b) t° choc 33°5 interchoc 1 H
- c) " interchoc 1 H 30
- d) " interchoc 1 H 45
- e) variante de la méthode 1 choc par génération en fonction des résultats de (b)

Tous les chocs durent 1 heure.

Les temps indiqués sur les figures correspondent au délai après la fin du traitement thermique.



semble accessible dans un avenir proche, la méthode un choc par génération (234) ne pourra être tentée qu'en fonction d'une meilleure connaissance du cycle de *Colpidium*, acquise par la méthode de synchronisation multichoc.

B - DISCUSSION

L'étude de la nutrition axénique de *Colpidium campylum* nous a permis, à partir des milieux que nous avons définis, de découvrir l'importance de différents éléments nutritifs sur la croissance de notre Cilié.

I - CROISSANCE EN MILIEU COMPLEXE

Dans le milieu complexe, nous avons amélioré de manière importante la croissance de *Colpidium*. Par rapport au milieu de référence à la caséine précipitée, nous obtenons un temps de génération deux fois plus court et une densité cellulaire finale au moins 5 fois plus grande. Le temps de génération obtenu (8 h) reste toutefois supérieur à celui observé sur des cultures monoxéniques (6 h). De même, la population finale ($2,5 \cdot 10^5$ cellules/ml) reste inférieure à celles obtenues avec *Tetrahymena* dans les mêmes milieux (10^6 cellules/ml). Ceci montre que les conditions optimales de croissance n'ont pas encore été déterminées totalement. Les cultures en milieu complexe nous ont apporté des renseignements sur l'influence des lipides sur la croissance de *C. campylum*.

1) INFLUENCE DES LIPIDES

Nos résultats montrent que, si les lipides ne sont pas indispensables à la croissance de *Colpidium*, ils jouent néanmoins un rôle très important. Nous avons d'ailleurs montré que cela était également vrai pour *Tetrahymena* (168).

Parmi tous les acides gras, l'acide oléique est le plus actif. Il est responsable de l'action stimulante de l'huile de maïs et du tween 80. Ajouté seul il est actif dans le milieu peptoné (PPYS) mais ne suffit pas à induire la croissance dans le milieu défini. L'addition d'albumine en forte concentration dans les milieux supprime son effet stimulant. La fraction d'acide gras qui contamine normalement l'albumine que nous avons utilisée est responsable en partie de son action stimulante sur le *Colpidium*.

Parmi tous les phospholipides testés au cours de notre étude la L- α -céphaline est la forme la plus active. L'asolectine, qui en contient 33 % produit une augmentation significative de la croissance dans les milieux peptonés. Les formes estérifiées de la L- α -céphaline sont peu actives. La L- α -céphaline et l'asolectine stimulent la croissance de *Glaucoma chattoni* (112), *Tetrahymena pyriformis* et *Tetrahymena paravorax* (168) alors que *T. thermophila* semble moins exigeant.

2/ INFLUENCE DES STEROLS

Le stigmastérol est le seul produit actif, surtout quand il est associé à des phospholipides. Ce n'est pas un facteur de croissance pour C.

campylum. Chez *Paramecium*, il faut respecter un équilibre entre la concentration de stigmastérol et celle des acides gras (226). Nous nous sommes placés, lors de nos travaux, dans les mêmes gammes de rapports, mais il se peut que nous soyons restés très éloignés du rapport optimal pour *Colpidium*. Ceci nécessitera des travaux complémentaires.

3) AUTRES FACTEURS DE CROISSANCE

Nos travaux n'ont pas confirmé l'effet stimulant de l'acide pimélique (90) ni celui de l'acide pantothénique (68) sur *C. campylum*. Des essais ont montré que l'absence de multiplication sur le milieu PPYS n'est pas due à une carence en fer, en cuivre et en acide folinique comme cela est le cas chez *Tetrahymena thermophila* (164, 167, 171, 172).

II - CROISSANCE EN MILIEU SEMI-SYNTHETIQUE

Le milieu semi-synthétique que nous avons mis au point présente des avantages incontestables par rapport à tous les milieux synthétiques déjà décrits pour la culture de *Colpidium*. Les temps de génération et la densité cellulaire obtenus sont tout-à-fait comparables à ceux enregistrés avec les milieux complexes. Les milieux synthétiques les plus perfectionnés décrits auparavant ne permettaient pas d'obtenir des cultures abondantes

(8000 cellules/ml) et les temps de génération étaient très longs (48 h). La présence d'albumine et d'asolectine ôte tout caractère synthétique au milieu du fait de la complexité de ces produits. Néanmoins, nous avons pu dégager quelques éléments importants de la nutrition axénique de *Colpidium*, et en particulier ses exigences probables en protides.

Si *C. campylum* ne se développe pas sur le milieu défini standard (MD), on ne peut conclure qu'il est incapable d'utiliser les acides aminés présents dans le milieu. En effet, en absence d'acides aminés, la croissance sur la seule albumine bovine est plus faible que dans le milieu complet enrichi en albumine. Ceci peut correspondre à plusieurs phénomènes :

- L'albumine ne pouvant entrer dans la cellule que par l'intermédiaire des vacuoles digestives, la libération d'acides aminés utilisables est limitée par la capacité d'endocytose et la croissance est ralentie.

- L'albumine peut être scindée en peptides par l'action d'enzymes extracellulaires, puis la digestion se poursuit soit dans les vacuoles digestives, soit au niveau de la membrane cellulaire où les oligopeptides sont hydrolysés comme chez divers *Tetrahymena* (232) acide aminé par acide aminé. Il est possible que des dipeptides puissent passer directement à l'intérieur de la cellule, comme l'a montré RASMUSSEN chez *T. thermophila* (174). Des expériences préliminaires nous ont montré que l'on pouvait déceler des activités peptidasiques dans le surnageant de centrifugation des cultures ; ces activités correspondent au découpage des protéines en peptides. Dans les homo-

TABLEAU 14. Composition, en L aminoacides, d'un milieu contenant, les acides aminés du milieu défini, 1 % d'albumine bovine, 1 % d'albumine bovine sans acide gras ou 0,75 % de protéose peptone.

	DM	Albumine bovine Fraction V 1 %	Albumine bovine sans acide gras	Protéose Peptone 0,75 %
Alanine	15	46	35	36
Arginine	30	34	26	28
Asparagine	20	-	-	-
Acide aspartique	-	88	77	46
Acide glutamique	40	138	110	77
Glutamine	10	-	-	-
Cystéine	-	35	31	trace
Glycine	40	14	10	55
Histidine	20	24	17	9
Isoleucine	20	10	6,4	9
Leucine	20	66	51	30
Lysine	20	77	59	22
Méthionine	15	13	9	13,5
Phénylalanine	15	44	35	20
Proline	20	31	25	37
Serine	15	31	23	24
Thréonine	20	29	23	18,0
Tryptophane	15	n.d.	n.d.	5,1 *
Tyrosine	-	65	47	24
Valine	20	22	18	12,5

* d'après le DIFCO MANUAL.



génats cellulaires bruts, nous avons au contraire mis en évidence une activité aminopeptidasique à l'aide de Leucine N nitranilide. Ces indications montrent que le schéma décrit ci-dessus est plausible car supporté par des activités enzymatiques correspondant à son fonctionnement ; il nous faudra, pour compléter notre hypothèse, montrer que les activités aminopeptidasiques sont situées au niveau de la membrane cellulaire. Le fonctionnement de ce schéma nutritionnel correspond également à une croissance plus lente car les acides aminés ne sont pas directement disponibles pour la cellule.

La troisième hypothèse suppose une possibilité pour le *Colpidium* d'utiliser les acides aminés libres. Cette conclusion est confortée par le fait que *Colpidium* se développe mieux en présence d'acides aminés et d'albumine qu'avec la protéine seule. Dans un tel schéma, les rôles de l'albumine sont multiples. Elle peut apporter des acides aminés absents et corriger un déséquilibre du milieu. Nous avons pu obtenir l'analyse quantitative de l'albumine bovine, de l'albumine sans acide gras et de la protéose-peptone. Ramenée en mg d'acide aminé pour 100 ml, la composition d'un milieu ne contenant que ces produits comme seule source de protides peut être comparée à celle du milieu défini standard (tableau 14). La tyrosine, par exemple est le 4ème acide aminé le plus abondant dans l'albumine après l'acide glutamique, l'acide aspartique et la leucine. L'exigence possible de *Colpidium* pour la tyrosine ne constitue pas une exception car on la connaît chez *Paramecium aurelia* et, dans certaines conditions de culture, chez *Tetrahymena thermophila* (226, 231). La cystéine, qui constitue 3,5 % de l'albumine est absente du

milieu synthétique, mais aussi de la protéose peptone. Si le *Colpidium* est exigeant en tyrosine et en cystéine, il est possible qu'il ne possède pas de système de transport pour l'un ou les deux amino-acides, car leur addition dans le milieu défini n'induit pas la multiplication, tout comme l'ajout de tyrosyl glycine.

Toutefois, nous ne pensons pas que la tyrosine et la cystéine serait utilisées exclusivement sous forme intégrée dans des peptides ou des protéines ces deux amino-acides exercent en effet une action stimulatrice très puissante quand ils sont ajoutés dans un milieu défini additionné d'albumine et d'asolécithine.

Outre son rôle correcteur dans la nutrition protéique, aspect que nous avons déjà examiné en détail, ou la présence d'impuretés lipidiques stimulantes, l'albumine bovine apparaît avant tout comme un transporteur et un ligand. Le transport couvre probablement certains amino-acides, des lipides et, peut être, certains agents vitaminiques. L'action détoxifiante et complexante de l'albumine vis-à-vis des métaux (fer) a été clairement montrée chez *Tetrahymena thermophila* (RASMUSSEN, HILL, communications personnelles). Elle peut faciliter la pénétration des métaux dans la cellule via les vacuoles digestives si le transport membranaire n'est pas possible. Enfin, nous pensons que l'un des rôles essentiels de l'albumine dans les cultures de *C. campylum* est de stimuler la formation des vacuoles digestives. On connaît en effet le rôle important des particules dans le déclenchement de l'endocytose. Dans le milieu peptoné, il existe un précipité très fin essentiellement dû à la décomposition de $FeCl_3$ durant la stérilisation.

Le milieu défini est stérilisé par filtration et ne contient donc qu'un nombre très réduit de particules. *Colpidium*, placé dans un tel milieu ne présente aucune activité phagotrophique. Si l'on ajoute de l'albumine stérilisée par filtration, les *Colpidium* forment alors de nombreuses vacuoles digestives. Si ces vacuoles sont incapables d'assurer à elles seules l'apport alimentaire nécessaire à la multiplication cellulaire, elles sont certainement la voie essentielle de pénétration de certains aliments indispensables comme cela a été montré chez *T. thermophila* (164, 171, 172). Nous interpréterons de la même façon une partie du rôle des lipides, en particulier de l'acide oléique, du tween 80 et de l'asolectine, qui ne constituent pas dans les milieux des solutions vraies mais des microparticules ou des micelles (112). Indépendamment de leur valeur nutritive, ces produits vont activer leur propre endocytose par *Colpidium* ; leur rôle serait donc double. LILLY et STILWELL ont montré que *C. campylum* pouvait se multiplier dans un milieu totalement synthétique si l'on y ajoutait un produit microparticulaire possédant des propriétés adsorbantes (Celkate). Un tel milieu présente l'inconvénient de renfermer trop de particules en suspension, produit dont il faut ensuite se débarrasser avant toute étude physiologique ou biochimique. C'est pourquoi nous préférons utiliser les deux milieux que nous avons mis au point, qui présentent l'avantage complémentaire de fournir des cultures très abondantes.

III - CONCLUSIONS

Les exigences nutritives de *C. campylum* diffèrent profondément de celles de *Tetrahymena*. Par ses besoins probables en tyrosine et en lipides,

C. campylum se rapprocherait plutôt de *P. aurelia*. La culture de *C. campylum* en milieu synthétique nécessite le passage préalable aux connaissances suivantes :

- étude des systèmes de transport des amino-acides et des peptides existant chez ce cilié et conditionnant une nutrition par voie membranaire ;
- détermination des facteurs de croissance dont la pénétration par voie orale est obligatoire ;
- étude approfondie des besoins en lipides.

L'obtention de mutants analogues à ceux obtenus avec *T. thermophila* serait très utile pour la réalisation de telles études. Elle éviterait en effet l'emploi de drogues bloquant l'endocytose, mais dont les effets au niveau des transports membranaires sont très mal connus (cytochalasine B). Toutefois, la culture d'une telle souche apparaît problématique dans les conditions d'expression de la mutation, compte-tenu de nos connaissances actuelles.

Nos travaux nous ont permis d'élaborer des milieux de culture efficaces et de mettre en évidence une partie des exigences nutritives de *C. campylum*. Les orientations nécessaires pour résoudre les problèmes subsistant pour sa culture en milieu synthétique ont pu être également définies.

CHAPITRE II

NUTRITION HOLOZOIQUE DE *COLPIDIUM CAMPYLUM*

Nous avons examiné la nutrition holozoïque de *C. campylum* sous deux angles différents.

- Un aspect quantitatif : il s'agissait d'étudier l'influence de la concentration bactérienne sur la croissance de *Colpidium campylum*. Ce travail a été complété par des études réalisées sur des modèles particulières en polystyrène.

- Un aspect qualitatif : nous voulions connaître la valeur nutritive de différentes bactéries pour *Colpidium campylum*, afin d'analyser les différents types d'interactions existant entre les bactéries et notre Protozoaire. Ces travaux devaient nous permettre d'appréhender le comportement et le rôle possible de *Colpidium* dans les milieux naturels.

A - ETUDE QUANTITATIVE DE LA NUTRITION HOLOZOIQUE

I - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE SUR LA CROISSANCE DE *C. CAMPYLUM*

Cette étude s'est limitée strictement à la phase de latence et au début de la phase exponentielle de croissance.

1) PRINCIPE EXPERIMENTAL

Nous avons utilisé des cultures de *Colpidium* âgées de 5 jours soit dans un état de jeûne complet. Les bactéries utilisées (*E. coli*) ont été préparées classiquement et lavées trois fois dans le milieu minéral. Les Ciliés et les bactéries ont été ensuite ajoutés dans les flacons d'expérience de façon à obtenir respectivement $1,5-2 \cdot 10^3$ Protozoaires/ml et de 10^5 à 10^9 bactéries/ml, un témoin sans microorganisme étant réalisé parallèlement. Des prélèvements ont été effectués toutes les deux heures pendant les douze premières heures afin de dénombrer les Ciliés, de mesurer leur volume moyen et leur distribution, et de calculer le biovolume total de la population. Ces mesures ont été réalisées à l'aide du Coulter Counter et de l'analyseur P 64 - XY comme décrit dans les méthodes générales, (annexe III p. 253)

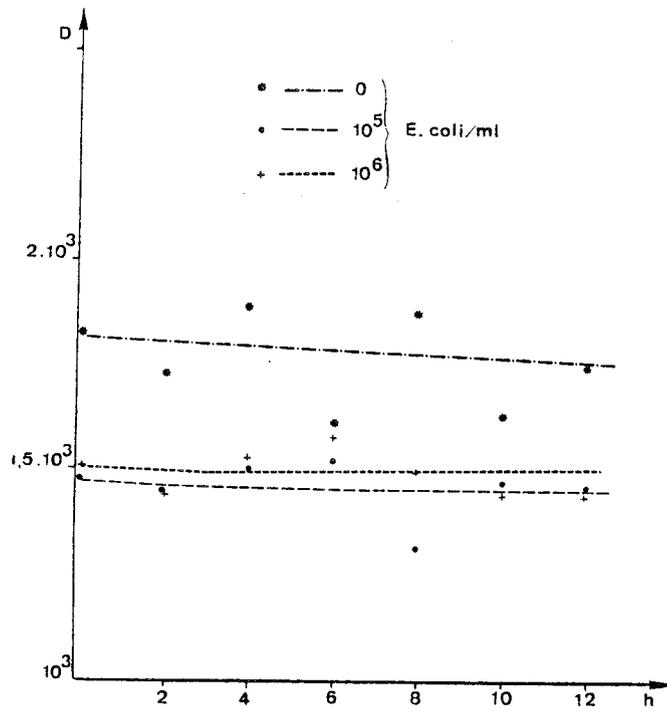
2) RESULTATS

a) Evolution des populations : (fig. 16 P. 98)

Pour les concentrations en bactéries les plus basses (figure 16 a) aucune multiplication n'a été observée. A partir de 10^7 bactéries/ml (figure 16 b) on observe un début de multiplication. Au delà, la croissance des Ciliés est très nette, avec un minimum de la latence observé pour 10^8 bactéries/ml.

Dans le témoin, la densité initiale de Ciliés était plus élevée mais cela n'a pas entraîné de discordance apparente dans les résultats.

a)



b)

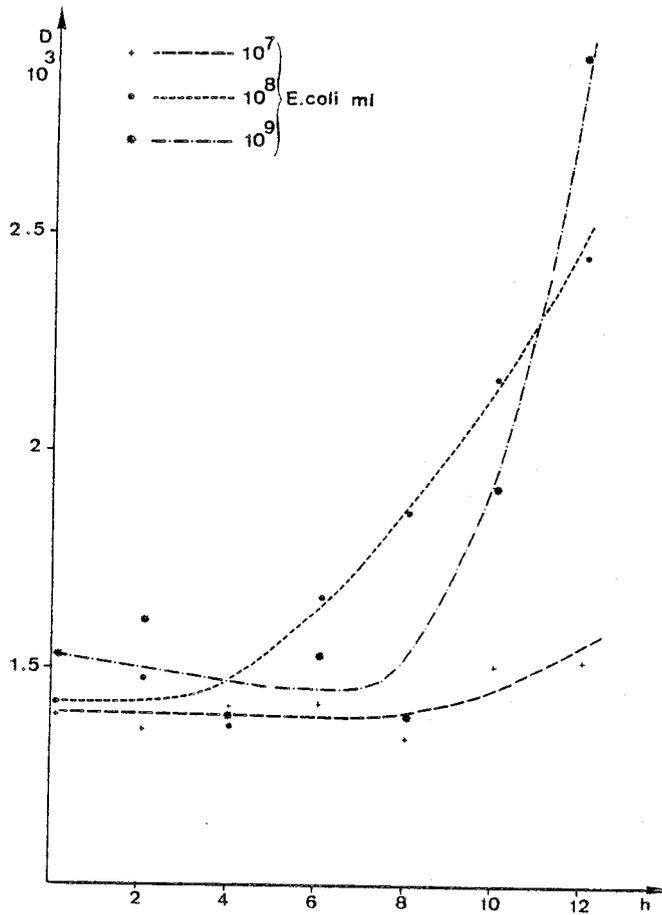


FIG. 16. Influence de la concentration en nourriture sur la phase de latence et la multiplication de *C. campyllum*.

b) Evolution du volume individuel des ciliés (fig.17 à 19 P.100-101)

Sur la figure 17 sont représentés les enregistrements de la distribution de population de *Colpidium campylum* entre 0 et 6 heures en présence de 10^9 bactéries initiales par ml. Cette figure montre très nettement la variation de dispersion de la population mais aussi l'évolution de la taille des cellules.

La figure 18 montre l'évolution du volume moyen cellulaire en fonction de la concentration initiale en substrat. *Colpidium* subit de fortes variations de volume pendant la phase de latence, en particulier avec des concentrations en microorganismes supérieures à 10^7 cellules/ml. L'amplitude et la durée du grossissement des Ciliés augmentent avec la quantité de bactéries apportées. Le volume moyen maximum est atteint à la fin de la phase de latence ; il diminue ensuite au fur et à mesure de l'accélération de la multiplication.

Sur la figure 19 a été représentées les variations de distribution des populations de *Colpidium* en fonction du temps et de la quantité initiale de substrat. A partir d'une population initiale homogène, aucun changement n'est observé jusque 10^6 *E. coli*/ml. En présence de 10^7 bactéries/ml, une diminution très nette de la classe de volume la plus petite est observée pendant les 4 premières heures. Avec 10^8 *E. coli*/ml, la classe modale est déplacée et la dispersion augmente. Après 12 heures de culture, la distribution est redevenue très proche de celle ob-

AUS
LILLE

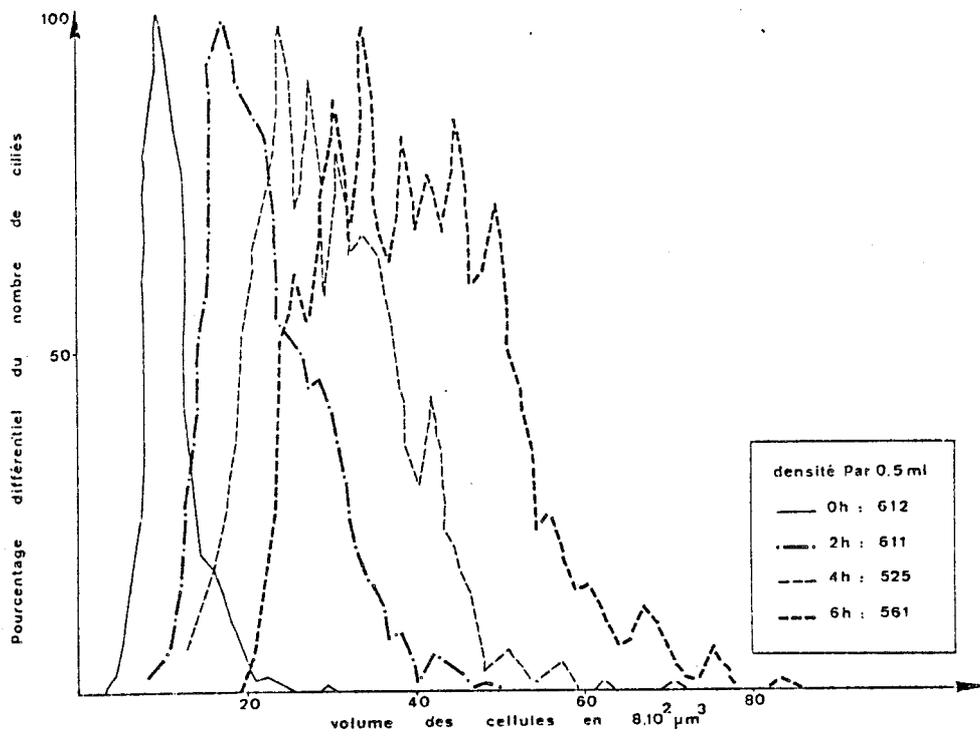


FIG. 17 - Distribution en volume de la population de *C. campylyum* pendant les 6 premières heures de culture en présence de 10^9 *E. coli*/ml (Enregistrements directs avec l'analyseur r 64 XY)

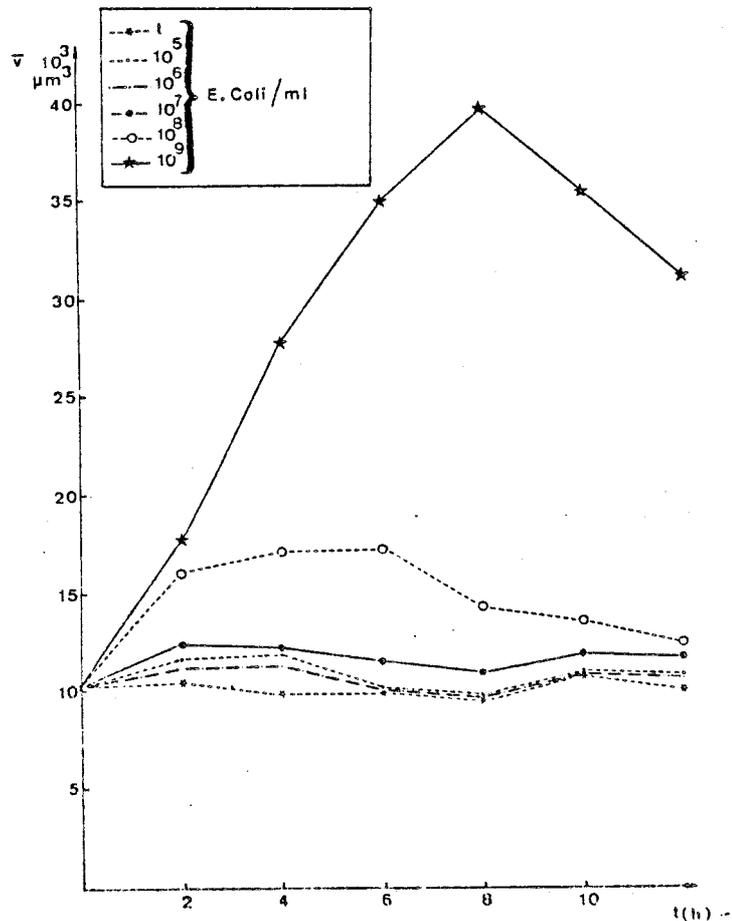


FIG. 18 - Evolution du volume moyen cellulaire en fonction de la concentration en *E. coli*



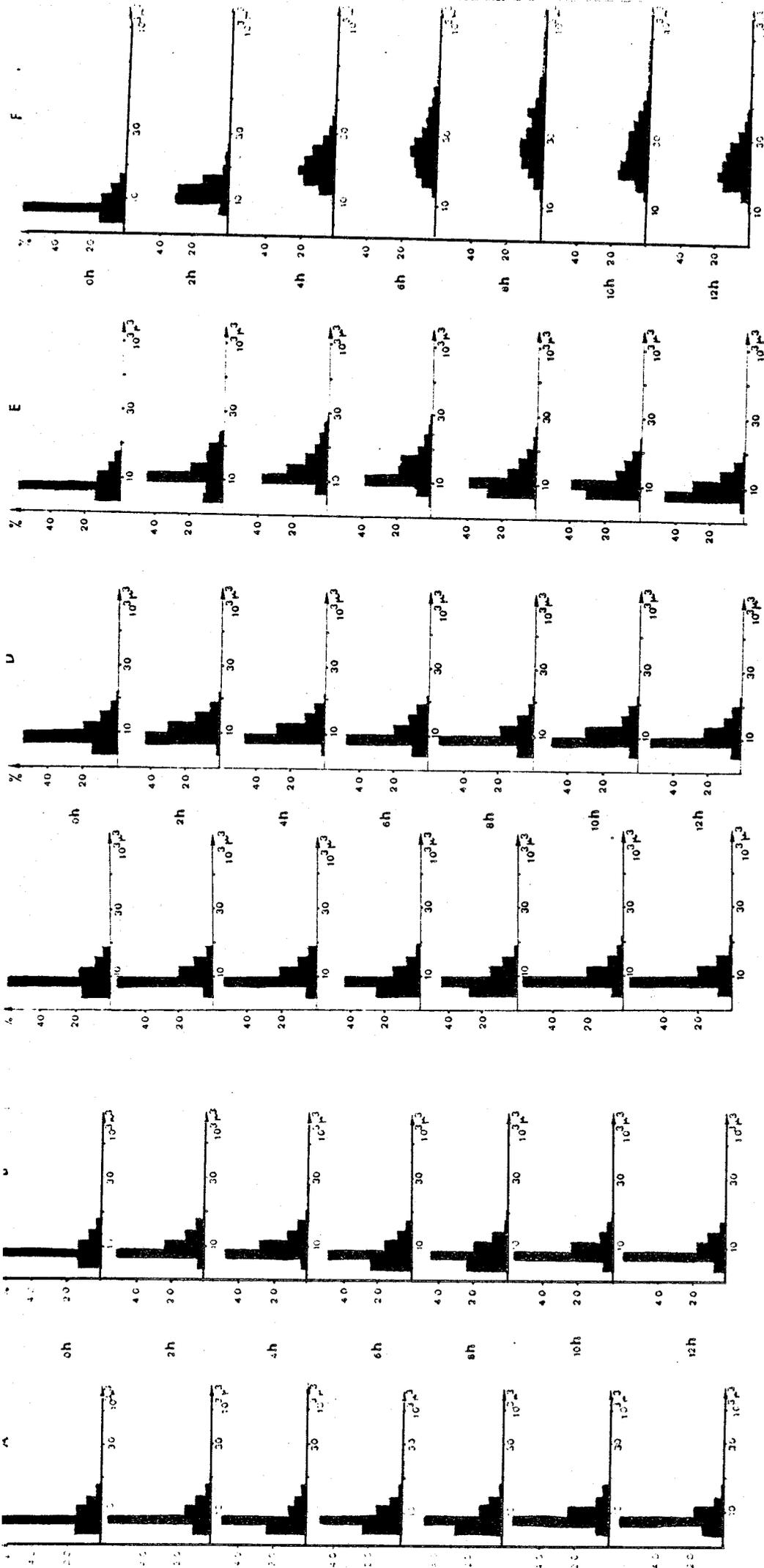


FIG. 19. Histogrammes de distribution des volumes cellulaires en fonction du temps et de la concentration en bactéries.

A 0 bact./ml , B 10⁵ bact./ml, C 10⁶ bact./ml
D 10⁷ bact./ml E 10⁸ bact./ml. F 10⁹ bact./ml



servée initialement. Avec la plus forte concentration en substrat utilisée, la dispersion est maximale à la 8ème heure. Les individus de petite taille ne proviennent pas d'un processus de division car il n'y a pas encore augmentation de la population totale. Au moment où la culture est dans sa phase exponentielle de croissance la dispersion diminue. A aucun moment, il n'a été possible de percevoir les premières cellules filles et les plus grosses cellules sous forme d'une distribution bimodale.

c) Variation du biovolume total (figure 20) :

Les biovolumes totaux ne subissent pratiquement aucune variation jusque 10^7 *E. coli*/ml. Le volume augmente pour se stabiliser rapidement en présence de 10^8 bactéries/ml. Avec la plus forte concentration en substrat, le biovolume total croît d'abord régulièrement, se stabilise entre la 6ème et la 8ème heure puis la croissance reprend avec une vitesse plus élevée que pendant les 6 premières heures de culture.

II - ACTIVITE PHAGOTROPHIQUE DE *COLPIDIUM CAMPYLUM* ET DE *TETRAHYMENA* EN
PRESENCE DE PARTICULES NON NUTRITIVES

Nous avons étudié, avec *Colpidium campylum* mais aussi avec trois souches de *Tetrahymena* l'influence, sur le rythme d'endocytose, de la taille et de l'abondance de particules de polystyrène utilisées pures ou en mélange.

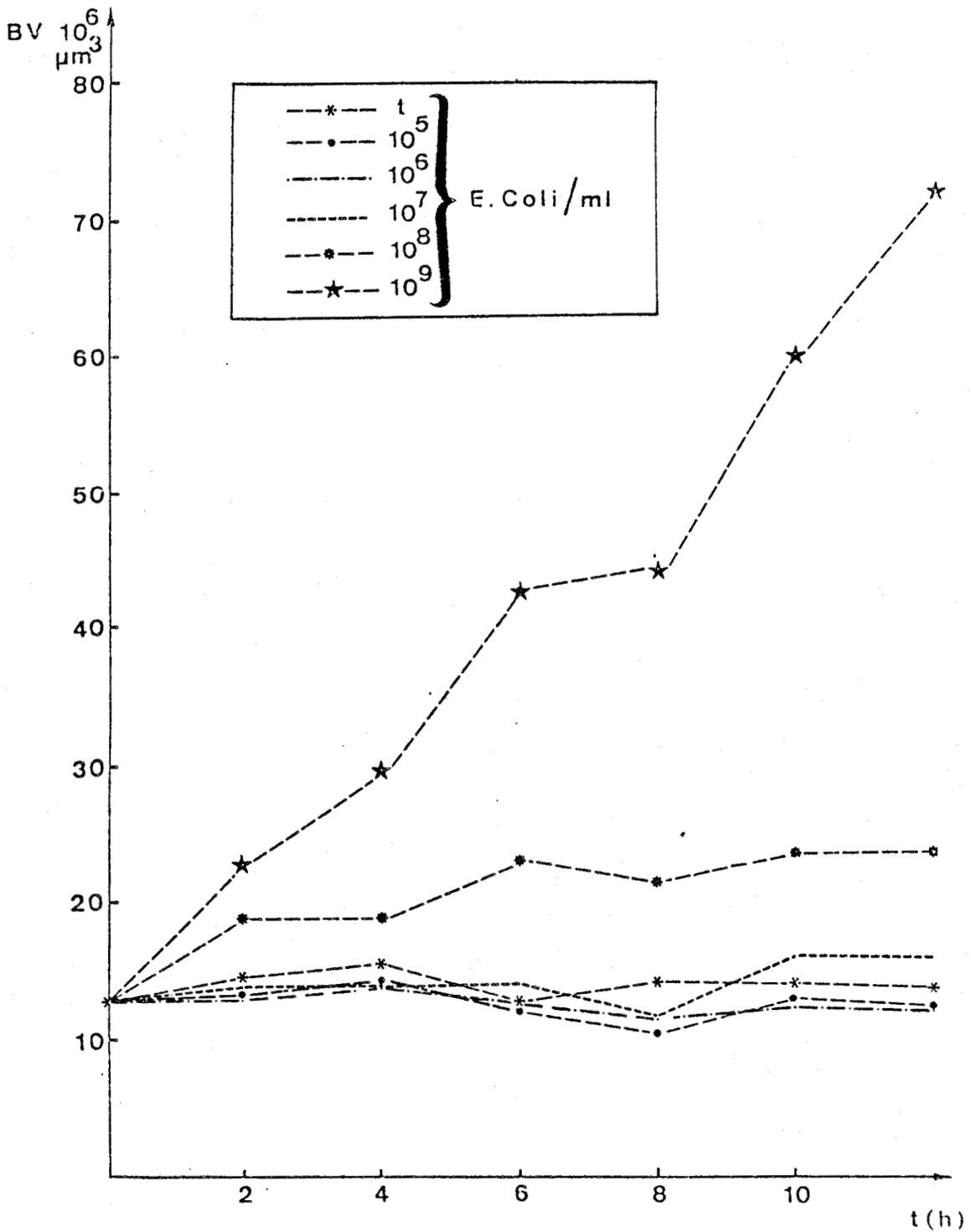


FIG. 20. Evolution du biovolume total de la population de *C. campyllum* en fonction de la concentration en *E. coli*



1) PRINCIPE EXPERIMENTAL

Nous avons utilisé des particules de polystyrène calibrées (DOW Chemical). Des cultures axéniques de *Colpidium campylum*, de *Tetrahymena pyriformis* G.L. et de *Tetrahymena thermophila* souches DN3 et NP1 contenant entre 25 et 50.000 cellules par ml ont été traitées par des suspensions de latex (2 % v/v) de façon à obtenir $4,4 \cdot 10^8$ particules/ml de culture. Au bout de 10 minutes de contact, on fixe les cellules par la glutaraldéhyde à 2 %, on dénombre le nombre total de vacuoles digestives formées dans 50 cellules, et on calcule la moyenne.

2) ACTION PHAGOTROPHIQUE SUR DES SUSPENSIONS MONODIMENSIONNELLES

Le tableau 15 montre le nombre moyen de vacuoles formées par cellule en 10 minutes en fonction de la dimension des particules.

L'activité phagotrophique de *Colpidium campylum* est très influencée par la taille des particules présentes dans le milieu. La vitesse de formation des vacuoles digestives décroît en effet très rapidement avec la taille et les particules de $0,2 \mu$ ne sont que peu ou pas ingérées. Chez *Tetrahymena pyriformis* G.L., l'optimum de la phagotrophie se situe également à $1,1 \mu$ et diminue avec la taille des particules. Chez *Tetrahymena thermophila*, l'endocytose est aussi active sur les particules de $1,1 \mu$ et $0,356 \mu$; elle reste encore substantielle avec les plus petites particules. On peut

TABLEAU 15. Influence du diamètre des particules sur le nombre de vacuoles digestives formées en 10 minutes.

		<i>Tetrahymena pyriformis</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>		<i>Colpidium campylum</i>
			DN ₃	NP ₁	
1,1 μ	\bar{X}	3,64	3,46	3,33	4,1
	S	0,73	1,6	0,59	1,53
	n	6	4	4	6
0,356 μ	\bar{X}	2,3	3,67	3,14	2,64
	S	1,2	0,58	1,01	0,67
	n	4	4	4	4
0,2 μ	\bar{X}	0,83	2,63	1,85	0,42
	S	0,59	1,01	0,39	0,29
	n	5	4	4	6

\bar{X} : moyenne ; S : écart type ; n : nombre d'expériences



également remarquer la grande dispersion des résultats autour de la moyenne. En effet, des différences de comportement notables ont été observées avec des cellules de même âge et des densités de culture très similaires.

3) ACTIVITE PHAGOTROPHIQUE SUR DES MELANGES MULTIDIMENSIONNELS

Dans un premier temps, nous avons réalisé trois mélanges de particules (nombre total d'éléments figurés $4,4 \cdot 10^8$ /ml). La composition des trois mélanges et le diamètre moyen sont indiqués dans le tableau 16. Les résultats (figure 21) montrent que l'activité phagotrophique de *C. campylum* diminue légèrement avec le volume moyen de la suspension testée, l'effet restant très inférieur à celui observé avec des suspensions monodimensionnelles. Les différences sont encore plus faibles avec *Tetrahymena pyriformis* et deviennent inexistantes avec *T. thermophila*. Tout en confirmant les résultats obtenus avec des mélanges monodimensionnels, cette expérience indique qu'une proportion faible de grosses particules stimule fortement l'endocytose. Nous avons cherché à préciser ces résultats chez *C. campylum* et *T. pyriformis* avec des mélanges de particules de $1,1 \mu$ et $0,356 \mu$ (nombre total de particules $4,4 \cdot 10^8$ /ml). Les deux Ciliés montrent une activité phagotrophique maximale (figure 22) dès que le mélange contient 20 % soit $88 \cdot 10^6$ particules de $1,1 \mu$ /ml. La quantité de particules influence donc manifestement l'activité phagotrophique des Ciliés. Nous avons donc réalisé une étude quantitative du phénomène.

TABLEAU 16. Composition de différents mélanges de latex étudiés.

Mélange	1,1 μ	0,356 μ	0,2 μ
A	50	25	25
B	25	50	25
C	25	25	50

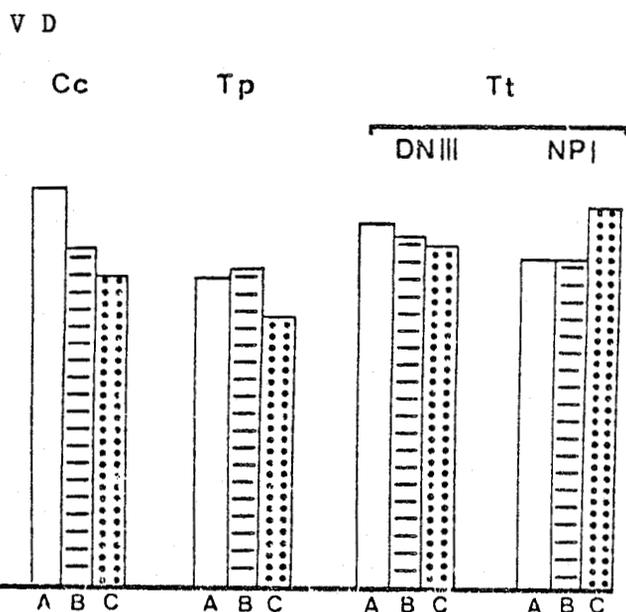
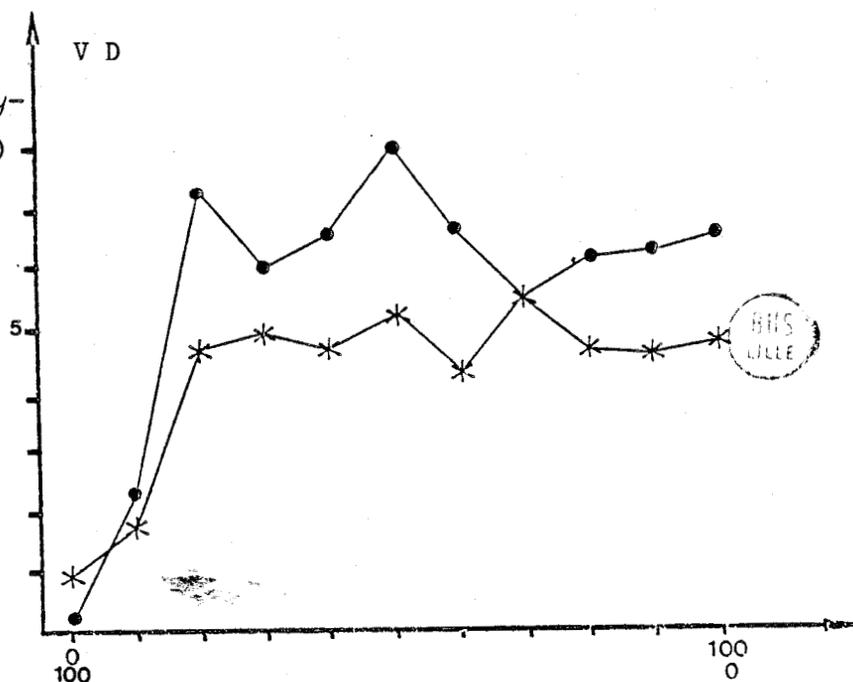
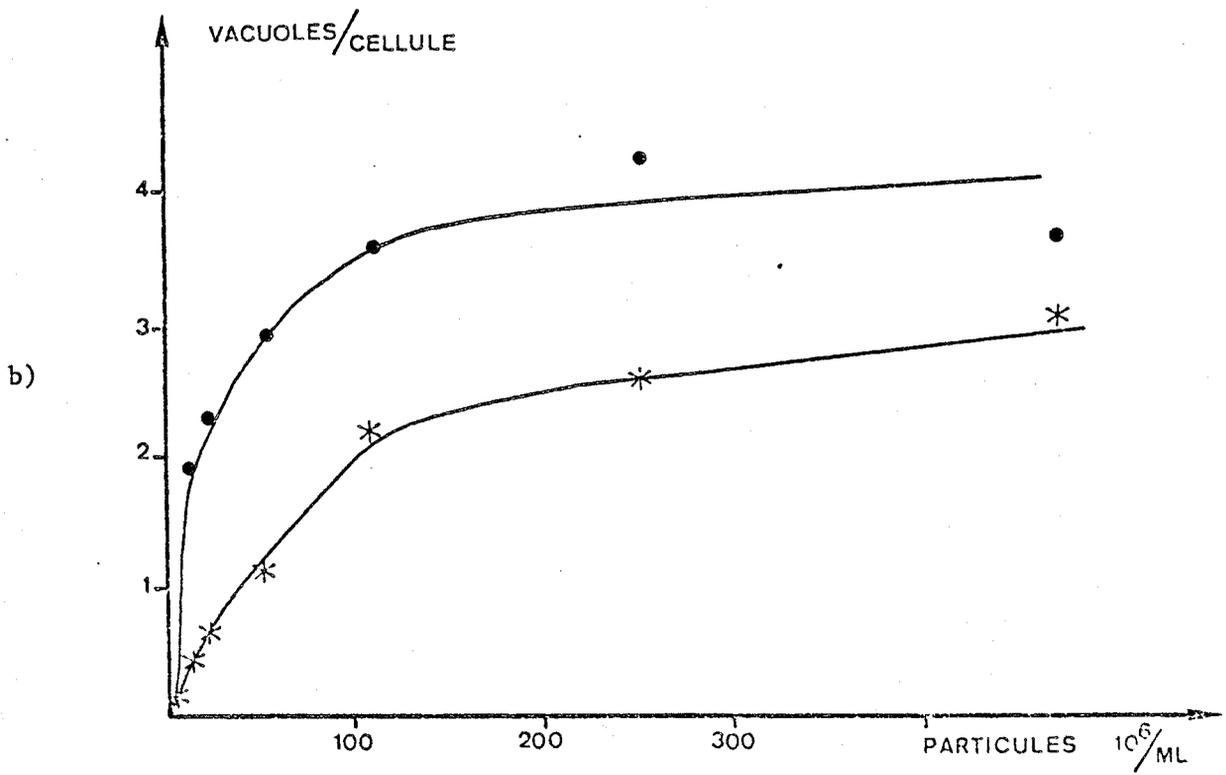
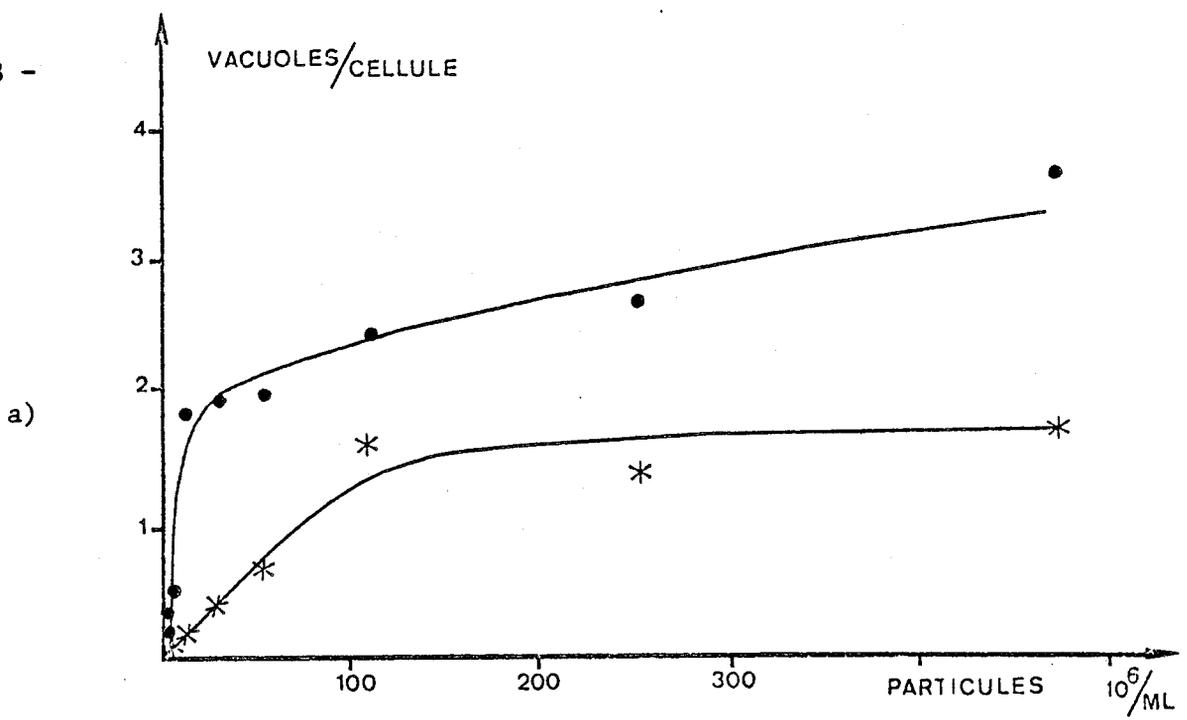


FIG. 21 Nombre de vacuoles digestives formées en 10 mn par *C. campylum* (Cc) *T. pyriformis* G.L. (Tp) et *T. thermophila* (Tt) sur les mélanges de particules définis dans le tableau 16

FIG. 22 Nombre de vacuoles digestives formées en 10 mn par *C. campylum* (●) et *T. pyriformis* (*) sur un mélange bidimensionnel (latex de 0,356 et 1,1 μ). En abscisse la rangée supérieure indique le % de particules de 1,1 μ , la rangée inférieure le % de particules de 0,356 μ





F. 23. Nombre de vacuoles digestives formées en 10 mn en fonction de la concentration en latex :

- a) par *C. campyllum*
- b) par *T. pyriformis*

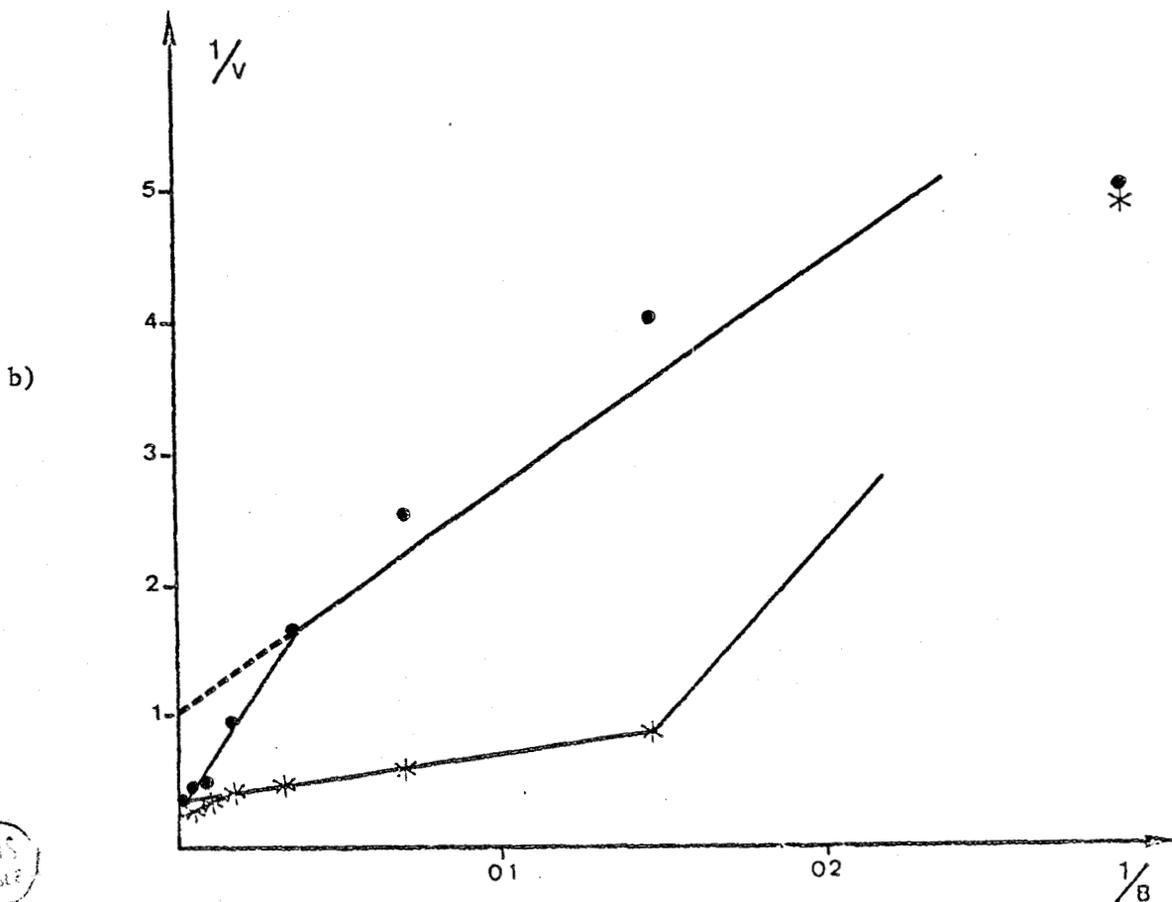
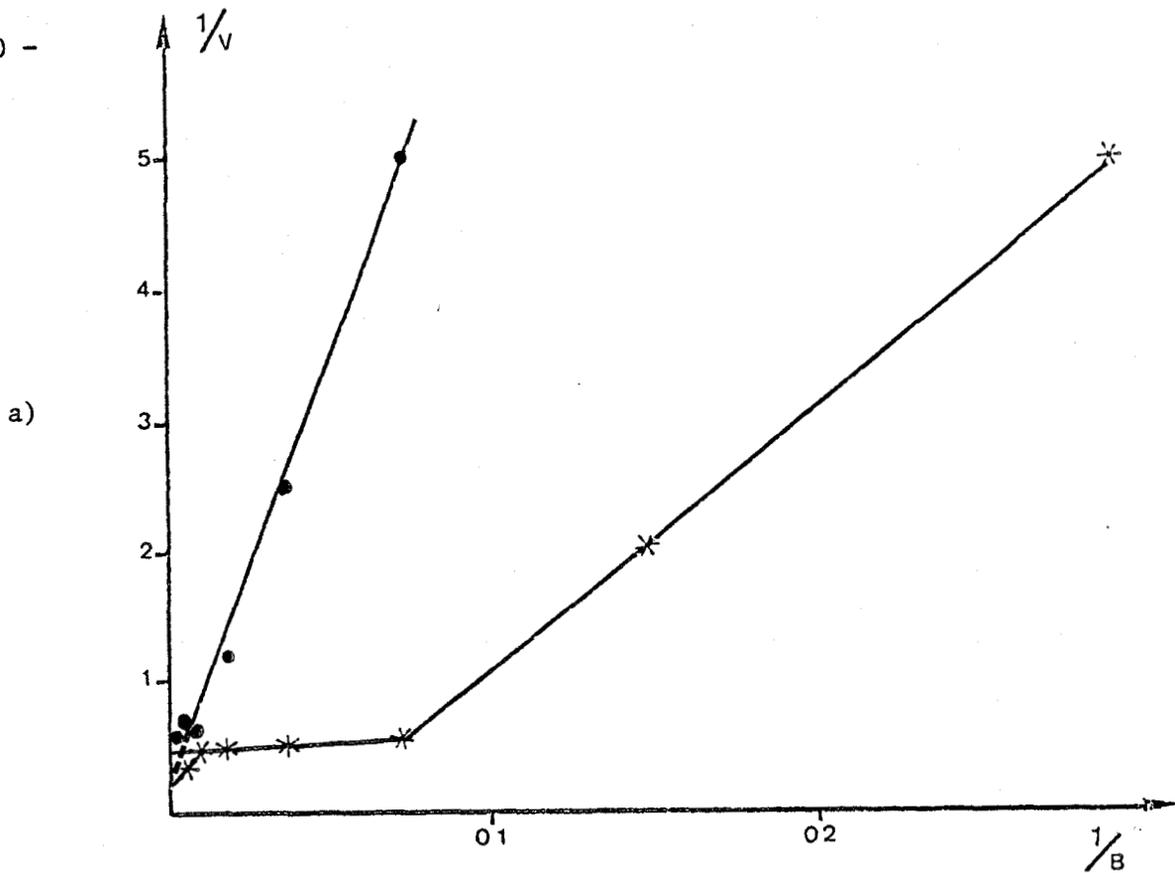
● : latex de 1,1 μm
* : latex de 0,356



4) INFLUENCE DU NOMBRE DE PARTICULES SUR L'ACTIVITE PHAGOTROPHIQUE

Nous avons étudié le nombre de vacuoles digestives formées en 10 minutes par *C. campylum* (figure 23 a) et *T. pyriformis* G.L. (figure 23 b) en présence de concentrations variables de latex de 0,356 et 1,1 μ . L'aspect des courbes de réponse semble, à première vue, de type Michaelien, et analogue à celui décrit par FENCHEL (73) pour exprimer la quantité de latex ingéré en fonction de sa concentration dans le milieu. Mais la transformation inverse selon LINEWEAVER et BURKE montre que les phénomènes sont en réalité plus complexes. L'analyse de l'activité phagotrophique de *Colpidium* sur les particules de 1,1 μ (fig.24a-p.110) révèle qu'en dessous d'une concentration en perles de latex de $13 \cdot 10^6$ /ml, la vitesse de formation des vacuoles chute très rapidement au dessous de 0,5/10 minutes. Entre 13 et $100 \cdot 10^6$ billes de latex/ml, la vitesse maximale de formation des vacuoles s'établit autour de 2 pour 10 minutes ; pour des concentrations plus élevées, la vitesse maximale augmente brusquement pour atteindre 4/10 mn. En présence de latex de 0,356 μ , il faut au moins 10^8 particules/ml pour induire une phagotrophie dont la vitesse maximale est de 1,6 vacuole/10 mn. Au dessous de cette concentration, la vitesse chute très rapidement.

Avec *Tetrahymena pyriformis* G.L. (figure 24 b) on observe les mêmes phénomènes qu'avec *Colpidium* en présence de latex de 1,1 μ . Seuls les seuils changent. Le seuil inférieur s'établit à $7 \cdot 10^6$ particules/ml et la vitesse de formation double au dessus de $55 \cdot 10^6$ particules/ml.



ANS
LIBRE

FIG. 24. Transformation selon Lineweaver et Burke des courbes des fig. 23 a et b
 $1/V$: Inverse du nombre de vacuoles digestives formées en 10 mn
 $1/B$: Inverse du nombre de particules de polystyrène présentes dans le milieu

- a) *Colpidium campylum*
- b) *Tetrahymena pyriformis*

● : Particules de 1,1 μm
 * : Particules de 0,356 μm

Avec des particules de $0,356 \mu$, aisément absorbées par *Tetrahymena*, la zone de rupture s'établit autour de 13.10^6 particules/ml où on passe de 0,65 à 3,3 vacuoles/10 minutes.

B - ETUDE QUALITATIVE DE LA NUTRITION BACTERIENNE DE

COLPIDIUM CAMPYLUM

I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A partir de cultures de *Colpidium campylum* de 72 à 96 heures et de bactéries lavées, on inocule des flacons contenant du milieu minéral stérile de manière à obtenir 5.10^8 bactéries/ml et 10^3 ciliés/ml pour un volume final de 100 ml, chaque expérience étant réalisée en triple exemplaire. Les flacons sont incubés à l'obscurité à 20°C et des prélèvements biquotidiens sont effectués aux fins de numération. Seule la population moyenne calculée à partir des trois répliques est prise en considération. La croissance totale de *Colpidium campylum* a été mesurée par rapport à un témoin où la bactérie est *Enterobacter cloacae*. On calcule le rapport entre la population atteinte à la phase stationnaire (D_{max}) et la population initiale (D_0). L'expression de la croissance en présence d'une bactérie déterminée ($R_b = D_{\text{max}} / D_0$) est comparée à celle obtenue dans le témoin (R_t) par le calcul $(R_b / R_t) \times 100$. Ce rapport exprime la valeur nutritive de la bactérie envisagée, celle du témoin étant fixée arbitrairement à 100.

FIG. 25.

Croissance de *C. campylum* en présence de 4 souches bactériennes

- (1) *Enterobacter cloacae*
- (2) *Salmonella typhi murium*
- (3) *Streptococcus faecalis*
- (4) *Bacillus cereus*

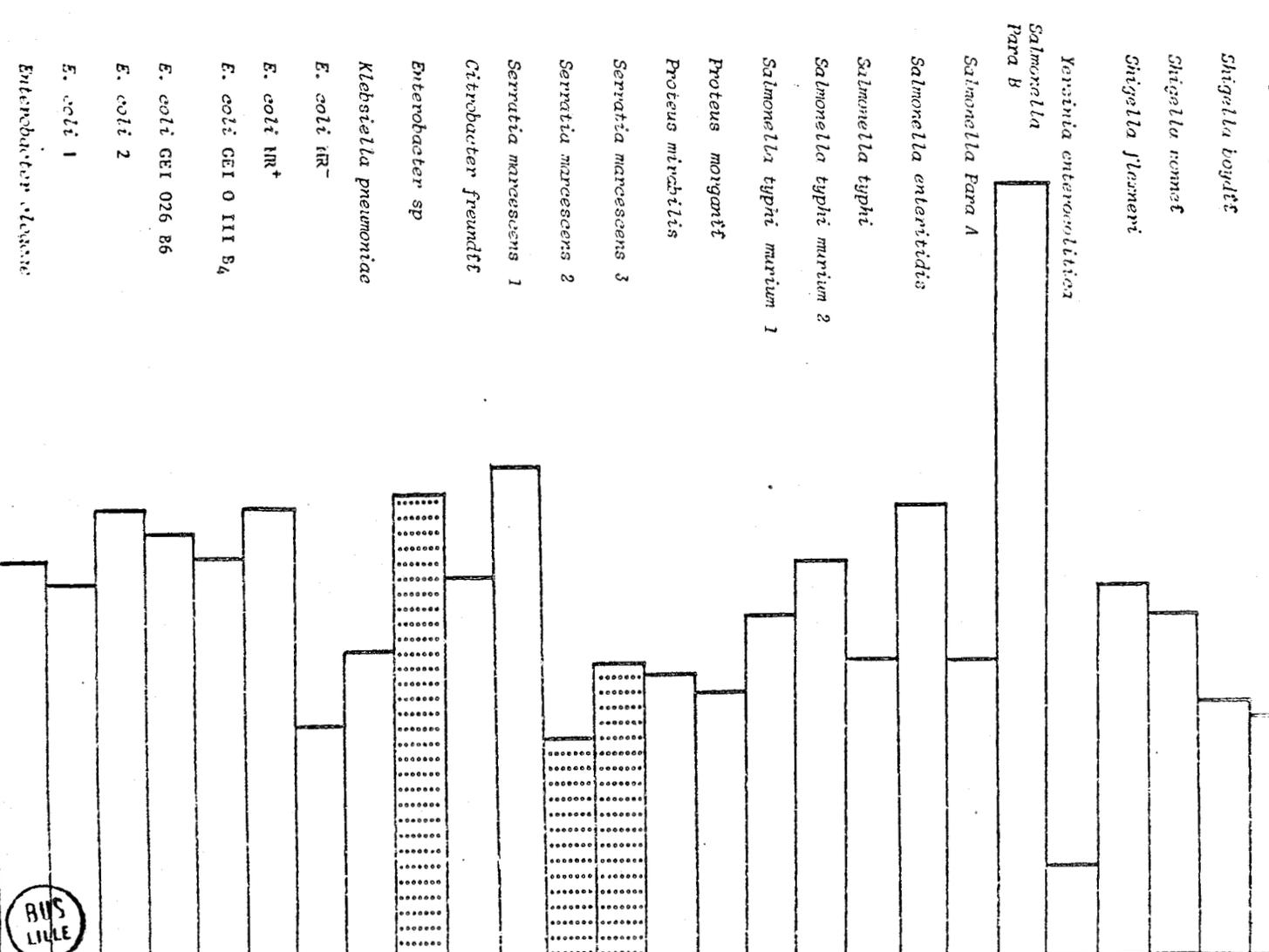
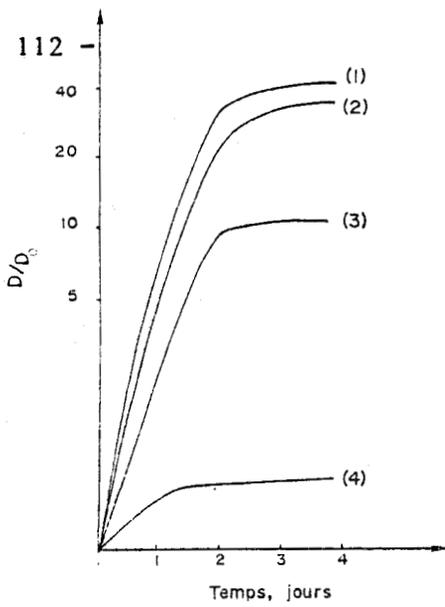


FIG. 26. Valeur nutritive de différentes Enterobacteries par rapport à *Enterobacter cloacae*. Les caractéristiques des souches sont indiquées en annexe II. Les colonnes pointillées indiquent les bactéries pigmentées.

II - RESULTATS GENERAUX

Dans la figure 25, nous avons représenté les courbes de croissance types de *Colpidium campylum* aux dépens de quelques espèces bactériennes. Le maximum de croissance, aboutissant à un palier, est atteint en 3 à 4 jours. La vitesse de multiplication apparaît peu variable quand les bactéries ont des valeurs nutritives similaires ; en revanche, quand le substrat n'est pas favorable, la croissance est plus lente (*Streptococcus faecalis*) et peut même s'arrêter très précocement (*Bacillus cereus*).

Les figures 26, 27 et 28 représentent respectivement les valeurs nutritives obtenues avec les *Enterobacteriaceae*, les autres bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif. Elles appellent un certain nombre de commentaires.

- Enterobacteriaceae (figure 26)

Les *Escherichia coli* constituent en général une excellente nourriture pour *Colpidium campylum*. Une seule souche sur 6 testées nous a donné un résultat moyen. Ces données sont en accord avec celles obtenues avec d'autres Ciliés et avec les amibes. Des cas de toxicité ayant été signalés vis-à-vis de *Colpidium* et *Glaucoma* (36, 38), il ne faut pas s'étonner que l'une de nos souches ait donné un résultat médiocre.

Les valeurs nutritives de *Citrobacter*, *Klebsiella* et *Enterobacter* sont très proches de celles du témoin, *Klebsiella pneumoniae* étant la moins favorable. *Enterobacter aerogenes* est l'espèce la plus couramment utilisée

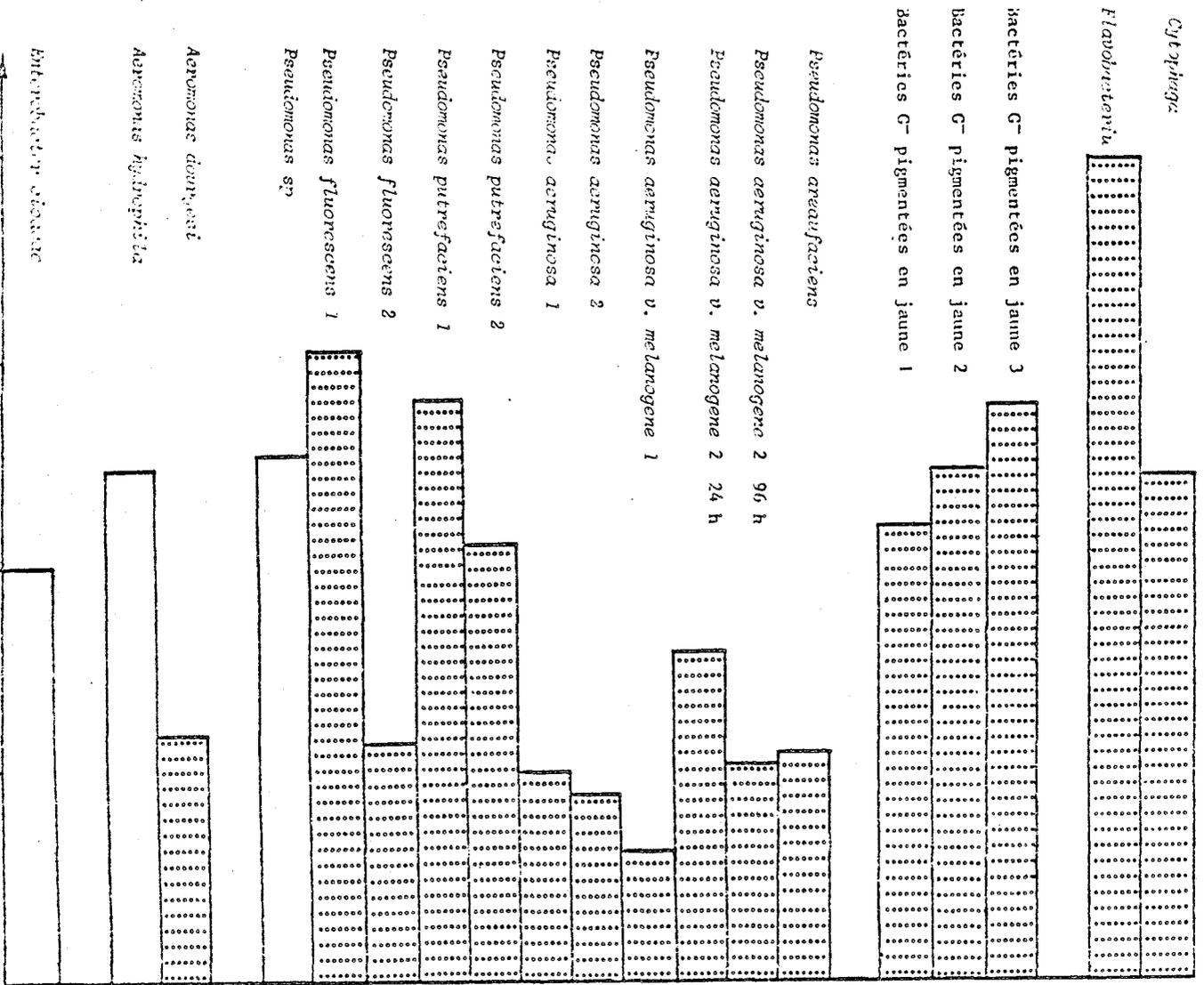


FIG. 27. Valeur nutritive de bactéries Gram⁻ autres que les Enterobactéries par rapport à *Enterobacter cloacae*.
Les colonnes pointillées indiquent les bactéries pigmentées.



*

pour la culture des Protozoaires. Elle se distingue essentiellement de *K. pneumoniae* par l'absence de capsule et par sa mobilité. L'*Enterobacter* pigmenté que nous avons testé constitue un excellent substrat. Nous avons constaté par ailleurs que l'on pourrait cultiver aisément *Hartmannella vermiformis* sur cette même souche.

Une nette différence a été observée entre les *Serratia* non pigmentés et celles produisant de la prodigiosine.

La valeur nutritive des *Proteus*, *Salmonella* et *Shigella* est comprise en général entre 50 et 100 % de celle du témoin. *Salmonella paratyphi* B a montré une valeur nutritive tout à fait exceptionnelle.

- Bactéries Gram négatif autres que les *Enterobacteriaceae*

(figure 27)

Dans cette classe, nous retrouverons principalement des bactéries de l'environnement, fréquemment isolées des milieux naturels. Seul *Pseudomonas aeruginosa* possède une histoire médicale réellement importante. Si l'on exclut les *Pseudomonas* sécrétant des dérivés phénaziniques (*P. aeruginosa* et *P. aureofaciens*), 3 souches sur 13 testées ont une valeur nutritive inférieure à celle d'*Enterobacter cloacae*. *Chromobacterium lividum* est extrêmement toxique. Les deux souches de *Pseudomonas fluorescens* ont donné des résultats très différents.

- Bactéries Gram positif (figure 28 - p. 116)

Ces bactéries se sont révélées des substrats très moyens ou médiocres

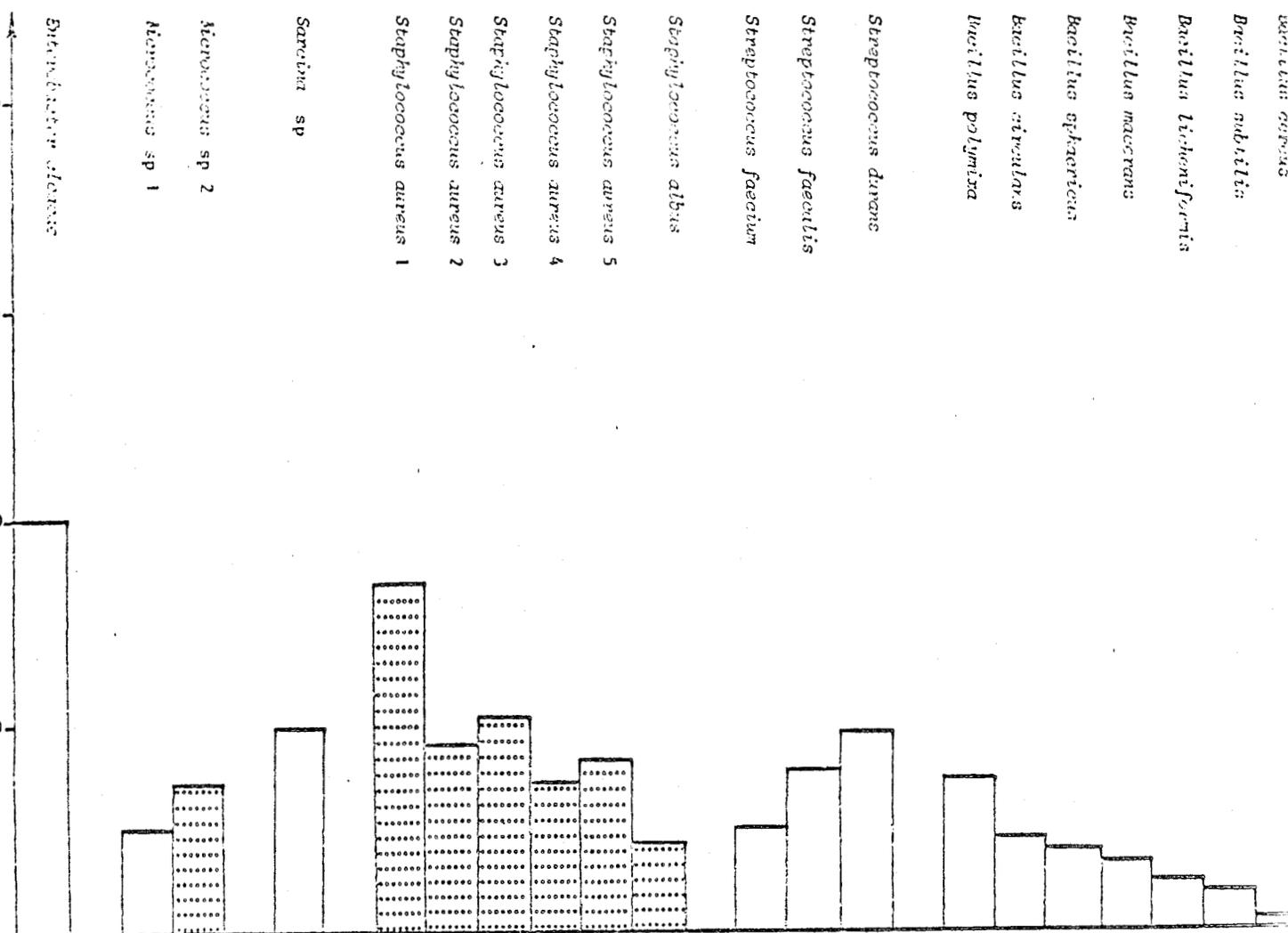


FIG. 28. Valeur nutritive de bactéries Gram positif par rapport à *Enterobacter cloacae*.
Les colonnes en pointillé indiquent les bactéries pigmentées.



pour la culture de *Colpidium campylum*. Une seule souche de *Staphylococcus aureus* possède une valeur nutritive relativement élevée.

III - PHENOMENES DE TOXICITE OBSERVES

1) TOXICITE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

a) Corps cellulaires lavés (figure 27 - p. 114)

Toutes les souches testées ont une valeur nutritive très limitée, très inférieure à celle des autres espèces de *Pseudomonas*. La variété mélanogène d'emblée (secrétion d'un pigment noir ou de tyrosinase qui réagit avec le milieu) s'est montrée plus toxique que les souches classiques. Chez la variété mélanogène tardive, à l'apparition de la pigmentation correspond une chute de la valeur nutritive. *Pseudomonas aureofaciens*, dont le pigment est voisin de celui de *P. aeruginosa* est aussi peu favorable à la croissance.

b) Toxicité des différents extraits

La préparation des différents extraits est détaillée en Annexe II. Les extraits et la pyocyanine pure ont été ajoutés en solution aqueuse à des cultures de *Colpidium campylum* standard (10^3 ciliés/ml et $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml au temps 0 dans un volume de 10 ml). Les concentrations de pigment ont

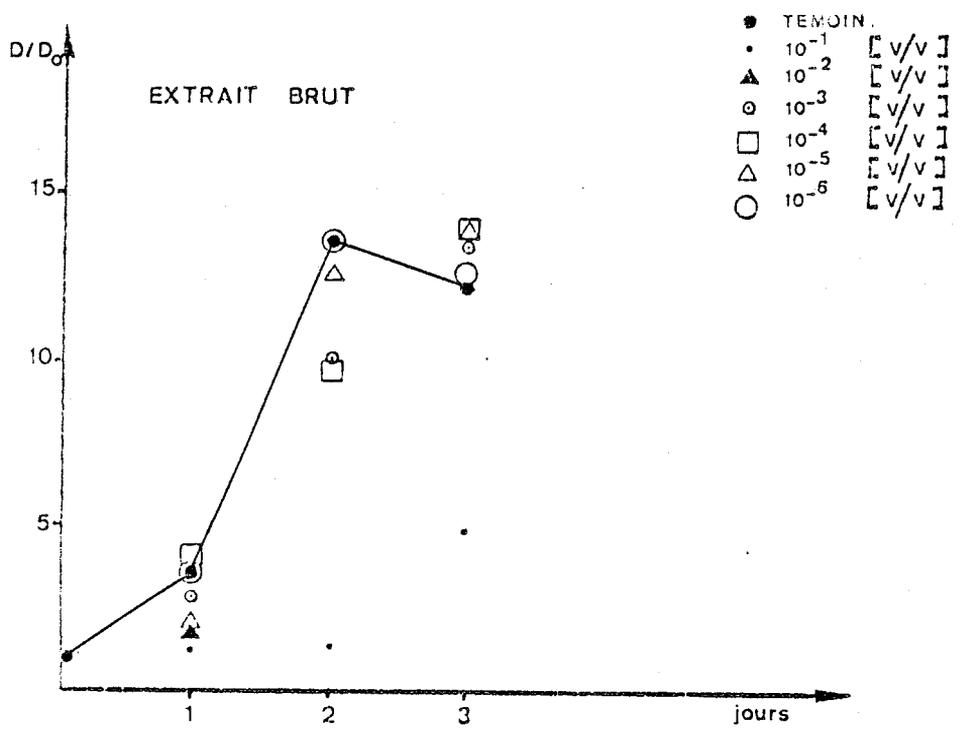


FIG. 29. Croissance de *C. campylum* en présence d'extrait pyocyanique brut.

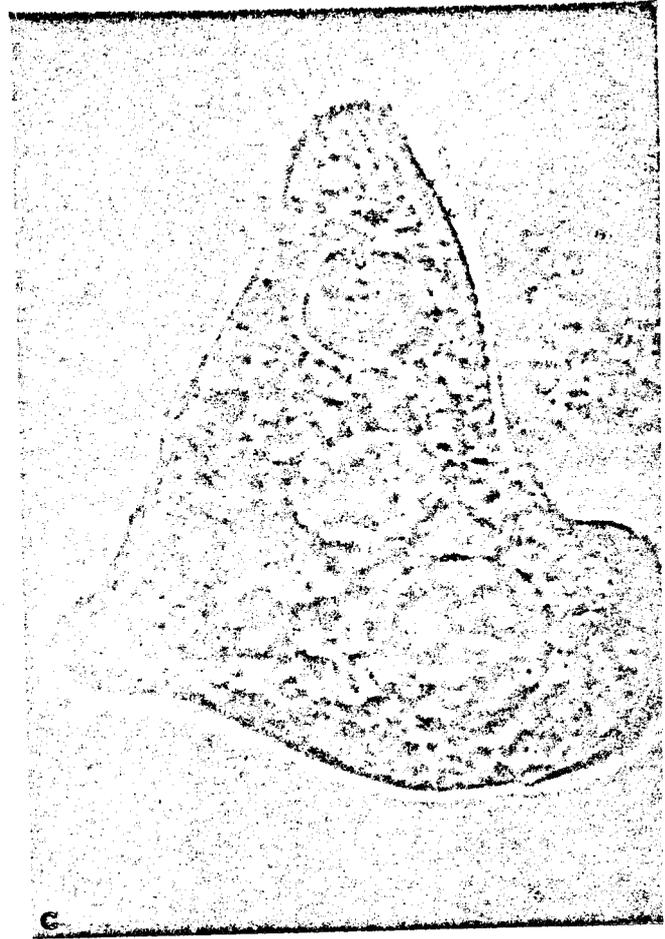


FIG. 30. Anomalies morphologiques chez *C. campylum* traité par l'extrait pyocyanique brut (1900)

a. individu témoin
b et c. individus traités

été exprimées volume à volume.

L'activité de l'extrait brut (P.B.) s'est manifestée par deux types de phénomènes :

- un effet toxique se caractérisant par la mort des cellules ou par l'inhibition de la croissance
- un effet sur la division cellulaire.

Pour une concentration en P.B. comprise entre 1/2 et 1/4 (v/v), les ciliés présentent une plasmolyse rapide et une mobilité anormale, puis les mouvements se ralentissent progressivement tandis que les cellules gonflent ; finalement, on obtient des formes sphériques immobiles qui se lysent rapidement. La durée totale du phénomène est de 5 à 15 mn.

Pour des concentrations plus faibles (10^{-1} v/v), la croissance ne se manifeste qu'après une phase de latence (figure 29) au cours de laquelle la population reste stable. La densité obtenue en 3 jours est très faible. Pour des concentrations de 10^{-3} et 10^{-4} (v/v) d'extrait brut, un léger retard est encore observé au bout de 48 heures. Avec 10^{-5} et 10^{-6} (v/v) d'extrait, la multiplication est identique à celle observée dans le témoin.

Dans les cultures effectuées en présence d'une concentration en extrait de 10^{-3} à 10^{-6} (v/v), nous avons observé un certain nombre d'individus anormaux, en général des monstres doubles (figure 30). Le taux d'anomalies est maximum à la 48ème heure (tableau 17), c'est-à-dire à la fin de la phase

TABLEAU 17. Pourcentage d'anomalies morphologiques constatées en présence de différentes concentrations en pyocyanine brute.

Concentration d'extrait brut v/v	Temps		
	24 h	48 h	72 h
10^{-1}	0	0	0
10^{-2}	0	0	0
10^{-3}	0	7,84	5,28
10^{-4}	0,55	8,96	7,20
10^{-5}	0	8,62	2,69
10^{-6}	0,59	9,49	3,61
10^{-7}	0	3,24	3,05
Témoin	0	1,24	0,80

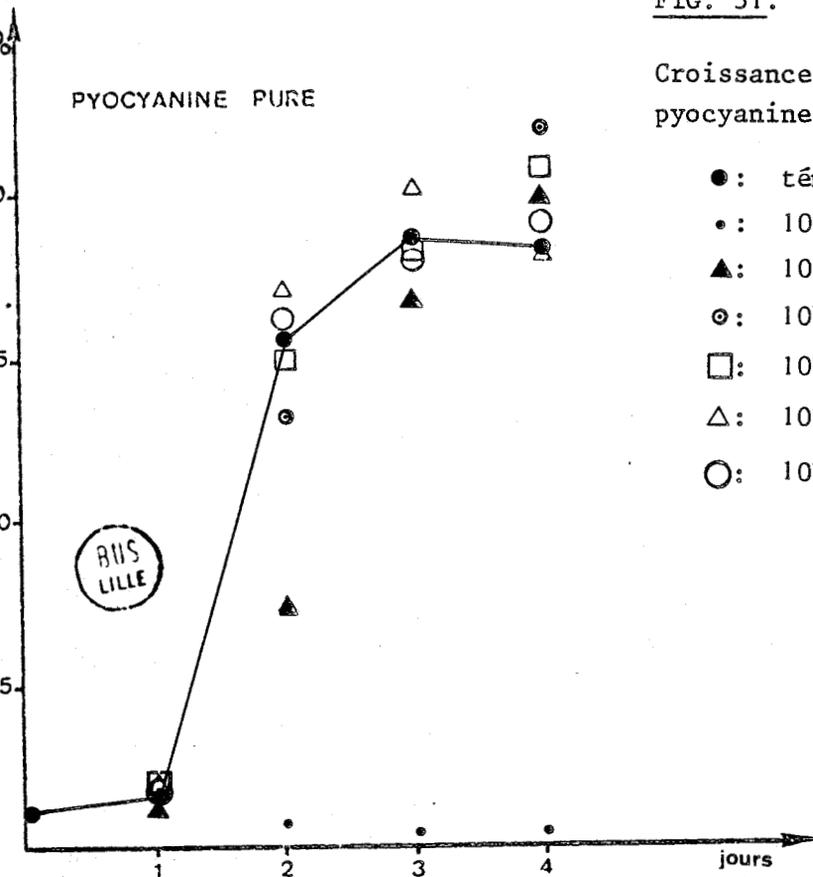


FIG. 31.

Croissance de *C. campylyum* en présence de pyocyanine pure.

de multiplication la plus active de *Colpidium campylum*. L'effet ne s'atténue que pour des quantités très faibles d'extrait. Des anomalies spontanées apparaissent également dans le témoin mais en nombre moins important.

La figure 31 montre que la culture de *Colpidium a*, en présence de pyocyanine pure, un comportement identique à celui observé en présence d'extrait brut. Si l'effet toxique apparaît plus net qu'avec l'extrait brut à la concentration 10^{-1} (v/v), il diminue vite avec la dilution du produit et son effet n'est plus sensible à 10^{-3} (v/v). Comme dans le cas de l'extrait brut, des monstres sont observés en plus grand nombre en présence de pyocyanine que dans le témoin, le maximum correspondant à la phase de multiplication (48 heures).

2) TOXICITE DE CHROMOBACTERIUM LIVIDUM

C'est le seul microorganisme dont les corps cellulaires lavés se soient révélés toxiques pour *Colpidium campylum*. Il fallait étudier si l'origine de la toxicité était liée à la violacéine, pigment insoluble de *C. lividum* ou à une autre substance, certains souches de *Chromobacterium* secrétant de l'acide cyanhydrique. A partir d'un extrait brut de pigment, par gel filtration, nous avons obtenu deux fractions dont l'une (figure 32) présente le même profil spectrophotométrique caractéristique de la violacéine défini par GAUTHIER (79). L'autre fraction (fraction I) ne présente pas le pic d'absorption à 385 nm de la violacéine.

La violacéine entraîne la mort de la culture en moins de 24 h (figures 33 et 34) à une concentration de 10 µg/ml. Avec une dose de 1 µg/ml,

--- fraction II de violacéine dans le butanol
 - - - solution éthanolique de la violacéine non chromatographiée
 --- fraction I de violacéine dans le butanol
 -- témoin butanol

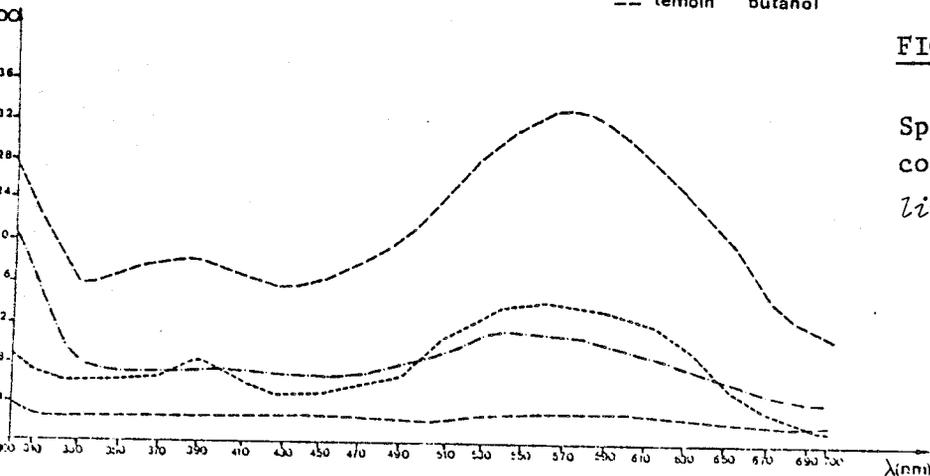


FIG. 32.

Spectres des différentes fractions colorées extraites de *Chromobacterium lividum*

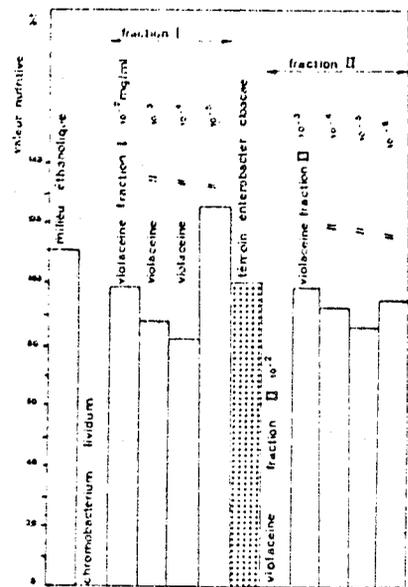
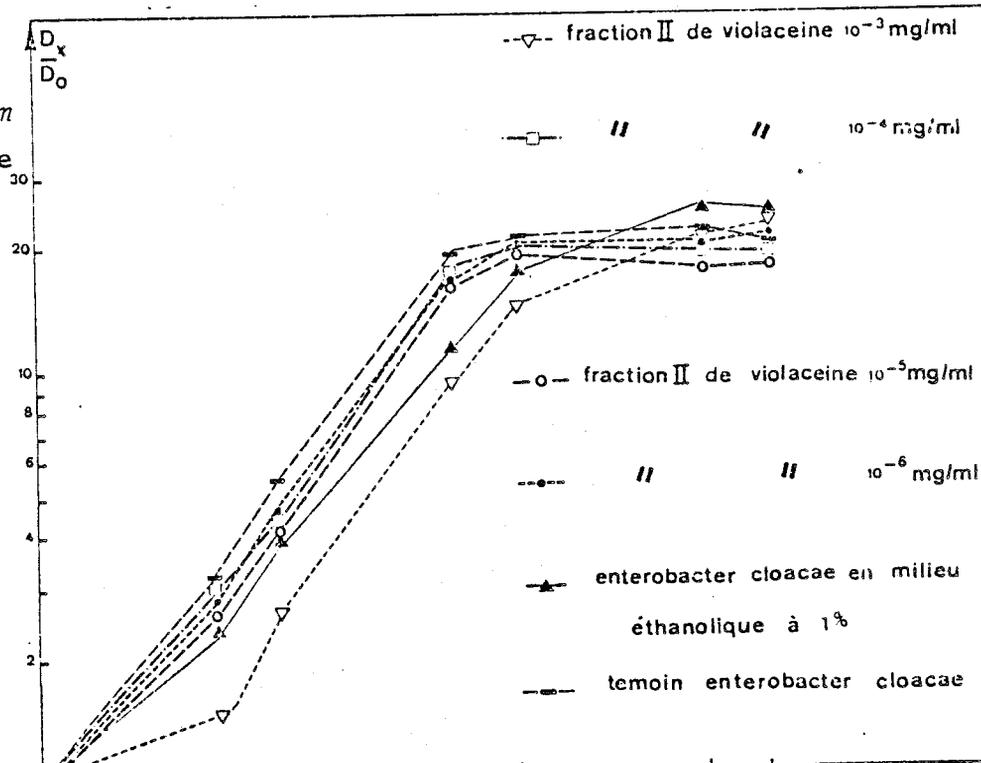


FIG. 33.

Croissance de *C. campyllum* en présence de chacune des fractions colorées - La colonne pointillée indique la croissance obtenue dans le témoin *E. cloacae*.

FIG. 34.

Croissance de *C. campyllum* en présence de violacéine



il y a un retard de la croissance. Pour les doses plus faibles, il n'y a plus d'effet visible. La fraction I ne présente aucune toxicité pour la plus forte concentration administrée (10 µg/ml). Elle n'est donc pas responsable de la toxicité de *Chromobacterium lividum*.

Il existe donc deux substances colorées isolables à partir des cultures de *C. lividum*. Elles diffèrent à la fois par leur comportement sur tamis moléculaire, ce qui permet de les séparer, et par leur profil spectrophotométrique.

L'une, toxique, est la violacéine ; l'autre, non toxique, peut être soit un intermédiaire de la synthèse, soit une forme de dégradation du pigment.

IV - CROISSANCE DE COLPIDIUM CAMPYLUM SUR DES MELANGES DE BACTERIES

1) MELANGE DE DEUX BACTERIES GRAM NEGATIF DE VALEUR NUTRITIVE

DIFFERENTE (fig. 35 - p. 124)

Nous avons utilisé, pour cette expérience, la bactérie témoin *Enterobacter cloacae* et une souche de *Serratia marcescens* pigmentée dont la valeur nutritive est d'environ 50 % de celle de la bactérie témoin (figure 35). Si l'on cultive *Colpidium campylum* sur un mélange, en nombre égal, de ces deux germes, le nombre total de cellules bactériennes initial restant à

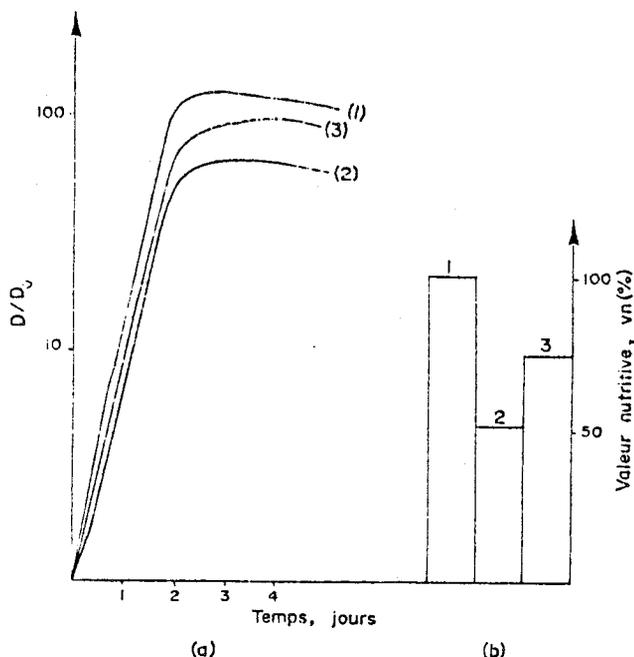


FIG. 35

Croissance de *C. campylyum* en présence d'*E. cloacae* (1) de *Serratia marcescens* (2) et sur un mélange, en nombre égal, des deux bactéries (3)

- (a) courbes de croissance
- (b) valeur nutritive calculée

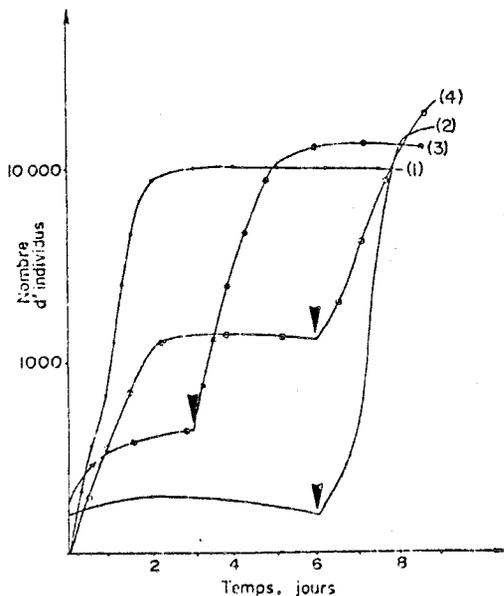


FIG. 36

Croissance de *C. campylyum* en présence d'*E. cloacae* (1) de *Bacillus subtilis* (2) *B. cereus* (3), *B. licheniformis* (4)

Effet de l'addition d'*Enterobacter cloacae* (flèches) sur la croissance en présence de *Bacillus*.



5.10^8 /ml, on constate que le mélange présente une valeur nutritive intermédiaire entre celle des deux bactéries prises isolément. Le résultat observé correspond à une absorption simultanée des *Serratia* et des *Enterobacter*, sans sélection caractérisée de l'un ou l'autre germe.

2) MELANGE DE BACTERIES GRAM - ET DE BACTERIES GRAM + DE FAIBLE

VALEUR NUTRITIVE

La figure 36 montre le comportement de *Colpidium* vis-à-vis de trois espèces de *Bacillus* de faible valeur nutritive et le résultat de l'addition, en cours de culture d'*Enterobacter cloacae*. Au moment de cet apport, aucune diminution sensible du nombre de *Bacillus* n'apparaît optiquement alors que, dans le cas de la bactérie témoin, une lyse subtotale est observée en 48 heures. Lorsque, dans ces cultures, on ajoute des *Enterobacter*, la croissance de *Colpidium* devient immédiatement très rapide, puis se stabilise en 96 heures comme dans une culture normale. Des colorations de Gram mettent alors en évidence la quasi-disparition des bacilles Gram - et la persistance en très grand nombre de *Bacillus*, la densité optique de la culture restant importante. La croissance de *Colpidium* s'est donc opérée pratiquement aux dépens des *Enterobacter*.

C - DISCUSSION GENERALE

Les travaux que nous avons réalisés sur la nutrition holozoïque nous ont apporté des résultats importants dont certains sont d'une portée générale pour d'autres Ciliés, tels les résultats quantitatifs, alors que d'autres apparaissent comme un approfondissement des connaissances spécifiques sur *Colpidium campylum* (nutrition qualitative).

I - NUTRITION QUANTITATIVE DE COLPIDIUM CAMPYLUM

Colpidium campylum montre une réaction très limitée pour les plus faibles quantités de bactéries ajoutées (10^5 et 10^6 bactéries/ml). La réponse croît ensuite rapidement au-dessus de 10^7 *E. coli*/ml. Nous n'avons pu mettre en évidence, lors de nos expériences, la concentration minimale de substrat qui provoque une réaction d'endocytose chez *Colpidium*. L'observation de l'activité des membranelles n'est pas possible sans l'aide d'artifices expérimentaux introduisant un stress (colloïdes, cellule à microcompression). Nous concluons à une réactivité faible de *Colpidium campylum* au-dessous de 10^6 *E. coli*/ml. Elle devient très importante au-dessus de 10^7 bactéries/ml. En présence de très fortes concentrations de substrat, la quantité de bactéries ingérées et le rythme de l'endocytose dépassent la capacité de digestion intracellulaire ; dès la 4^{ème} heure de culture, le rejet du contenu des phagosomes peut être décelé au Compteur Coulter et identifié au microscope sous forme d'amas de 10μ composés de pelotes fécales. Dans ces pelotes, on observe des bactéries parfaitement reconnaissables et apparemment inaltérées.

ce qui indique une assimilation faible due à un transit trop rapide. Ce phénomène peut être également la conséquence de l'ouverture des vacuoles digestives au cytoprocte dans un ordre différent de leur formation, phénomène déjà observé par ailleurs (167).

Notre étude nous a permis de constater qu'il existe une concentration seuil de substrat nécessaire pour obtenir une multiplication de *Colpidium*. Ce phénomène est visible à la fois sur les courbes de croissance en nombre et en biovolume et dans les histogrammes de distribution. Cette condition critique correspond à celle introduite théoriquement par LUCQUIN et coll. (139) et appliquée par PLICHON et coll. (163) au cas d'*E. coli*. Un certain nombre d'auteurs ont constaté, comme nous, l'existence d'une concentration seuil alors que d'autres ne l'ont pas observée, en particulier ceux travaillant sur des cultures continues. TAYLOR a montré que la discordance observée entre les résultats pourrait provenir pour une part de la technique expérimentale utilisée. *C. campylum* exige une concentration seuil quand il est cultivé sur des bactéries en suspension alors qu'aucun seuil n'est observé dans des cultures réalisées avec des bactéries sédimentées.

En présence d'un excès de substrat, nous avons constaté que les bactéries étaient incomplètement digérées. Il s'ensuit une baisse du rendement de la croissance. Il faut en conclure que les modèles mathématiques utilisant une valeur constante pour le rendement doivent être tempérés, tout comme ceux attribuant au taux de croissance des ciliés cultivés sur des bactéries, une loi de variation de type Michaelien. Un seuil de réponse doit être introduit.

Les variations de distribution que nous avons relevées ont déjà été observées chez *Tetrahymena pyriformis*. Il est possible que, pendant la phase de latence, cette dispersion reflète des différences de réactivité au substrat entre les individus.

Les résultats obtenus ici ont pu être précisés en étudiant l'activité phagotrophique de *C. campylum* en culture axénique avec des particules de polystyrène.

Nos résultats mettent clairement en évidence 2 phénomènes :

(1) La vitesse de formation des vacuoles digestives dépend à la fois de la concentration et de la taille des particules présentes dans le milieu. Ceci a déjà été observé par RICKETTS (175).

(2) La loi définissant la vitesse de formation des vacuoles en fonction de la quantité de particules est complexe. Il existe en particulier des seuils correspondant à des accélérations de l'activité phagotrophique.

La concentration seuil inférieure est à rapprocher de la condition critique définie antérieurement en présence de bactéries pour sa valeur identique et elle en précise la signification : quand la quantité de bactéries diminue, le développement des cultures de Ciliés ne tend pas vers 0 parce qu'on se rapproche de la concentration d'entretien (quantité de bactéries nécessaire au maintien d'une biomasse constante) mais parce que l'endocytose n'est plus suffisamment stimulée. TAYLOR (214) a donné une raison plausible de ce phénomène : le Cilié, dépensant trop d'énergie pour pourvoir à son

alimentation, rare dans son environnement immédiat, arrête son activité phagotrophique pour se consacrer à rechercher des zones plus riches en nourriture. Ceci serait particulièrement vrai pour les Protozoaires capables de se nourrir aux dépens de bactéries sédimentées, comme le *Colpidium*. Nous avons pu vérifier cette aptitude chez notre souche en utilisant la microcinématographie.

Une deuxième concentration seuil se situe chez *Colpidium* en gros au-dessus de 10^8 particules de $1,1 \mu/ml$. On observe alors une augmentation brutale de la vitesse de formation des vacuoles digestives. Si l'on rapproche ces résultats des observations effectuées avec des bactéries, on se rend compte que cette concentration correspond à une très nette augmentation du volume moyen cellulaire et du biovolume total et, pour des concentrations supérieures, à un transit accéléré des vacuoles digestives conduisant à une assimilation incomplète du substrat et une chute du rendement de croissance.

Nos observations réalisées sur des modèles particuliers inertes nous permettent donc de retrouver certains résultats observés en présence de bactéries.

Il est intéressant de comparer nos résultats à ceux de FENCHEL (73, 74, 75) et à ceux de RICKETTS (175, 177, 178, 179). FENCHEL observe que la taille des particules correspondant à la rétention optimale est de $0,36 \mu$ pour *C. colpoda* et *C. campylum*. Il n'y aurait donc pas coïncidence entre vitesse de formation des vacuoles digestives telle que nous l'avons mesurée, et rétention des particules. FENCHEL déclare également que chez *Glaucoma*, les vacuoles digestives formées en présence de latex de $1,1 \mu$ sont plus nombreuses, mais plus petites que celles formées en présence de latex de plus petite taille. Nous n'avons pas confirmé ces résultats lors de nos travaux. Avec des

particules de $0,2 \mu$, les vacuoles digestives sont extrêmement petites et peu visibles chez *Colpidium*. La taille des vacuoles digestives augmente avec la taille des particules ajoutées, phénomène déjà observé par RICKETTS avec *Tetrahymena* (175). FENCHEL constate également que l'ajout de particules de 2μ dans une suspension de latex de $0,356 \mu$ provoque une diminution du volume global de latex ingéré chez *C. colpoda*. Outre que les concentrations utilisées sont énormes (de 2 à 7.10^9 particules de $0,356 \mu/ml$), on peut s'interroger sur la manière dont ont été calculées les quantités totales ingérées, les particules de $0,356 \mu$ n'étant pas dénombrables en microscopie optique.

Utilisant un mélange de particules de $0,35 \mu$ et de $1,1 \mu$, nous avons, au contraire, observé une stimulation de la phagotrophie et, en fonction du nombre et de la taille des vacuoles observées, une augmentation de la quantité totale de latex ingéré.

La mesure réelle de la quantité de latex contenue dans un Protozoaire est très difficile à réaliser. Le dénombrement des particules à l'intérieur des vacuoles, au microscope, n'est possible que pour des éléments figurés dont le diamètre est supérieur à 1μ si leur réfringence facilite leur détection. Avec des particules de 1μ , notre expérience nous a montré, avec *Colpidium campylum*, qu'il est très aléatoire de dénombrer les perles de latex dans les vacuoles car leur nombre y est trop élevé. Pour tous les types de particules, il est possible de mesurer le diamètre de l'amas de latex contenu dans la vacuole et d'en déduire le nombre de sphères d'un diamètre donné, contenues dans cet amas si l'arrangement est régulier. Dans ces conditions, on peut obtenir des résultats approchés pour des suspensions monodimensionnelles. Avec des mélanges, il devient impossible d'obtenir des mesures significatives car l'arrangement géométrique des particules est

modifié.

Le fait que nous ayons obtenu des résultats très similaires en travaillant sur des cultures monoxéniques et sur des cultures axéniques de *Colpidium* montre que l'influence de la taille et du nombre de particules sur l'endocytose est un phénomène général qui se manifeste d'une manière identique dans toutes les conditions de culture et indépendamment de la valeur nutritive des particules. On peut aussi en conclure que l'existence d'un seuil de concentration en bactéries nécessaire pour obtenir une croissance de *Colpidium* n'est pas en relation avec une condition critique ou ration alimentaire d'entretien.

Deux phénomènes interviennent donc dans la nutrition holozoïque chez *Colpidium campylum* :

(1) L'endocytose doit être stimulée suffisamment ; en fait, nous pensons que la concentration en particules autour de la cellule peut déclencher une activité continue des membranelles buccales à partir d'un certain seuil. La réponse n'est pas une loi simple et il existe des seuils de concentration pour lesquels le rythme de l'endocytose est modifié.

(2) Lorsque l'activité des membranelles buccales est continue, la rétention des particules dépend de leur plus grande dimension et, comme FENCHEL l'a bien décrit, l'espacement des cils de la parorale conditionne l'éventail de taille des particules que le Cilié pourra effectivement endocyter.

II - NUTRITION QUALITATIVE DE C. CAMPYLUM

Les résultats généraux font apparaître une très grande similitude de comportement alimentaire entre *Colpidium campylum*, *Colpidium colpoda* (27, 29, 215, 216, 217) et *Glaucoma scintillans* (38, 215, 216, 217). Pour TAYLOR (216) *C. colpoda* meurt en présence de *Pseudomonas fluorescens* et de *Micrococcus* sp. et il utilise *Bacillus subtilis*. Ce dernier résultat peut s'expliquer par la plus grande taille de *C. colpoda* par rapport à *C. campylum*. Les principaux facteurs qui conditionnent la valeur nutritive des bactéries sont la composition de leur paroi, leur origine écologique, leur taille et la présence de certains pigments toxiques.

La composition de la paroi bactérienne joue un rôle de premier plan dans le comportement alimentaire de *C. campylum* qui se multiplie beaucoup mieux sur les bactéries Gram négatif. Ce résultat global cache une certaine diversité observée au sein des bacilles Gram négatif. Les bactéries les plus favorables à la croissance sont précisément celles qui sont très abondantes dans le site dont nous avons isolé notre souche de cilié : *Cytophaga*, *Flavobacterium* et en général tous les germes pigmentés en jaune, les *Pseudomonas* dont il faut exclure le groupe *aeruginosa* et les *Aeromonas*. Le groupe des Entérobactéries, dont un grand nombre est d'origine fécale, vient ensuite et donne des valeurs nutritives comprises entre 70 et 100 % du témoin choisi, *Enterobacter cloacae*. S'en séparent nettement *Yersinia enterocolitica* et les *Serratia* pigmentées. Avec les bactéries Gram positif, la valeur nutritive atteint exceptionnellement la moitié de celle des Gram négatif.

La plus grande valeur nutritive des bactéries Gram - corrobore très bien les observations réalisées sur les cultures axéniques. Ces bactéries, contiennent, en effet, dans leur paroi des composants comme des acides aminés soufrés et cycliques, de la lysine, de l' α -céphaline et des acides gras dont nous avons vu la très grande influence sur la croissance de *Colpidium campylum* en culture axénique. Tous ces constituants sont pratiquement absents de la paroi des bactéries Gram +. Les travaux sur les cultures axéniques apportent des explications à la nutrition bactérienne qualitative. Réciproquement, nous pensons que la connaissance de la composition en acides aminés, acides gras et vitamines des bactéries Gram - doivent nous aider à réaliser un milieu synthétique pour *Colpidium*. C'est la démarche qui a été suivie par VAN WAGTENDONK (226) pour mettre au point le milieu de culture synthétique de *Paramecium aurelia*. Si la taille des bactéries est trop importante pour permettre l'endocytose (*B. cereus*), la valeur nutritive du microorganisme est très faible ou nulle. Le même résultat est obtenu si les bactéries sont groupées en amas difficiles à dissocier comme chez les Staphylocoques et certains *Bacillus*. Dans nos conditions d'expérimentation, on pourrait penser que la taille des microorganismes intervient également d'une autre façon. Le nombre de germes ajouté au départ de l'expérimentation étant toujours identique, la biomasse de nourriture disponible est proportionnelle à la taille des bactéries testées et, pour un même rendement de croissance, *C. campylum* se multipliera moins sur les germes les plus petits. La fig.37. P. 134 confirme qu'il fait, c'est la composition de la paroi qui est le facteur le plus influent. Chez les bactéries Gram +, la valeur nutritive aurait même tendance à diminuer quand la taille augmente ; on atteint en effet des dimensions limites pour la compatibilité avec l'endocytose.

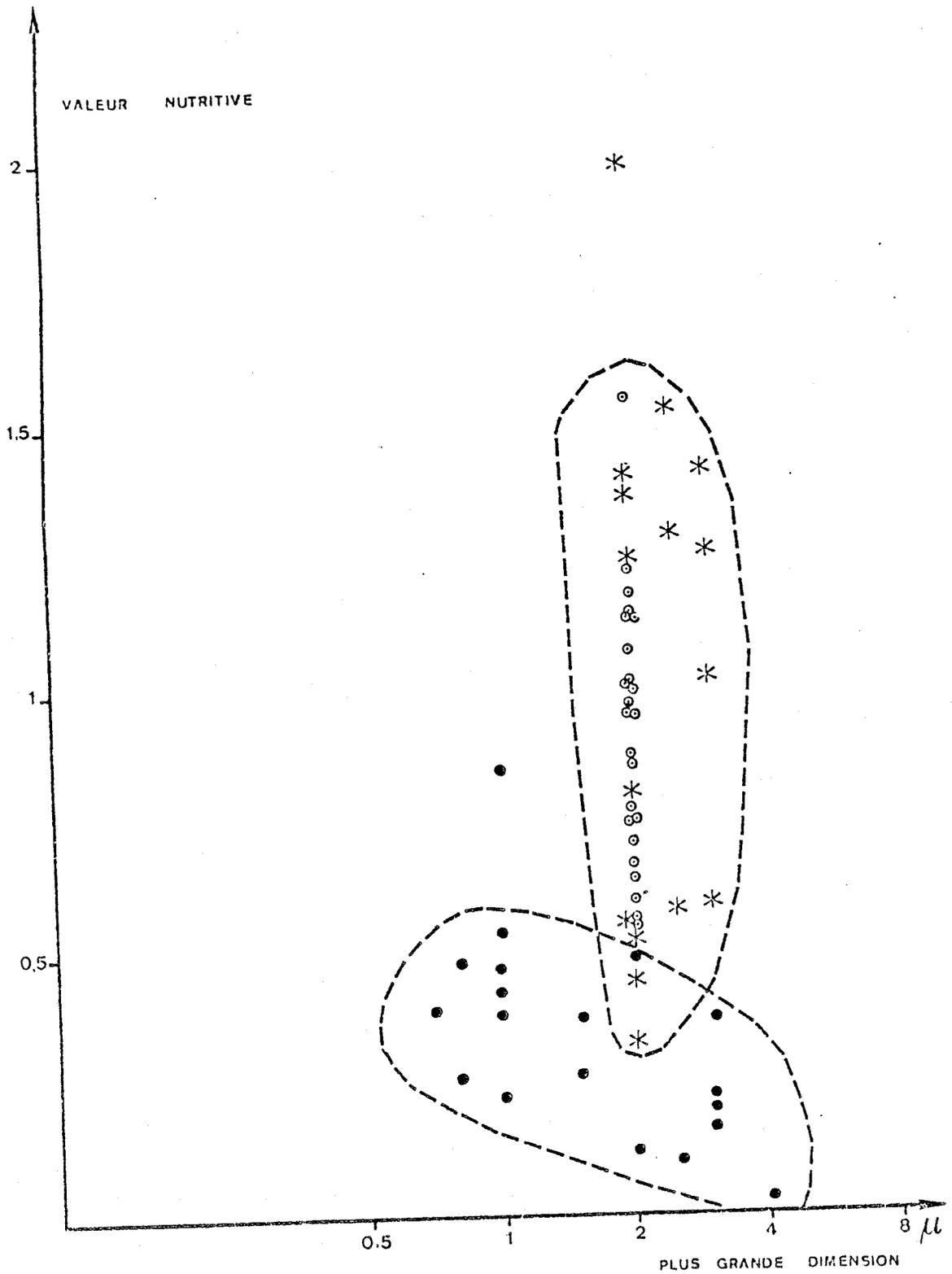


FIG. 37

Valeur nutritive des bactéries en fonction de leur plus grande dimension

- ⊙ : Enterobactéries
- * : Autres bactéries G⁻
- : Bactéries Gram⁺

Enfin, les pigments bactériens peuvent se diviser en trois catégories suivant l'influence qu'ils exercent sur *C. campylum* :

- Des pigments inoffensifs comme les caroténoïdes des bactéries pigmentées en jaune, pour lesquels aucune manifestation toxique n'est observée.

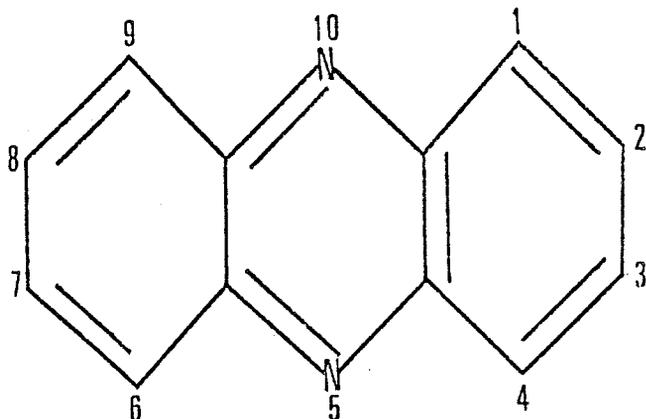
- Des pigments inhibiteurs, mais dont la toxicité aiguë n'a pu être montrée lors de nos expérimentations. Il s'agit essentiellement de la prodigiosine de *Serratia marcescens*. Des extraits acétoniques du pigment ne tuent pas *Colpidium campylum*.

- Des pigments nettement toxiques pour les Ciliés. Dans cette catégorie, les pigments phénaziniques sont les plus toxiques. Nous avons apporté la preuve formelle de la toxicité de la pyocyanine en travaillant avec le produit pur. Nos observations sur les cellules bactériennes lavées nous incitent à penser que la 1 hydroxyphénazine et l'acide 1 phénazine carboxylique, d'une structure très voisine de la pyocyanine, possèdent une toxicité importante. (fig. 38 p. 136)

Nous avons également mis en évidence une toxicité liée aux variétés mélanogènes de *Pseudomonas aeruginosa* mais l'origine exacte de cette toxicité reste à découvrir.

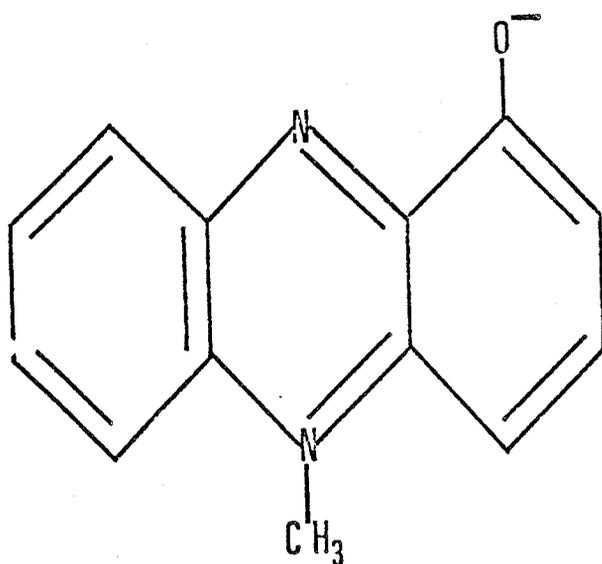
La toxicité de la violacéine de *Chromobacterium lividum* a également été démontrée sur le produit purifié. A cette occasion, nous avons montré qu'il existait des fractions colorées dans le pigment brut, qu'un seul des

a)



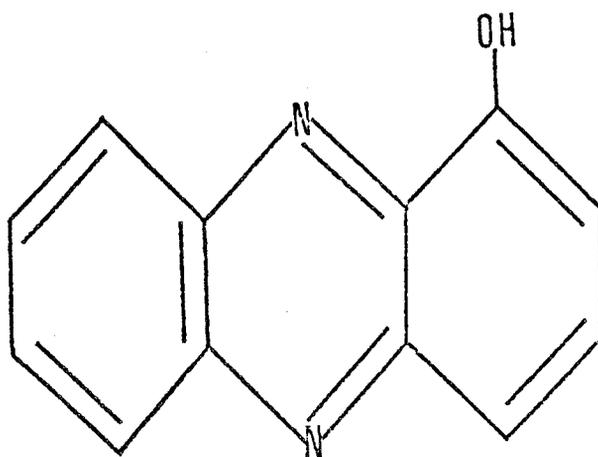
PHENAZINE

b)



PYOCYANINE

c)



PYOXANTHOSE

FIG. 38

Dérivés phénaziniques isolés à partir de *Pseudomonas aeruginosa*

a/ noyau phénazinique

b/ pyocyanine

c/ pyoxanthose ou 1 hydroxy phénazine



produits était toxique pour *Colpidium*, et que la toxicité de *Chromobacterium* se manifeste en dehors de production d'acide cyanhydrique.

Nos études sur la nutrition de *C. campylum* sur des mélanges de bactéries montrent que, dans le cas où les bactéries ont une taille très semblable (*Serratia* et *Enterobacter*), la sélection ne s'opère pas alors que lorsque la taille des microorganismes en présence est très différente (*Bacillus* et *Enterobacter*) la sélection est très efficace. Ceci conforte la théorie de FENCHEL qui apporte une théorie passive de la sélection. Il existe une taille de particule correspondant à une rétention optimale, en relation avec l'écartement des cils de la parorale. Les théories faisant appel à la reconnaissance des particules par chimiotactisme semblent irrecevables dans les conditions où nous avons travaillé (hautes concentrations en cellules bactériennes).

Sur le plan écologique, il y a une coïncidence très bonne entre la composition de la flore microbienne du site d'où nous avons isolé notre souche (227) et la bonne valeur nutritive des constituants essentiels de cette flore. Ces données indiquent que *Colpidium campylum* va être un excellent agent d'auto-épuration microbienne par son action sur les germes d'origine fécale et les germes auto-épurateurs qui se trouvent en excès à la fin du processus de minéralisation de la matière organique. Enfin, les données quantitatives que nous avons obtenues indiquent une concentration seuil plus élevée que les données bactériologiques observées dans le site par WALKER et LECLERC (227). Mais, si l'on considère que les numérations de bactéries viables sur gélose représentent 20 à 50 % du nombre réel de bactéries présentes, on se rend compte

que le nombre de bactéries totales est compatible avec les données expérimentales que nous avons déterminées. Dans les milieux pollués comme celui dont nous avons isolé notre souche, le nombre de bactéries totales, selon DELATTE (communication personnelle) serait voisin ou supérieur à $5 \cdot 10^6$ cellules/ml, donc très voisin des données expérimentales que nous avons obtenues avec *E. coli*.

Dans le milieu naturel dont nous l'avons isolé, *Colpidium campylum* se trouvait donc dans des conditions optimales pour le maintien de sa population, la quantité de nourriture restant trop faible pour permettre sa prolifération intense.

TROISIEME PARTIE

UTILISATION DE COLPIDIUM CAMPYLUM
POUR LA MESURE DE TOXICITE

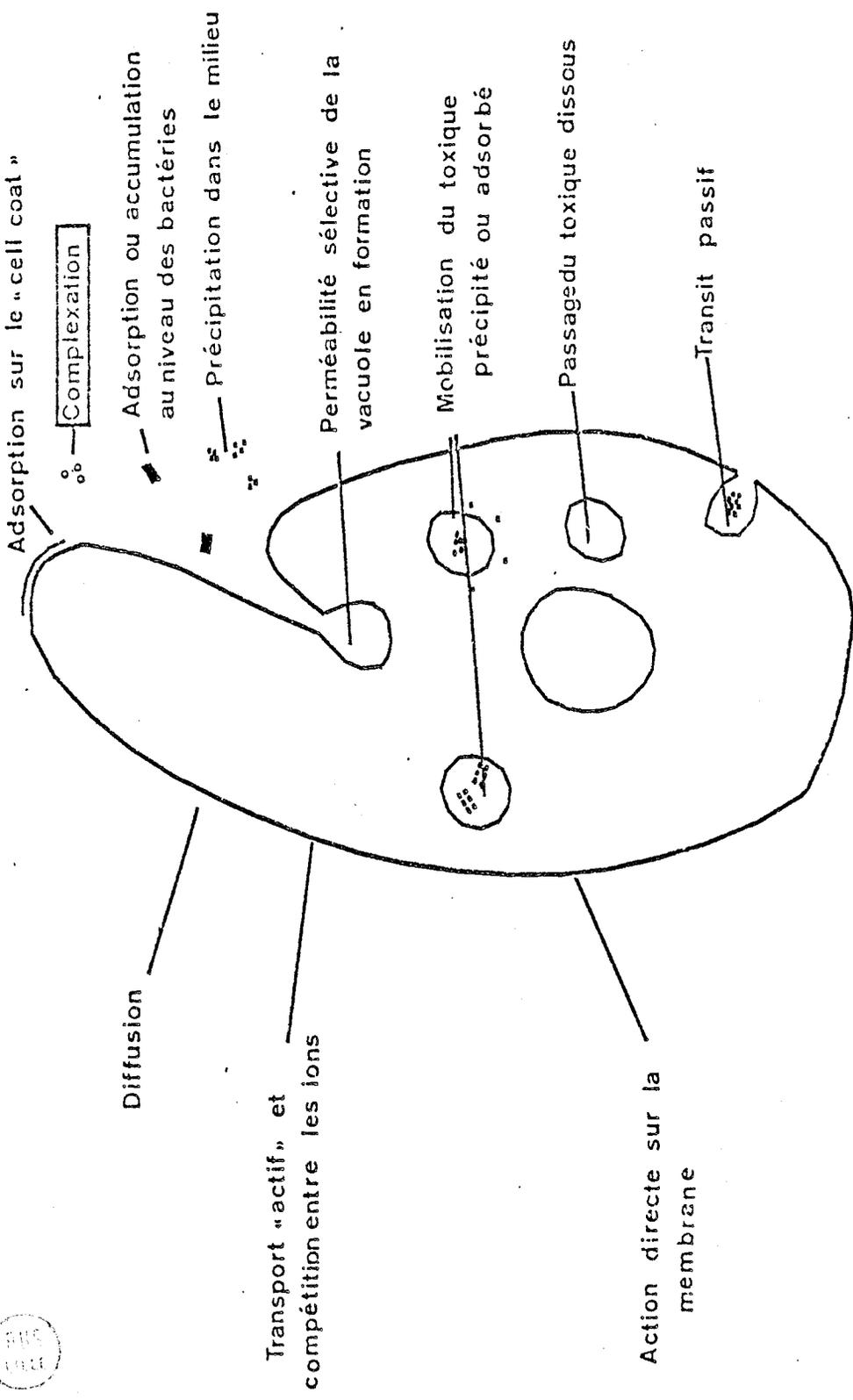


FIG. 39

Voies de pénétration possibles pour les produits toxiques chez un Protozoaire Cilié se nourrissant par filtration du milieu.

A - PENETRATION, ACCUMULATION ET TOXICITE DES PRODUITS POUR LES PROTOZOAIRE

L'étude de la nutrition de *Colpidium campylum* nous a obligé à aborder les problèmes de transport des éléments nutritifs. De même, les possibilités de passage des polluants à l'intérieur de la cellule et leur rétention ou leur rejet vont conditionner en partie leur toxicité et leur accumulation. Nous nous proposons de discuter ici les principaux aspects de ce problème.

Les différentes voies de passage des toxiques sont regroupées dans la figure 39. Il importe, pour déterminer le rôle de chacune de ces voies, d'examiner les produits selon leur solubilité qui constitue le facteur déterminant pour les voies de pénétration à l'intérieur de la cellule.

I - LES PRODUITS SOLUBLES

Pour les produits solubles, trois possibilités de passage peuvent se présenter :

- la diffusion au travers de la membrane
- le transport "facilité" ou "actif"
- l'endocytose

1) LA DIFFUSION

Les propriétés des membranes vivantes s'opposent, le plus souvent, aux phénomènes de diffusion et ces membranes constituent une barrière pour de nombreuses substances. Certains toxiques, tels les détergents, pourront modifier les membranes et provoquer des perturbations très graves de l'équilibre osmotique de la cellule, pouvant entraîner sa mort. Mis à part cette action directe au niveau de la membrane, la liposolubilité de certaines substances peut faciliter leur passage et leur accumulation. A ce titre, le coefficient de partage octanol/eau d'un produit est un indicateur très significatif de ses potentialités de passage. La diffusion simple n'est certainement pas un phénomène quantitativement très important dans les phénomènes de toxicité et d'accumulation.

2) LE TRANSPORT

Beaucoup d'ions métalliques vont pénétrer dans la cellule par transport accéléré ou transport actif en entrant en compétition avec les ions normalement présents dans le milieu extérieur ou à l'intérieur de la cellule. Certains toxiques présentant des structures analogues à celle d'acides aminés ou de nucléosides pourront pénétrer dans la cellule de la même façon.

3) L'ENDOCYTOSE

L'endocytose peut se réaliser par la voie des vacuoles digestives, ou par microendocytose. Lors de la formation des phagosomes, une partie du liquide extérieur est retenue avec une certaine quantité de toxique en solution. Il est possible également, comme l'a suggéré RASMUSSEN (166) que la perméabilité de la membrane vacuolaire soit différente de celle de la membrane cellulaire elle-même, de sorte que des phénomènes de transport accéléré peuvent avoir lieu au niveau de la membrane du phagosome en formation.

Le produit peut également s'adsorber en grande quantité à la surface des éléments figurés présents dans le milieu de culture, par exemple les bactéries ; c'est le cas en particulier pour les pesticides (191). L'endocytose sera alors une voie très importante d'entrée des toxiques dans la cellule. Toutefois, la désorption du produit n'est pas toujours possible et le produit transite alors dans la vacuole sans intoxiquer le Protozoaire. L'importance de la microendocytose est inconnue chez *Colpidium*. Chez *Tetrahymena* elle est faible comparée à celle des vacuoles digestives.

II - LES PRODUITS INSOLUBLES

Pour les produits insolubles, les seules voies possibles sont l'endocytose et la microendocytose. Les facteurs qui vont conditionner la pénétration de ces produits vont être la taille et le nombre de particules,

ces deux facteurs influant fortement sur l'activité phagotrophique chez les Ciliés. Dans les conditions naturelles, les concentrations en polluants insolubles sont rarement suffisantes pour que l'endocytose se manifeste d'une manière très significative. Le problème de la mobilisation du produit à partir des particules ingérées semble encore plus ardu à résoudre que celui des toxiques solubles adsorbés et nous verrons plus loin qu'il y a souvent transit passif sans modification.

III - LE PROBLEME DE LA QUANTIFICATION DE L'ACCUMULATION

1) QUANTIFICATION DU PASSAGE TRANSMEMBRANAIRE

La seule possibilité existant actuellement consiste à utiliser des mutants défectifs pour l'endocytose et de mesurer la cinétique de pénétration des toxiques marqués. On peut également observer si la toxicité disparaît en absence de vacuoles digestives auquel cas, l'endocytose est la voie de passage.

2) QUANTIFICATION DE L'ENDOCYTOSE

a) Produits solubles :

Pour les produits solubles, l'utilisation de la méthode utilisée pour la mesure du passage membranaire, en comparant une souche sauvage et

son mutant défectif pour les vacuoles digestives, permet d'obtenir un résultat. Il faut s'assurer d'abord que la mutation n'a pas entraîné certaines modifications de perméabilité. Si l'on suppose qu'il n'y a pas de pénétration sélective du toxique au niveau de la membrane du phagosome, ni adsorption sur des particules en suspension dans le milieu, la mesure du nombre et du volume des vacuoles digestives formées en un temps donné est une estimation grossière de l'endocytose quand on ne dispose pas de mutants appropriés.

b) Produits insolubles :

Dans le cas des produits insolubles, il faut s'efforcer de mesurer la quantité de substance contenue dans les vacuoles. Nous avons discuté, lors de notre étude de la phagotrophie de *Colpidium* sur des particules de latex, des problèmes posés par une telle quantification. Ici, ils se compliquent du fait que les suspensions ne sont pas monodimensionnelles et que des bactéries peuvent être présentes en même temps que le toxique dans le milieu. De ce fait, une certaine sélection peut s'opérer.

Si le produit est solubilisé ou métabolisé à l'intérieur de la vacuole, la concentration en toxique va évoluer et les résultats obtenus dépendront de l'âge de la vacuole au moment de la mesure. NILSSON (150, 151) a bien mis en évidence la migration du plomb depuis les vacuoles digestives jusque certains sites intracellulaires chez *Tetrahymena*.

La toxicité du produit peut se manifester également au niveau même de l'induction de la phagotrophie qui peut être accélérée ou inhibée. C'est le cas de la cytochalasine B (109, 152).

Lors d'une étude de toxicité d'un produit vis-à-vis des Ciliés, il faut pouvoir s'assurer de la pénétration réelle de la substance dans le milieu intracellulaire avant de pouvoir affirmer son innocuité vis-à-vis de l'organisme.

Si l'on réalise des études d'accumulation, l'étude quantitative reste très possible avec des produits solubles, mais les rôles respectifs de la membrane et de l'endocytose dans le passage peuvent être difficiles à séparer si l'on ne dispose pas de mutants adaptés.

Pour les produits insolubles, la quantification devient très difficile ; elle est perturbée s'il y a un transit passif, une métabolisation, etc... Certaines techniques, permettent de vérifier l'absence de métabolisation et apportent une aide à l'interprétation. Nous en verrons un exemple plus loin.

B - MESURE DE TOXICITE PAR INHIBITION DE LA CROISSANCE

La méthode de test que nous avons développée a été exposée en détail lors de notre Thèse de 3ème cycle (65). Nous rappellerons donc les principes de la méthode en soulignant ses aspects les plus caractéristiques.

I - METHODE

1) PRINCIPE GENERAL

Le test est basé sur l'inhibition, par toute substance toxique, de la croissance totale d'une culture de *Colpidium campylum*. Il sera brièvement décrit. Les Ciliés sont utilisés en culture monoxénique. A cette fin, 50 ml de milieu minéral sans azote ni carbone organique sont additionnés de 5 ml d'une suspension d'*Escherichia coli* de densité optique 1,2 (prise à 650 nm). Les bactéries ont été préalablement cultivées une nuit sur gélose nutritive, récoltées dans le milieu minéral et centrifugées. Le culot bactérien est alors repris dans le milieu minéral et la suspension ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre.

Pour les tests, on emploie des cultures de ciliés de 96 h ; l'inoculum est de 5 ml pour 55 ml de milieu préparé. L'incubation a lieu à 20°C à l'obscurité. La croissance totale est exprimée en nombre de générations obtenues.

nues en 43 h ($NG_{(43)}$) calculé à l'aide de la formule :

$$NG_{(43)} = \log_{(2)} \frac{D_{(43)}}{D_{(0)}}$$

où $D_{(0)}$ et $D_{(43)}$ représentent respectivement le nombre de Protozoaires présents dans la culture aux temps de 0 et 43 h, ce temps correspondant au minimum de dispersion des résultats dans le témoin (65).

Les numérations de population sont effectuées avec un Coulter Count (Coultronics France) équipé d'un analyseur MCV hémocrite et d'un Channelyse P64 XY permettant d'étudier à la fois le volume moyen et la dispersion de la population de ciliés. Les comptages ont été effectués dans les conditions suivantes :

Coulter Counter : sonde 200 μ - impédance 5 $k\Omega$ - courant d'ouverture

1 - atténuateur 0.5 - seuil 10 ou 20

MCV hémocrite : 1 unité MCV = 100 μ^3

Channelyser : cumulation "Stop at full scale" - valeur du mode 128

Electrolyte : NaCl 7g - formol neutre 75 ml - eau distillée q.s.p.

1000 ml - 5 ml de culture sont additionnés à 10 ml de fixateur.

Les tests sont réalisés en comparant la croissance obtenue dans un témoin sans toxique avec celle observée en présence de concentrations croissantes du produit à tester (5 répliques pour chaque dose). On détermine, à partir du nombre de générations moyen obtenu ($NG_{(43)}$), la Dose Minimale Active (DMA) par rapport au témoin. C'est la plus petite quantité de toxique

modifiant de façon statistiquement significative la croissance totale de *Colpidium campylum*. Le seuil de signification employé est de 1 % (136, 204).

2) TECHNOLOGIE ET INTERPRETATION DU TEST

La méthodologie proposée n'est applicable que si plusieurs conditions sont parfaitement remplies : 1. la reproductibilité de la croissance doit être satisfaisante ; 2. la méthode statistique applicable à l'analyse des résultats dépendra de l'existence ou de l'absence d'une relation entre le nombre de générations (variable utilisée pour le calcul) et les mesures effectivement réalisées (numération de population aux temps 0 et 43 h) ; 3. l'influence éventuelle de la dispersion des densités initiales moyennes des séries, au départ de chaque expérience, doit pouvoir être corrigée ; 4. il faut déterminer de quelle manière les instruments de mesure peuvent modifier les résultats en fonction de leur réglage.

- Reproductibilité de la croissance : l'évaluation d'une population se multipliant par division binaire suit la fonction :

$$D_{(43)} = D_{(0)} \times 2^{\overline{NG}_{(43)}}$$

$$\text{d'où } \overline{NG}_{(43)} = \log_{(2)} D_{(43)} - \log_{(2)} D_{(0)}$$

D'après cette relation, $D_{(43)}$ et $D_{(0)}$ peuvent retentir sur la valeur de $\overline{NG}_{(43)}$. $D_{(43)}$ représente la population à la phase stationnaire. Comme les

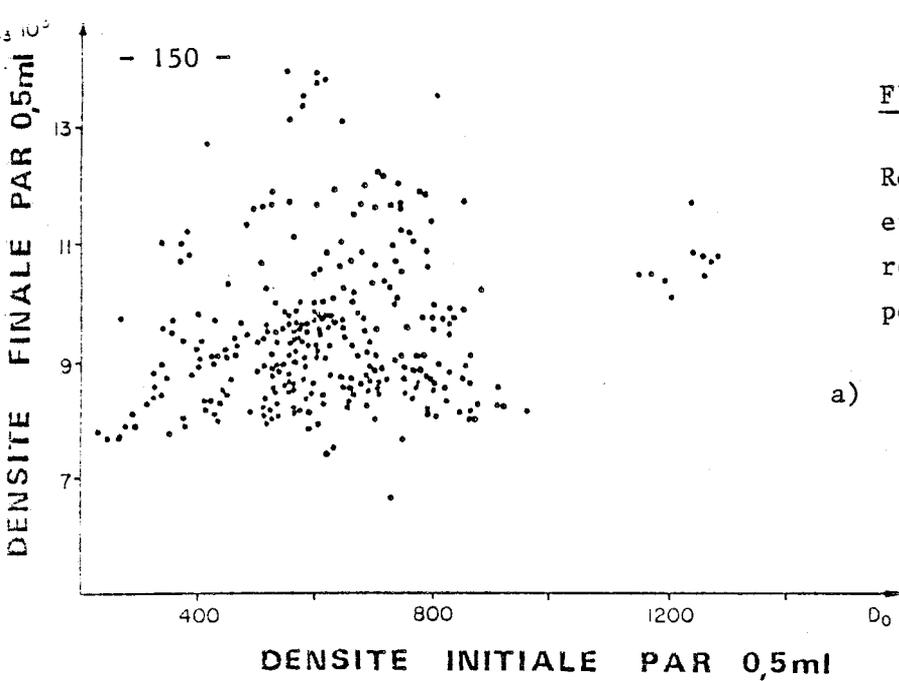
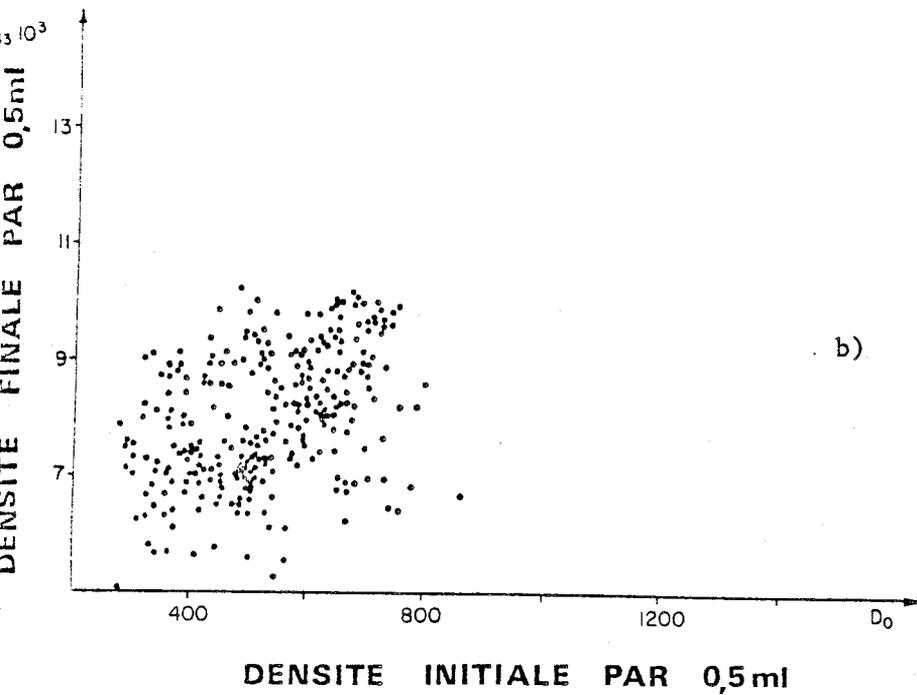


FIG. 40

Relations entre populations initiales et populations finales au temps 43 H relevées sur l'ensemble des expériences pendant 2 années consécutives

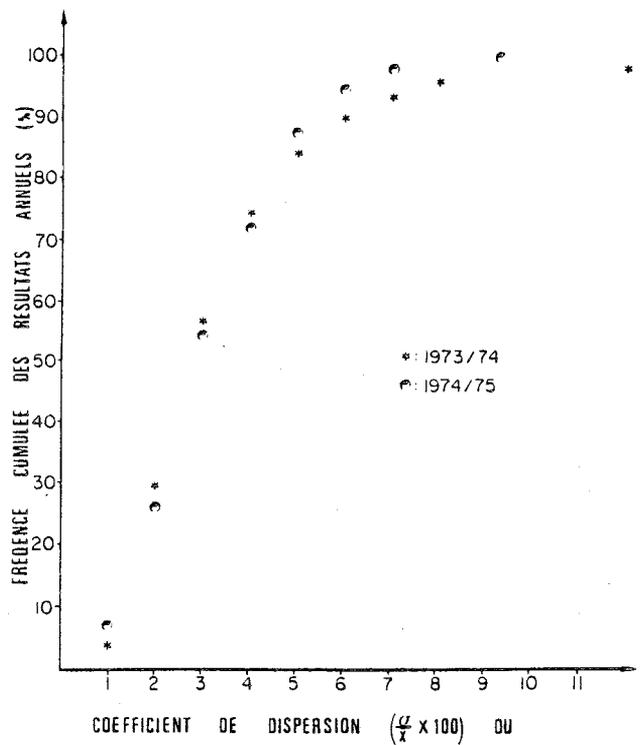
- a) a) année 1973
b) année 1974



b)

FIG. 41

Fréquence cumulée du coefficient de dispersion observée dans les séries témoins au cours de deux années consécutives



RUS
LILLE

cultures sont réalisées avec des quantités identiques (en masse) d'*Escherichia coli*, $D_{(43)}$ devrait être constant (s'il est très grand par rapport à $D_{(0)}$) ou croître linéairement quand $D_{(0)}$ augmente (si $D_{(0)}$ n'est pas négligeable devant $D_{(43)}$). Cette hypothèse ne s'applique en fait en toute rigueur qu'à la masse des Ciliés, si le rendement de la croissance est constant, ce qui a déjà été observé expérimentalement pour *Tetrahymena* (52, 53) et *Vorticella* (209). Nous avons examiné la relation $D_{(43)} = f(D_{(0)})$ pour les flacons témoins au cours de la mise en application du test durant les années 1973 et 1974 (figure 40). On observe une grande dispersion des points obtenus au cours de chaque cycle annuel. Dans ces conditions, il est inutile de rechercher une relation en $D_{(43)}$ et $D_{(0)}$. Pour apprécier la reproductibilité de la croissance de *Colpidium*, nous avons calculé, durant une année, chaque nombre de génération moyen ($\overline{NG}_{(43)}$) obtenu dans les séries témoins. A chaque valeur de $\overline{NG}_{(43)}$ est associé un écart type σ . L'expression $\sigma/\overline{NG}_{(43)} \times 100$ exprime le coefficient de dispersion de la série témoin en pourcentage de $\overline{NG}_{(43)}$. Nous avons ensuite représenté les histogrammes cumulatifs de la fréquence des coefficients de dispersion en les regroupant en classes de 1 %, ceci pour les deux périodes consécutives d'étude (figure 41). Pour la période 1973-74 (51 séries témoins) 90 % des séries présentent une dispersion inférieure à 6 % ; deux séries ont une dispersion supérieure à 10 %. En 1974-75 (57 séries) les résultats se sont sensiblement améliorés, deux séries possédant une dispersion supérieure à 6 %. Les cultures réalisées le même jour présentent donc une excellente reproductibilité, la dispersion maximale se situant aux alentours de 6 %. La sensibilité de la méthode de test n'est donc pas diminuée car la comparaison des cultures intoxiquées se fait toujours avec le témoin interne de chaque expérience.

La cause des fluctuations constatées au cours de l'année est probablement liée à la suspension bactérienne servant de nourriture au *Colpidium*. La méthode de culture en masse sur milieu solide gélosé ne permet pas d'obtenir une homogénéité des suspensions au cours du temps ; les lots de fabrication, la méthode de préparation du milieu, le délai entre la fabrication et l'utilisation du produit, constituent autant de facteurs variables influant sur la qualité nutritive des bactéries. La standardisation des suspensions de bactéries pourrait à l'avenir se faire à partir d'un stock provenant d'une seule fermentation et conservé à l'état congelé ou lyophilisé.

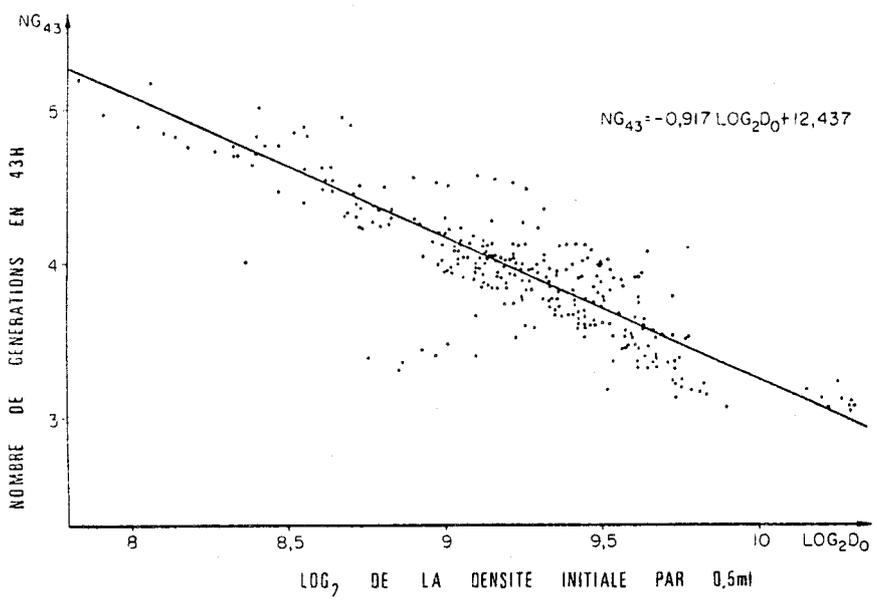
- Influence de la densité initiale ($D_{(0)}$) sur la valeur de $NG_{(43)}$
obtenue : dans l'équation $NG_{(43)} = \log_{(2)} D_{(43)} - \log_{(2)} D_{(0)}$, il est important de vérifier si le terme $\log_{(2)} D_{(0)}$ est négligeable ou non devant le terme $\log_{(2)} D_{(43)}$; dans la négative, le nombre de générations observé diminuerait quand $D_{(0)}$ augmenterait. Si une série de flacons possède une densité initiale moyenne $\overline{D_{(0)}}$ significativement différente de celle observée dans le témoin, la formulation des résultats devra éliminer cette cause d'erreur par une analyse de covariance entre les séries. Nous avons recherché s'il était possible d'établir une relation $NG_{(43)} = - a \log_{(2)} D_{(0)} + \log_{(2)} D_{(43)}$.

Dans le cas d'un rendement exactement constant d'une expérience à l'autre, a doit être théoriquement égal à 1. Nous avons vu précédemment que le rendement n'était pas identique sur une longue période ; la dispersion

devrait donc retentir sur la valeur de a . La fig. 42 p. 154 montre les résultats obtenus pendant les deux périodes successives. Les tableaux 15 et 16 permettent d'examiner les caractéristiques des équations obtenues : la corrélation est très bonne pour l'année 1973-74 ($r = 0.90$), un peu moins nette pour la période 1974-75 ($r = 0.82$). Pour faciliter les calculs, il est intéressant de rechercher si la courbe de régression logarithmique peut être assimilée à une régression linéaire au moins dans une zone de densité initiale de ciliés compatible avec l'expérimentation. Nous avons calculé les régressions linéaires $NG_{(43)} = a'D_{(0)} + Cte$ pour les deux périodes d'étude et nous avons étudié leur possible assimilation à la régression logarithmique. L'ensemble des résultats est rassemblé en particulier dans la fig.43 p. 156 et le tableau 18. Au cours de l'année 1973, le nuage de points est manifestement écarté de la régression linéaire, surtout aux basses concentrations initiales en *Colpidium* ; en 1974, la distribution est plus régulière. Le tableau 18 montre de plus, que la correspondance entre les deux équations de régression utilisables est très limitée pour l'année 1973 et cohérente pour l'année 1974. Il est donc possible de pratiquer une analyse de covariance simple pour corriger les déviations dues à une différence significative de densité initiale entre les séries (136, 204).

L'examen de la figure 44 fait apparaître une distribution différente des $D_{(0)}$ obtenus au cours des deux années ; en 1973, on observe une dissymétrie dans la distribution alors qu'en 1974, elle s'apparente à une distribution normale. Les réglages des instruments de numération (Coulter Counter) apparaissent comme les causes essentielles de ces phénomènes.

a)



b)

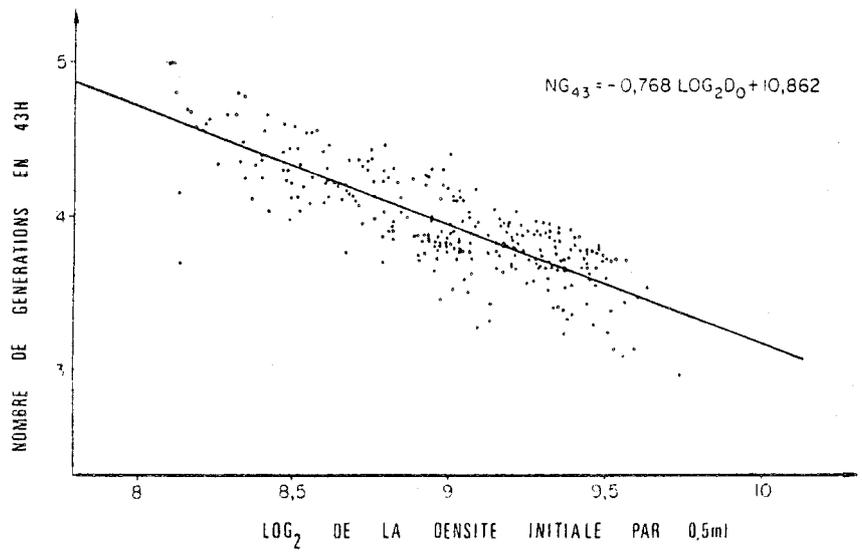


FIG. 42. Relation entre le log. 2 population initiale et nombre de génération obtenu en 43 heures

a) année 1973-74

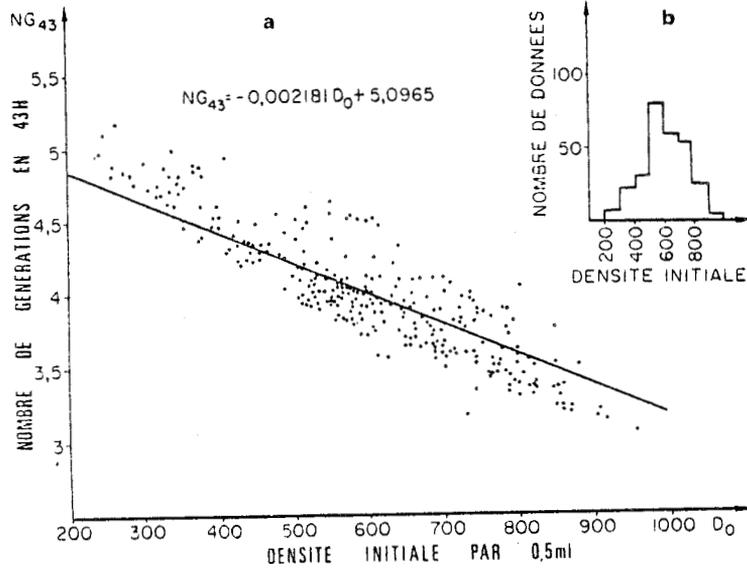
b) année 1974-75



TABLEAU 18a. Etudes des corrélations logarithmiques (1) et linéaires (2) entre NG et D_0 . Correspondances entre les valeurs de NG obtenues à partir de (1) et (2), compte tenu de l'intervalle de confiance de la moyenne de ces relations. PERIODE 1973.

		Equation logarithmique (1)	Equation linéaire (2)	
Equation générale		$- 0.917 \log_{(2)} D_0 + 12.4374$	$NG = 0.002084 D_0 + 5.28107$	
Coefficient de corrélation (r)		0.90	0.88	
Variation de NG lié à D_0		$r_{(0.01)} = 0.113$	$r_{(0.01)} = 0.113$	
Signification de la pente		81 %	77.7 %	
Intervalle de confiance de la pente		$t = 36.4$	$t = 32.12$	
		$t_{197-1(0.01)} = 3.29$	$t_{197-1(0.01)} = 3.29$	
		$/_{(0.05)} = 0.0493$	$/_{(0.05)} = 0.000127$	
		$/_{(0.01)} = 0.0649$	$/_{(0.01)} = 0.000167$	
Valeurs de D_0	Valeurs de NG calculées par (1)	Valeurs de NG calculées par (2)	Correspondance entre valeurs compte tenu de l'intervalle de confiance	
			p = 0.05	p = 0.01
300	4.89	4.65	-	-
400	4.51	4.45	+	+
500	4.21	4.24	+	+
600	3.97	4.03	-	+
700	3.77	3.82	-	+
800	3.59	3.61	+	+

A)



B)

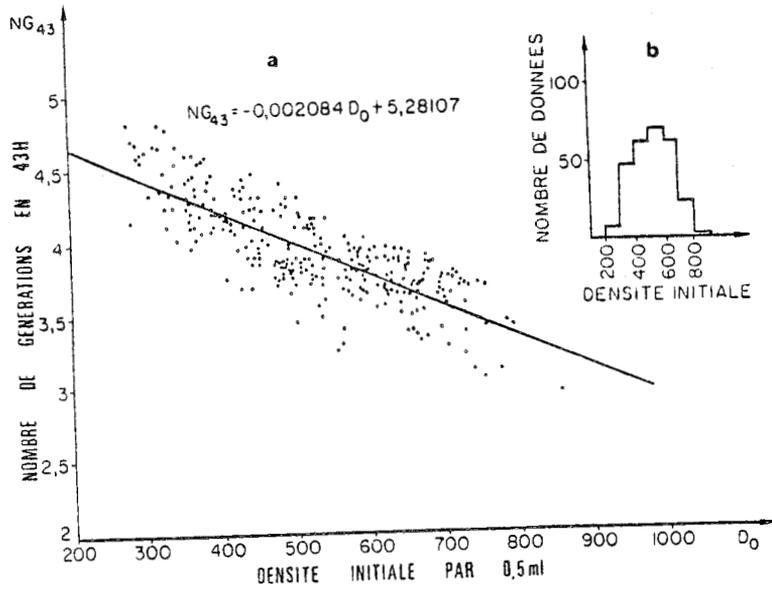


FIG. 43. Relation en population initiale et nombre de génération obtenu en 43 heures

A : année 1973 - 74

B : année 1974 - 75

a) nuage de points et droite

b) histogramme de distribution des densités initiales



TABLEAU 18b. Etudes des corrélations logarithmiques (1) et linéaires (2) entre NG et D₀. Correspondances entre les valeurs de NG obtenues à partir de (1) et (2), compte tenu de l'intervalle de confiance de la moyenne de ces relations. PERIODE 1974.

		Equation logarithmique (1)	Equation linéaire (2)	
Equation générale		NG = - 0.7685 log ₍₂₎ D ₀ + 10.8621	NG = - 0.002181 D ₀ + 5.0965	
Coefficient de corrélation (r)		0.821 r _(0.01) = 0.113	0.812 r _(0.01) = 0.113	
Variation de NG lié à D ₀		67.5 %	65.9 %	
Signification de la pente		t = 24.03 t _{297-1(0.01)} = 3.29	t = 23.19 t _{297-1(0.01)} = 3.29	
Intervalle de confiance de la pente		I _c / _{0.05} = 0.062 I _c / _{0.01} = 0.082	I _c / _{0.05} = 0.00018 I _c / _{0.01} = 0.00024	
Valeurs de D ₀	Valeurs de NG calculées par (1)	Valeurs de NG calculées par (2)	Correspondance entre valeurs compte tenu de l'intervalle de confiance	
			p = 0.05	p = 0.01
300	4.55	4.44	+	+
400	4.22	4.22	+	+
500	3.97	4.00	+	+
600	3.77	3.79	+	+
700	3.60	3.57	+	+
800	3.45	3.35	+	+

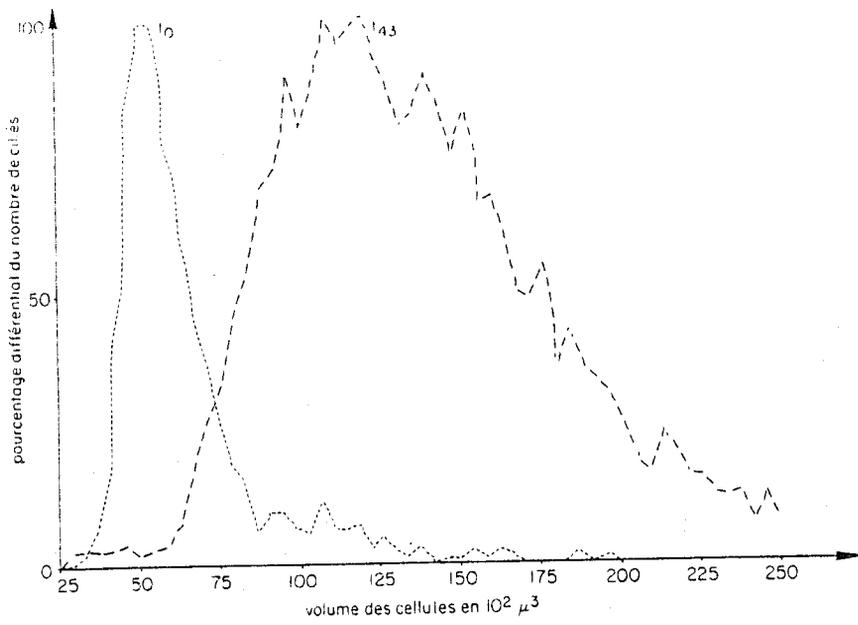


FIG. 44 Distributions observées chez les populations de *Colpidium* au temps $t = 0$ (inoculum) et $t = 43$ h. Enregistrements directs obtenus avec l'analyseur P 64-XY



- Influence du réglage des seuils de comptage sur les données numériques : au cours de l'année 1973, l'absence de Channelyser ne nous a pas permis d'étudier les distributions en taille des Ciliés dans les cultures. Nous avons donc ajusté les seuils suivant la méthode classique, les contrôles étant effectués par comptage en hématimètre. La détermination du seuil est perturbée par la présence, dans les cultures de *C. campylum*, de pelotes fécales plus ou moins agglomérées produisant un bruit de fond. Ce phénomène est faible au temps 0 car l'inoculum est prélevé après décantation de la culture en masse, ce qui permet de séparer le dépôt fécal. Dans les cultures de 43 h, au contraire, la décantation n'est pas possible et l'erreur peut se produire si le seuil de détection du Coulter est trop bas. Pour éliminer ces causes d'erreur, nous avons adopté un seuil de détection uniforme pour tous les dénombrements.

En 1974, l'étude des cultures à l'aide du Channelyser nous a permis de séparer très nettement les pelotes fécales des *Colpidium* pour les cultures de tout âge ; de plus, elle a révélé une grande différence dans les tailles et les dispersions entre l'inoculum initial et la culture de 43 h (figure 44). Ces différences s'expliquent aisément car l'inoculum est constitué par une culture de 96 h ; les Ciliés y sont plus petits et leur taille est moins dispersée que dans les cultures en début de phase stationnaire. Ces résultats avaient été enregistrés dans un travail antérieur sur le nutrition de *Colpidium*.

Le choix d'un seuil de comptage uniforme doit tenir compte également de la petite taille des Ciliés dans l'inoculum. L'erreur relative commise

TABLEAU 19. Divergences des densités initiales moyennes relevées entre les séries de flacons pour les années 1973 (inoculation à la pipette standard) et 1974 (inoculation à la pipette automatique avec cône à usage unique).

Année	Nombre d'expériences	Pas de différence significative entre séries	Différences significatives	
			Seuil de 5 %	Seuil de 1 %
1973	52	32	20	15
1974	63	46	17	8



sur la numération au temps 0 sera toujours plus grande que celle effectuée sur les cultures de 43 h : $D_{(0)}$ mesuré sera plus petit que $D_{(0)}$ réel et le nombre de générations calculé sera plus grand que dans la réalité. Cette erreur tend à accentuer la courbure de la relation : $NG = a'D_{(0)} + Cte$ pour les petites valeurs de $D_{(0)}$. La figure 43 illustre parfaitement cette influence. La distribution des points obtenus en 1973 montre une courbure plus accentuée qu'en 1974 où le seuil de détection du Coulter a été corrigé.

3) CONSEQUENCES AU NIVEAU DE L'ANALYSE DES RESULTATS

La relation existant entre NG et $D_{(0)}$ n'est utile que s'il existe des différences importantes entre les densités initiales moyennes des séries, permettant soit un ajustement, soit une réduction de l'erreur obtenue sur NG. Nous avons examiné, pour les années 1973 et 1974, le nombre d'expériences où l'analyse de variance a révélé une différence significative entre les densités initiales moyennes des séries. Pour l'année 1973, des pipettes stériles classiques ont été utilisées. Pour l'année 1974, les inoculations ont été exécutées avec des pipettes à volume réglable, équipées de cônes stériles à usage unique. Les résultats du tableau 19 montrent une nette amélioration consécutive à l'emploi de la pipette avec cônes à usage unique. Mais le progrès est insuffisant pour éviter toute fluctuation significative entre les moyennes des séries. Une correction est donc nécessaire.

II - APPLICATION AUX POLLUANTS MINERAUX ET ORGANIQUES HYDROSOLUBLES

Le tableau 20 montre les Doses Minimales Actives obtenues pour des substances variées à l'aide de *Colpidium campylum* et, pour toutes celles pour lesquelles cela a été possible, la CI50 pour *Daphnia magna* (1) (déterminé d'après la norme NF T 90301), la DL50 pour *Brachydanio rerio* (2) (NF 90303) et la CMI pour deux espèces bactériennes. Les résultats des tests AFNOR nous ont été gracieusement communiqués par l'IRCHA ; les CMI sur bactéries nous ont été communiquées par DELMAERE et JACKUBCZAK (inédit). Pour chaque substance, nous avons calculé le rapport entre la DMA *Colpidium* et les doses inhibitrices pour chaque type d'organisme. Le \log_{10} de ce rapport, que nous proposerons d'appeler magnitude de sensibilité (M) par rapport aux autres tests biologiques pour une substance donnée, permet de comparer efficacement la susceptibilité de *Colpidium campylum* à celle d'autres organismes :

si $M = 0$, la sensibilité est équivalente

si $M > 0$, le *Colpidium* est moins sensible

si $M < 0$, le *Colpidium* est plus sensible

Une différence d'une magnitude correspond à une sensibilité 10 fois plus grande ou plus petite.

Si l'on considère que la sensibilité à un toxique dans une classe d'organismes (Ciliés, Crustacés) peut varier d'une magnitude, on peut envisager qu'il existe 3 zones de réponse quand on compare *Colpidium* aux autres organismes :

TABLEAU 20. Dose Minimale Active (D.M.A.) obtenue pour quelques toxiques avec *C. campylym*. Comparaison avec la CI 50 *Daphnia magna*, la DL 50 *Brachydanio rerio* et les CMI pour *Escherichia coli* ATCC 10536 et *Bacillus subtilis*.

Les doses sont exprimées en mg/l (P.P.M.)

		D.M.A. <i>Colpidium</i>	CI 50 <i>Daphnia</i>	DL 50 <i>Brachydanio</i>	CMI <i>E. coli</i>	CMI <i>B. subtilis</i>
Al	$Al(NO_3)_3$	0,5	0,28		30	10
As	AsO_3Na	10	11,5			
Cd	$Cd(NO_3)_2$	0,16	0,08	11,04	5	0,1
CN	KCN	0,4	0,6	0,12		
	SCNK	20				
	$Fe(CN)_6K_3$	> 100	29,5			
Cr	CrO_4K_2	10				
	$Cr_2O_7K_2$	10	0,2	39		
Co	$Co(NO_3)_2$	0,1	22		10	10
Cu	$CuSO_4$	0,25	0,04	0,27	5	20
F	FNa	25	235	723		
Hg	$HgCl_2$	0,04	0,025	0,22	2	0,05
I	IK	1				
Li	$LiNO_3$	> 100				
Mn	$MnCl_2$	10	17,8	> 100		> 100
	MnO_4K	1,6	0,64			



TABLEAU 20 (suite)

		D.M.A. <i>Colpidium</i>	CI 50 <i>Daphnia</i>	DL 50 <i>Brachydanio</i>	CMI <i>E. coli</i>	CMI <i>B. subtilis</i>
Mo	MoO_3Na	100				
NH_4	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100				
Ni	$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$	0,1	7,9	51,6	15	10
Pb	$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	0,4	0,54		200	30
Se	SeO_2	0,04	0,1		70	> 200
Sn		1	50		60	90
Zn	ZnSO_4	25	9,3	17,5	10	10
Acétone		3.120		8.750		
Acétonitrile		3.100				
Benzène		< 100	84			
Carbitol		9.600				
Diméthylformamide		1.760	9.480	12.350		
Ethanol		3.200	16.000	11.500		
Phénol		100	36	30,8		
Tetrapropylbenzene-sulfonate		5	35			
Sodium lauryl sulfate		10-30				
Gluconate de sodium		8.000				

BIS
LILLE

$M > 0,5$ *Colpidium* est moins sensible
 $- 0,5 < M < 0,5$ la sensibilité est équivalente
 $M < -0,5$ *Colpidium* est plus sensible

Nous considérons donc comme significative une différence de sensibilité entre organismes supérieure à 3,2, en supposant que le *Colpidium* est représentatif parmi les Ciliés.

Si l'on compare la susceptibilité de *Colpidium campylum* à celle d'autres organismes (fig.45P.166) on se rend compte que, dans le cas de *Daphnia magna*, la sensibilité de *Colpidium* est moindre dans 2 cas, équivalente dans 11 cas, et plus grande dans 6 cas. Parmi les polluants très significatifs dans l'environnement, seul le chrome hexavalent et, à un bien moindre degré, le cuivre, sont les seuls à ne pas être détectés d'une manière satisfaisante par *Colpidium*. Notre test constitue donc un bon essai pour les métaux lourds en général, pour les solvants organiques et pour certains détergents.

Par comparaison avec *Brachydanio rerio*, sur 12 substances, *Colpidium* est moins sensible pour 2 produits (Phénol et CN^-), la magnitude étant tout juste supérieure au seuil de signification ; la sensibilité est équivalente pour 2 produits et plus grande pour les 8 autres, en particulier pour presque tous les métaux lourds.

La différence est encore plus grande avec les bactéries, M étant compris entre - 1,5 et - 2,5, c'est-à-dire que le *Colpidium* est en moyenne

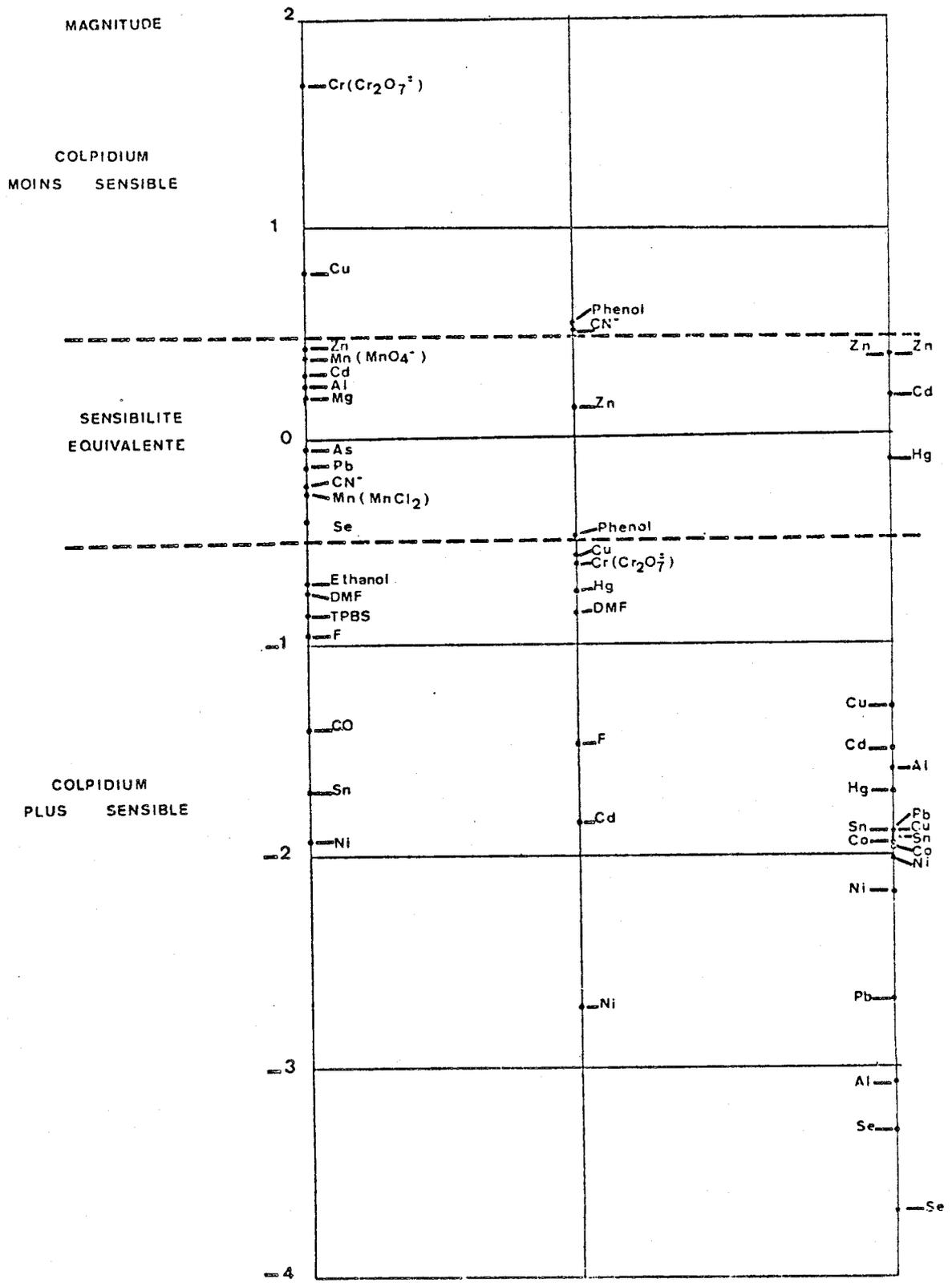


FIG. 45 Magnitude de sensibilité de *C. campylum* par rapport à *Daphnia magna*, *Brachydaniorerio*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* pour un certain nombre de toxiques hydrosolubles

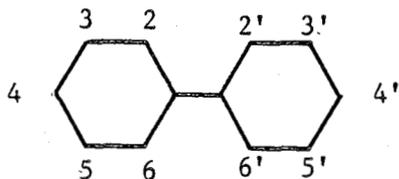


de 30 à 300 fois plus sensible que les bactéries aux toxiques, l'extrême étant observé pour l'acide sélénieux où *Colpidium* est de 2000 à 5000 fois plus sensible (M compris entre -3 et -4).

III - APPLICATION A L'ETUDE DES POLYCHLOROBIPHENYLES

Les Polychlorobiphényles sont des isolants utilisés dans la fabrication des condensateurs, mais aussi des plastifiants. Dans l'environnement, ils se comportent d'une manière analogue aux insecticides organochlorés.

La structure du noyau biphényle et la numération conventionnelle des carbones sont figurées ci-dessous.



Les isomères sont identifiés par citation des atomes de carbone où sont fixés les atomes de chlore (2-2'-3' trichlorobiphényle).

Le pyralène 3010 (mélange commercial de polychlorobiphényles) possède la composition générale théorique suivante :

Dichlorobiphényles	12 %
Trichlorobiphényles	57 %
Tetrachlorobiphényles	30 %
Pentachlorobiphényles	1 %
TOTAL	100 %

L'analyse du mélange commercial, la synthèse des isomères et les dosages ont été réalisés par le service de Mme le Professeur ERB (UER de pharmacie - LILLE).

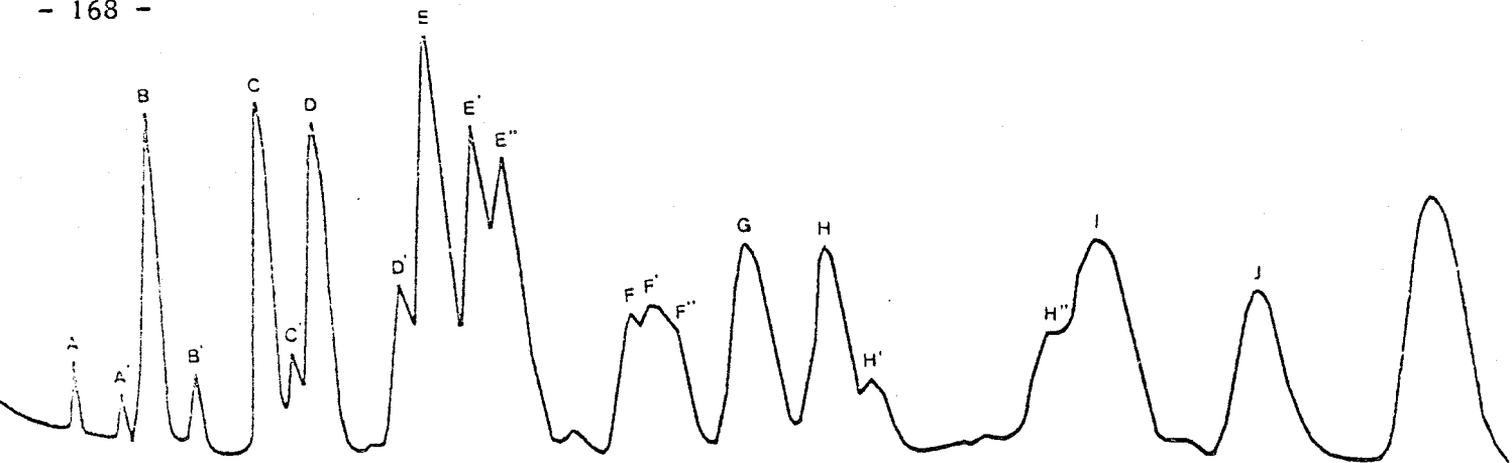


FIG. 46. Analyse chromatographique du Pyralène 3010 (Document du Service du Professeur ERB).

TABLEAU 21. Composition centesimale du Pyralène 3010.

Dénomination du pic		% du total	% théorique	
A	2-2'	1,1 %	Total	
A'	2-4	0,6 %	Dichlores	12 %
A''	2-5	1,6 %	12 %	
B	2-3	7,1 %		
B'	3-5	1,6 %		
C 2-2'-5'		13,8 %	Total	
D	2-2'-3'	10 %	Trichlorés	57 %
D'	3-2'-5'	4,8 %	44 %	
E 4-2'-5'		15,4 %		
F 2-5-2'-5'		4,8 %	Total	
G	2-3-2'-5'	8,7 %	Tetrachlorés	30 %
H'	2-3-2'-3'	-	35,3 %	
I	2-5-3'-4'	19,8 %		
J	2-3-3'-4'			
Pentachlorés		0 %	1 %	
TOTAL.		89 %	100 %	

BIS
LILLE

L'analyse chromatographique révèle en fait la présence de très nombreux isomères dans chacune des catégories énoncées ci-dessus (figure 46, tableau 21). On peut noter une discordance entre les valeurs théoriques et mesurées pour les trichlorobiphényles. Le bilan révèle environ 10 % de produits non identifiés.

1) METHODES D'ADDITION DES PCB

Après test de 5 solvants (éthanol, carbitol, diméthylformamide, acétone, acétonitrile), nous avons retenu l'éthanol comme solvant de travail.

Mesure de la bioconcentration :

Nous avons mesuré le pourcentage de PCB retenu par la culture. Le facteur d'accumulation a été calculé en ramenant ce pourcentage au biovolume de la population de Ciliés.

Un échantillon moyen de 25 ml pris sur une série de 5 flacons a été soumis à une analyse dimensionnelle avec l'analyseur Coulter P 64 et l'intégrateur MCV hématocrite. Le volume moyen a été calculé sur trois mesures. Le produit du volume moyen par le nombre d'individus contenus dans 1 ml constitue le biovolume total (V) par ml. Un second échantillon (50 ml) a été centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes. Le culot de Ciliés est lavé 2 fois

dans l'eau distillée. Le toxique est alors dosé dans le culot et dans l'ensemble surnageant + eaux de lavages. Si Q est la quantité de PCB ajoutée en début d'expérience et Q_1 la quantité retrouvée dans les Ciliés, le facteur de concentration sera $F = \frac{Q_1}{Q \times V}$

2) RESULTATS

Ajustement de la concentration en solvant :

Nous avons vérifié si la concentration en alcool influait sur la bioaccumulation des PCB par *Colpidium* en choisissant comme modèle le 2, 4, 5, 2', 5' pentachlorobiphényle (tableau 22). La bioaccumulation augmente au-dessous de 4 ppm en fonction de la quantité de PCB ajouté, mais l'alcool ne modifie pas le facteur de concentration pour une même quantité de produit.

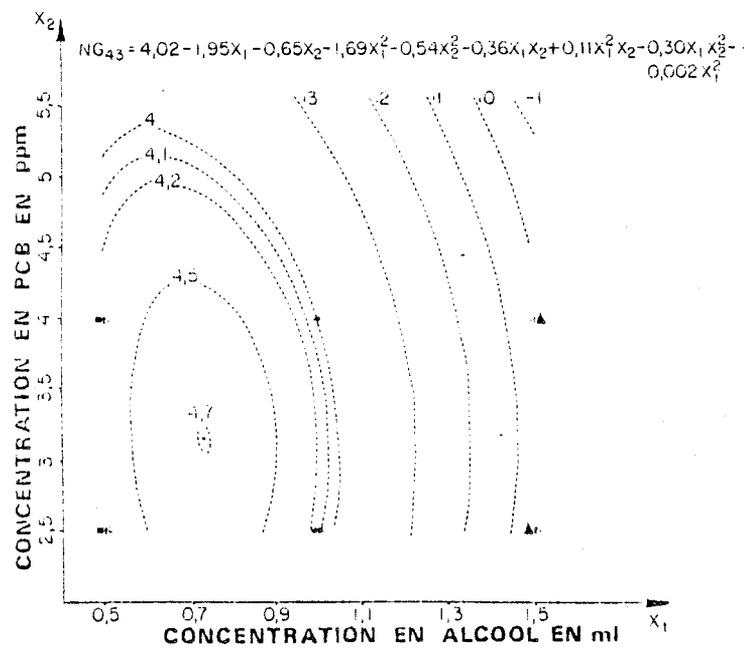
Nous avons également vérifié s'il existait une interaction entre toxique et solvant et quelle dose d'éthanol il fallait utiliser pour minimiser cette interaction. Pour cela, nous avons réalisé une expérience factorielle destinée à mettre en évidence une synergie ou un antagonisme entre le toxique et son solvant. Le plan factoriel utilisé est indiqué ci-dessous, les + indiquant les combinaisons testées.

TABLEAU 22. Influence de la concentration en alcool sur la bioaccumulation de 2-4-5-2'-5' pentachlorobiphenyle par *C. campylum*.

% de PCB retenu dans les cellules à la 43ème heure.

Alcool x/56 ml	0,5 ml	1 ml	1,5 ml
P C B			
2,5 ppm	33,3	33,3	34,8
4 ppm	31,25	31,6	33,28
6,3 ppm	47	47,8	48
10 ppm	55,6	55,4	57,3





$r^2 = 0,996$

Coefficients	Valeur	Ecart type	Seuil de signification
	4,02	0,2	
X1	-1,95	0,14	0,01
X2	-0,65	0,14	0,01
X1 ²	-1,69	0,25	0,01
X2 ²	-0,54	0,25	0,05
X1X2	-0,36	0,1	0,01
X1 ² X2	+0,11	0,17	N.S.
X1X2 ²	-0,3	0,17	N.S.
X1 ² X2 ²	-0,002	0,3	N.S.



Fig. 47 : Influence de la concentration en alcool sur la toxicité du 2-4-5-2'-5' pentachlorobiphenyle.

		PCB mg/litre				
		0	2,5	4	6,3	10
Alcool ml/56 ml	0	x				
	0,5	x	x	x	x	x
	1	x	x	x	x	x
	1,5	x	x	x	x	x

L'équation de la surface de régression $NG = f(\text{éthanol}, \text{PCB})$ a été calculée et exprimée sous forme d'isopleths (ligne indiquant les isoeffets des combinaisons entre les 2 produits) dans la figure 47. L'examen des coefficients de l'équation indique que, dans la gamme des doses utilisées, l'alcool possède un effet toxique très significatif (les termes linéaires et quadratiques sont hautement significatifs), avec un coefficient supérieur à celui du PCB. Il y a synergie entre l'alcool et le PCB. Le graphique indique clairement qu'en dessous de 4 ppm de pentachlorobiphényle, le seul effet enregistré est celui du solvant. L'effet du PCB ne se fait nettement sentir qu'en présence de concentrations en éthanol au plus égales à 1ml/56ml. Au dessus de cette concentration, l'effet toxique de l'alcool l'emporte nettement sur celui du PCB. L'effet de synergie cesse d'être significatif quand on emploie des doses d'alcool inférieures à 0,5 ml/56 ml. Les résultats indiquent que l'inoculation des PCB dans un volume d'alcool de 0,25 ml/56 ml permet d'éviter les biais découlant des interactions entre le toxique et son solvant.

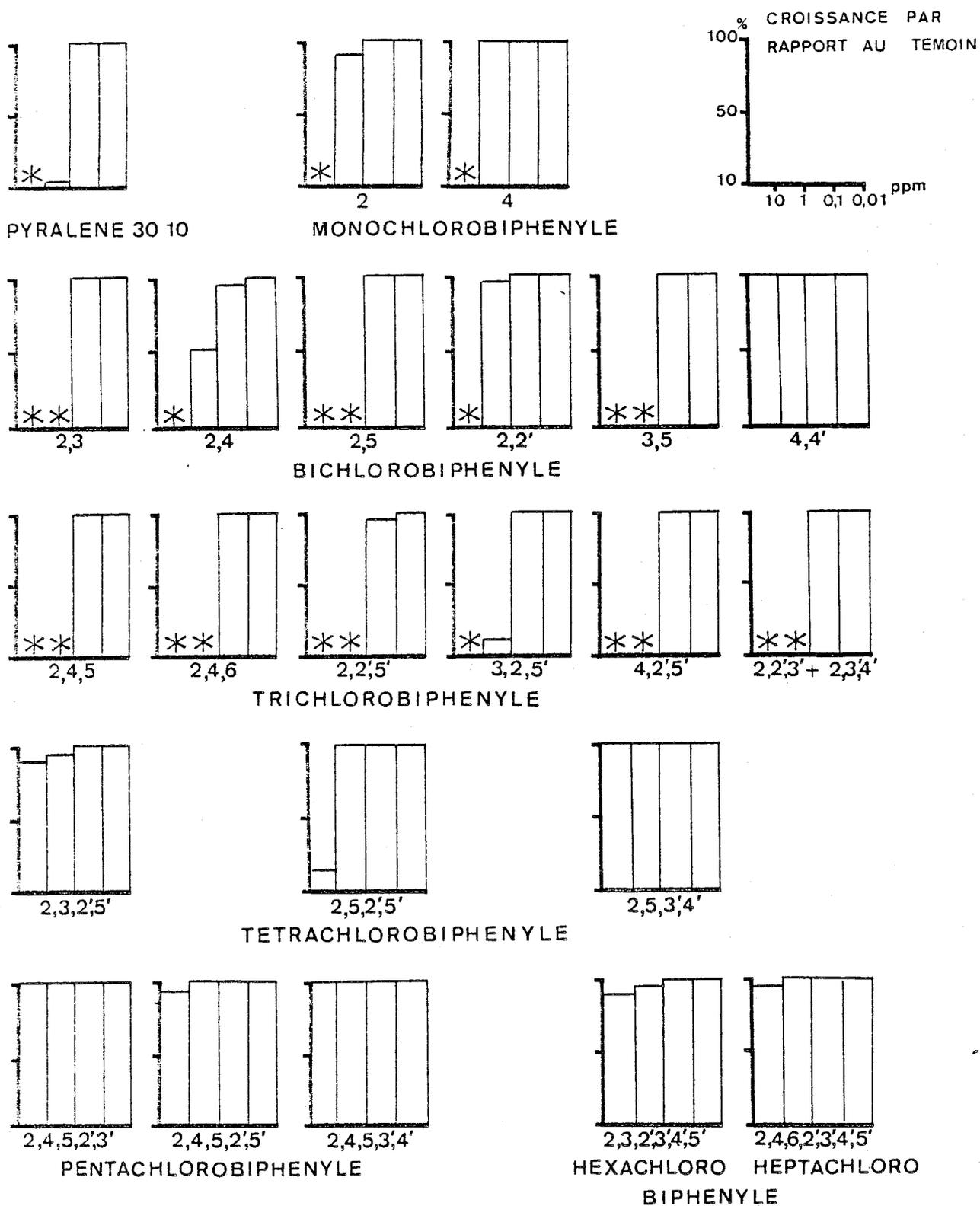
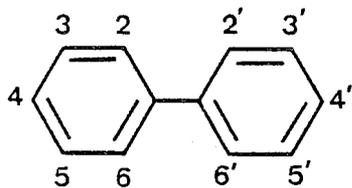


FIG. 48 -

Toxicité du Pyralène 3010 et de 22 isomères de polychlorobiphenyles pour *C. campyllum*.

Le signe * indique que les cellules sont tuées



Toxicité des isomères purifiés de PCB :

La figure 48 montre les croissances observées en présence de pyralène 3010 et de 22 isomères purifiés de polychlorobiphényles testées à des concentrations comprises entre 0,01 et 10 mg/l. La croissance est exprimée en % du témoin et le signe * indique que les cellules ont été tuées à la concentration testée.

Deux facteurs agissent nettement sur la toxicité :

- la charge en chlore des molécules ;
- la position des atomes de chlore sur le noyau diphenyle.

Chez tous les constituants ayant 1, 2 ou 3 atomes de chlore (à une exception près), les Ciliés sont tués à la dose de 10 mg/l. Le même résultat est observé avec 8 isomères sur 14 pour une concentration de 1 mg/l. Le 4-4' dichlorobiphényle est totalement atoxique, même à des doses extrêmement élevées (100 mg/l). Quand le nombre d'atomes de chlore substituants atteint 4, la toxicité diminue fortement (2,5, 2',5 tetrachlorobiphényle) ou devient pratiquement nulle. On peut mettre en évidence une relation entre la position des atomes de chlore sur le noyau et la toxicité. La position 4-4' donne des produits inoffensifs ; les substitutions en position 2-3, 2-5 et 3-5 donnent des isomères plus actifs que les substitutions en 2-2' et 2-4 (chez les dérivés dichlorés). Sur une molécule dichlorée en 2-5, la substitution d'un

TABLEAU 23. Accumulation de PCB par *C. campylum*.

Les cases non remplies correspondent aux essais où la trop grande toxicité du PCB ne permet pas de mesure interprétable.

Isomères	% de PCB retenu à la 43ème heure		
	0,1 ppm	1 ppm	10 ppm
2 monochlorobiphényle	44,8	44,8	-
4-4' Dichlorobiphényle	34,4	49,2	57,4
2-2'-5' Trichlorobiphényle	33	-	-
2-4-5 Trichlorobiphényle	29,4	-	-
3-2'-5' Trichlorobiphényle	34	40,6	-
2-5-2'-5' Tétrachlorobiphényle	36,8	40,7	49,2
2-3-2'-3'-4'-5' Hexachlorobiphényle	33,6	49	54
2-4-6-2'-3'-4'-5' Heptachlorobiphényle	49	54	56
Pyralène 3010	42	36	-



chlore supplémentaire en 3' diminue la toxicité du produit alors que les substitutions en 4, en 2', en 4' ne la modifient pas fondamentalement. Sur une molécule dichlorée en 2-4, l'ajout d'un chlore en 5 ou en 6 augmente la nocivité. Chez les dérivés tétrachlorés, la substitution en 3 ou en 5 joue un rôle très significatif.

Accumulation des PCB par *Colpidium campylum* :

Le tableau 23 indique les pourcentages de polychlorobiphényles retrouvés en fin de culture dans les cellules. La rétention varie, selon les isomères, entre 30 et 50 % de la quantité initiale de produit et elle augmente en fonction de la concentration. Les produits peu toxiques sont concentrés plus fortement. Compte tenu du biovolume occupé par *C. campylum* dans la culture, le facteur d'accumulation varie entre 2500 et 3500 pour un temps de contact de 43 heures, ce qui est considérable.

3) RELATION ENTRE SOLUBILITE, STRUCTURE ET TOXICITE DES PCB

La toxicité des isomères de polychlorobiphényles peut être régie par plusieurs facteurs, parmi lesquels nous retiendrons principalement la solubilité et la stéréochimie des molécules testées.

Les travaux de WEILL, DURE et QUENTIN (228) montrent que la solubilité des isomères de PCB diminue quand le nombre d'atomes de chlore augmente.

La solubilité des isomères monochlorés varie de 1 à 4 mg/l ; celle des dichlorés tourne autour de 0,5 mg/l (excepté pour le 4-4' dichlorobiphényle qui est dix fois moins soluble) ; celle des trichlorés oscille autour de 0,2-0,3 mg/litre. Nos résultats montrent que les isomères trichlorés sont plus toxiques que les monochlorés tout en étant de 5 à 10 fois moins soluble mais leur toxicité reste toutefois compatible avec la quantité maximale de produit dissous susceptible d'être au contact des cellules. Le 4-4' dichlorobiphényle, qui n'est pas toxique, est extrêmement peu soluble. En revanche les faibles toxicités relevées pour les isomères contenant 5 ou 6 atomes de chlore se sont manifestées pour des doses de 10 mg/l. Or la solubilité maximale de ces produits est de l'ordre de 0,5 à 5 µg/l. Dans ces conditions le Gilié ingère massivement le PCB à l'état précipité et c'est à l'intérieur de la vacuole que la mobilisation du produit et sa toxicité se manifestent. Le fait que la solubilité des produits et leur toxicité ne soient pas liées systématiquement nous incline à penser que la stéréochimie des molécules joue un rôle prédominant.

La position des atomes de chlore sur la molécule peut intervenir de deux manières différentes :

- Selon la position des substituants chlorés, on peut obtenir un déplacement des plans des noyaux benzéniques l'un par rapport à l'autre et la molécule change de conformation stérique. Ses possibilités d'accès à sa cible au niveau moléculaire peuvent être modifiées.

- La toxicité peut dépendre en partie de la possibilité d'hydroxylation et de métabolisation. Les travaux de BERLIN, GAGE et HOLM (20) laissent entendre que l'activité des PCB dépendrait de l'hydroxylation de la molécule qui s'effectuerait en position para de la charnière du biphényle. Ceci expliquerait la totale innocuité du 4-4' dichlorobiphényle. On admet également que la présence de carbones vicinaux libres constitue un facteur conditionnant l'hydroxylation. Lors de nos expériences, aucun produit de dégradation ou d'hydroxylation n'est apparu sur les chromatogrammes de sorte que la toxicité des produits pour *Colpidium* paraît liée à la structure des molécules elles-mêmes.

La possibilité d'adsorption sur les parois des flacons et la forme des PCB dans le milieu peuvent également jouer un rôle non négligeable. Les travaux de SCHOOR (185) montrent que les PCB en général se présentent sous forme d'agrégats de molécules en équilibre dans le solvant et que l'émulsion de PCB est instable. Le produit est très rapidement adsorbé sur le verre, l'acétate de cellulose, les polyacétates, les polyallomères et même l'acier inoxydable. Ce sont les dérivés les moins chlorés qui se fixent le plus intensément et le plus rapidement. Le rinçage répété des récipients ne permet pas toujours une élution totale du produit fixé qui est plus riche que le mélange initial en isomères les moins chlorés. SCHOOR signale également les possibilités d'évaporation des PCB. L'adsorption modifie la quantité totale de PCB présent dans le milieu de culture et par là même peut modifier les résultats des tests, surtout dans le cas des dérivés les moins chlorés. Dans le cas des mélanges, les composés les plus toxiques (bi et trichlorés) disparaissent du milieu et modifient la toxicité.

Les principaux autres résultats concernant la toxicité des PCB chez les Ciliés ont été obtenus avec des mélanges commerciaux. L'Aroclor 1242 n'est pas toxique pour *Tetrahymena* à la dose de 20 mg/l (143), COOLEY (44, 45, 46) trouve des seuils de toxicité de l'ordre du mg/l pour les Aroclor 1248 et 1260 et de l'ordre du µg/l pour l'Aroclor 1254. Ce dernier résultat a été fortement critiqué par PERSOONE et coll. (156) qui, avec *Euplotes vannus* n'ont pas détecté de toxicité en présence de 10 mg/l d'Aroclor 1254. Les résultats que nous avons obtenus avec *Colpidium campylum* sont du même ordre que ceux obtenus par COOLEY avec les Aroclor 1248 et 1260 : la DMA du pyralène 3010 est comprise entre 0,1 et 1 mg/l. En revanche, nos mesures d'accumulation ont donné des résultats très supérieurs à ceux obtenus par ce même auteur. Pour expliquer ces différences, tant dans la toxicité que dans l'accumulation, plusieurs facteurs peuvent être invoqués.

- *Tetrahymena pyriformis* et *Colpidium campylum* sont deux Ciliés très voisins alors qu'*Euplotes* est beaucoup plus éloigné sur le plan taxonomique et possède une sensibilité différente.

- L'activité d'un mélange complexe peut différer totalement de celle des produits administrés isolément. Ainsi nous avons constaté qu'un mélange contenant 66 % de 2-4-5-2'-3' et de 34 % de 2-4-5-3'-4' pentachlorobiphényle diminue très sensiblement la croissance de *C. campylum* à la dose de 10 mg/l alors qu'administrés séparément à la même dose, ils sont totalement atoxiques.

Si nous reprenons la composition générale du pyralène 3010 pour 1 mg/l de produit et si nous calculons la concentration respective des principaux constituants, nous voyons que 54 % du mélange est composé de produits tuant les ciliés à la dose de 1 ppm, 13 % des produits ont une toxicité nette à 1 ppm et 33 % ne sont que peu ou pas toxiques. Le pyralène 3010, lui, inhibe presque totalement la croissance de *Colpidium*, sans toutefois tuer les cellules, à la dose de 1 mg/litre. A côté des synergies doivent donc se manifester des antagonismes qui diminuent la toxicité globale du produit. Ce résultat peut être également dû à l'adsorption de certains isomères sur les récipients en cours d'expérience qui modifie les proportions de produits en présence et les interactions possibles. L'adsorption diminue également la possibilité de bioaccumulation en immobilisant une partie importante du produit ajouté initialement (jusque 30 %).

- La solubilité des PCB dans les milieux et leur état de stabilité peut faciliter l'ingestion de polychlorobiphényles à l'état précipité ou micellaire. Chez les Ciliés ou l'endocytose est très active, cette voie de pénétration est très importante. Pour les plus fortes concentrations en PCB testées, on peut nettement observer, à l'intérieur des cellules de *Colpidium campylum*, le produit à l'état précipité concentré dans les vacuoles digestives. Dans ces conditions, les taux d'accumulation observés lors de nos expériences ne représentent que la quantité "instantanée" présente dans la cellule au moment du prélèvement. On peut alors envisager deux solutions :

. Le produit transite passivement et se trouve rejeté avec les résidus de digestion. Inclus dans les pelotes fécales, le PCB décante rapidement et n'est plus accessible aux autres ciliés.

. Le produit passe dans le cytoplasme et se trouve métabolisé ou stocké dans des endroits privilégiés.

En fait, dans le cadre de notre expérimentation, nous n'avons jamais observé de produits de métabolisation dans les cultures. En revanche les flocculats constitués par les pelotes fécales contiennent du PCB en grande quantité . Nous n'avons pas réussi à purifier ces pelotes fécales d'une manière suffisamment satisfaisante pour estimer quantitativement le PCB ainsi immobilisé mais nous pensons qu'en fait, une partie du produit transite passivement dans la cellule et n'est pas métabolisé par le *Colpidium*. Nous apporterons plus loin des résultats venant à l'appui de cette hypothèse.

Un dernier facteur pouvant favoriser l'accumulation des PCB chez *Colpidium campylum* est la possibilité d'adsorption du produit à la surface des bactéries utilisées pour alimenter notre Protozoaire durant les expériences. COOLEY (44, 45, 46) et MORGAN (143) ont testé les PCB sur *Tetrahymena* dans un milieu peptoné, contenant peu de particules, donc peu propice à ce type de pénétration à l'intérieur de la cellule.

IV - APPLICATION A L'ETUDE DES PESTICIDES

1) TOXICITE AIGUE

Méthode :

Tous les pesticides n'étant pas solubles dans l'éthanol, comme les PCB, nous avons utilisé systématiquement l'acétone à raison de 50 µl d'acéton dans 50 ml de milieu. Les concentrations habituellement rencontrées dans l'environnement étant très faibles, et la solubilité des pesticides en général peu élevée, nous avons testé des concentrations allant jusque 10 mg/litre au maximum. La plupart des espèces aquatiques étant tuées à des concentrations bien inférieures, cette limite peut être considérée comme très élevée.

Résultats :

Les résultats sont réunis dans le tableau 24 qui regroupe la DMA des pesticides pour *C. campylum*, la CI50 obtenue sur *Daphnia* (77, 183) et la magnitude de sensibilité de *Colpidium* par rapport aux crustacés.

Généralement, les pesticides n'ont qu'une faible toxicité pour *Colpidium campylum*. Quatre produits seulement sont toxiques à des doses

TABLEAU 24. Toxicité comparée de différents pesticides vis-à-vis de *Colpidium campylum* et de *Daphnia* (77) et magnitude de sensibilité de *Colpidium*.

Pesticide	DMA <i>Colpidium</i>	DL ₅₀ <i>Daphnia</i>	
	mg/l	mg/l	M
Aldrine	> 10	0,03	> 2,5
Azynphos éthyle	> 10	0,0032	> 3,5
Azynphos méthyle	1	0,00018	3,7
Biphényle	5,6		
Bromophos éthyle	10		
Bromophos méthyle	5,6	0,0064	2,9
Carbaryl	> 10	0,74	> 1,1
Dieldrine	> 10	2,5	> 0,6
Diméthoate	> 10		
2,4 D	> 10		
2,4 D D D	> 10	0,46	> 1,3
4-4' D D D	10	0,0082	3,1
4-4' D D E	> 10		
2-4' D D T	> 10	0,0044	> 3,3
4-4' D D T	> 10		
α endosulfan	10	0,24	1,6
β endosulfan	> 10		
Endrine	> 10	0,9	> 1
Fenchlorphos	3,16	0,0018	3,2
Fénitrothion	10		
Fénuron	> 10		

RIIS
LILLE

Pesticide	DMA <i>Colpidium</i> mg/l	DL ₅₀ <i>Daphnia</i>	
		mg/l	M
H C B	> 10		
H C H	10		
Heptachlor	10	0,052	2,28
Heptachlorépoxyde	3,16	0,12	1,42
Hexachlorophène	0,3		
Lindane	10	1,25	0,9
M C P A	> 10		
M C P B	10		
Malathion	> 10	0,0009	> 4
Méthoxychlore	> 10	0,0037	> 3,4
Paraoxon	> 10		
Ethylparathion	10	0,0008	4,1
Méthylparathion	6,3	0,0048	3,1
2 monochlorobiphényle	6,3		
4 monochlorobiphényle	6,3		
Pentachlorophénol	0,6		
2 phénylphénol	6,3		
Quintozène	> 10		
2-4-5 T	> 10		
Thirame	0,3	1,3	- 0,6
Trichlorphon	> 10	0,00012	> 4,9

TABEAU 24 (suite)





TABLEAU 25. Toxicité des pesticides vis-à-vis de *C. campylum* en fonction de leur structure chimique et de leur utilisation.

Les résultats indiquent le nombre de produits entrant dans les catégories indiquées.

Catégorie chimique	Insecticides			Fongicides			Herbicides			Total						
	-	+	++	Total	-	+	++	Total	-	+	++	Total				
Organochlorés	8	4	0	12	2	2	2	6				0	10	6	2	18
Organophosphorés	5	7		12				0					0	5	7	12
Carbamates	1			1			1	1					0	1		2
Phénoxyalcanofiques				0				0	3	1			4	3	1	4
Divers						2		2	1				1	1	2	3

Catégorie de toxicité : -, DMA > 10 mg/l ; +, DMA comprise entre 1 et 10 mg/l ; ++, DM < 1 mg/l

inférieures au mg/l : le pentachlorophénol, l'hexachlorophène, le thiram et l'azinphosméthyle. 18 autres produits sont toxiques entre 1 et 10 mg/l. 21 produits ne sont pas toxiques à la dose maximale administrée (10 mg/l). *Colpidium* réagit donc à la moitié de l'échantillonnage de pesticides testés. Comparativement, *Daphnia* est beaucoup plus sensible, la seule exception étant le thiram. La discordance entre les deux organismes est plus grande pour les organophosphorés que pour les organochlorés.

Le tableau 25 montre la toxicité des différents pesticides en fonction de leur nature chimique et de leur utilisation. Les organochlorés sont moins toxiques que les organophosphorés. Les substances les plus actives présentent la structure générale des chlorophénols et des chlorobiphényles. Nous avons déjà relaté la toxicité des polychlorobiphényles dans un chapitre précédent.

Si l'on examine le type d'utilisation, ce sont les produits utilisés comme fongicides qui sont les plus toxiques. *Colpidium* est très résistant aux pesticides en comparaison avec les Cladocères. En conséquence, il va constituer un mauvais indicateur pour la recherche des pesticides dans l'environnement que ce soit dans l'eau naturelle ou à partir de concentrats. La grande différence existant entre la physiologie des Ciliés et celle des cibles habituelles des pesticides (Arthropodes, champignons, végétaux) peut expliquer ces résultats. Sur le plan métabolique, il faut souligner que les produits les plus toxiques pour *Colpidium* (pentachlorophénol, hexachlorophène, thiram) sont des découpleurs énergiques

des oxydations phosphorylantes dans la cellule (59). On peut s'interroger également sur le site d'action possible des organophosphorés dans le *Colpidium*. Ces produits sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase chez les organismes supérieurs. La présence d'une activité de type acétylcholinestérase n'a été mise en évidence que très récemment chez *Paramecium* (3). D'autres esters de la choline et leurs estérases spécifiques sont présents chez les Ciliés mais nous ne connaissons pas l'activité des produits organophosphorés sur ces activités enzymatiques.

2) ENDOCYTOSE DE PESTICIDES A L'ETAT PARTICULAIRE

Beaucoup de pesticides ont une solubilité très faible dans l'eau. Ils vont donc se présenter aux protozoaires sous forme de particules non nutritives de taille variable. Les facteurs qui vont agir sur l'endocytose des pesticides par les Ciliés vont être principalement la quantité de pesticides présente dans le milieu, la taille des particules, leur forme géométrique et la nature chimique du produit.

Malgré tous nos efforts, il ne nous a pas été possible de mettre au point une méthode valable pour séparer les Protozoaires, les pelotes fécales et les particules de pesticides restant à l'état libre dans le milieu. Nous avons donc eu recours à deux méthodes indirectes d'étude :

- une méthode microscopique consistant à numérer les vacuoles digestives formées en un temps donné ;
- une méthode opacimétrique étudiant l'éclaircissement d'une suspension de pesticides par les Ciliés.

Matériel et méthodes :

Souches : *C. campylum* a été utilisé en culture axénique (milieu PPYS + 1 % d'albumine) ; *Tetrahymena pyriformis* G.L. a été cultivé sur milieu PPYS à 28°C ; *Tetrahymena thermophila* (DN III et NP 1) a été cultivé sur milieu PPYS enrichi (Cu 30 µM, Fe 900 µM, Acide folinique 2 µM), selon RASMUSSEN (167), la température d'incubation a été de 28 ou 37°C. A cette température le mutant macronucléaire NP 1 ne forme plus de vacuoles digestives. Un test à l'encre de Chine a permis de vérifier préalablement à toute expérience l'absence de réversion de la mutation.

Dispersion du pesticide dans le milieu : 20 µl de solution acétonique de pesticide à la concentration convenable sont ajoutés dans un tube contenant 1 ml de milieu, plongé préalablement dans un cuve de nettoyage par ultra-sons. Après 1 minute de traitement, on peut utiliser la suspension obtenue. Le produit est alors dispersé sous forme de très fines particules. Si la solution acétonique est simplement ajoutée dans le milieu, de très grosses particules se forment et les Ciliés ne peuvent les ingérer.

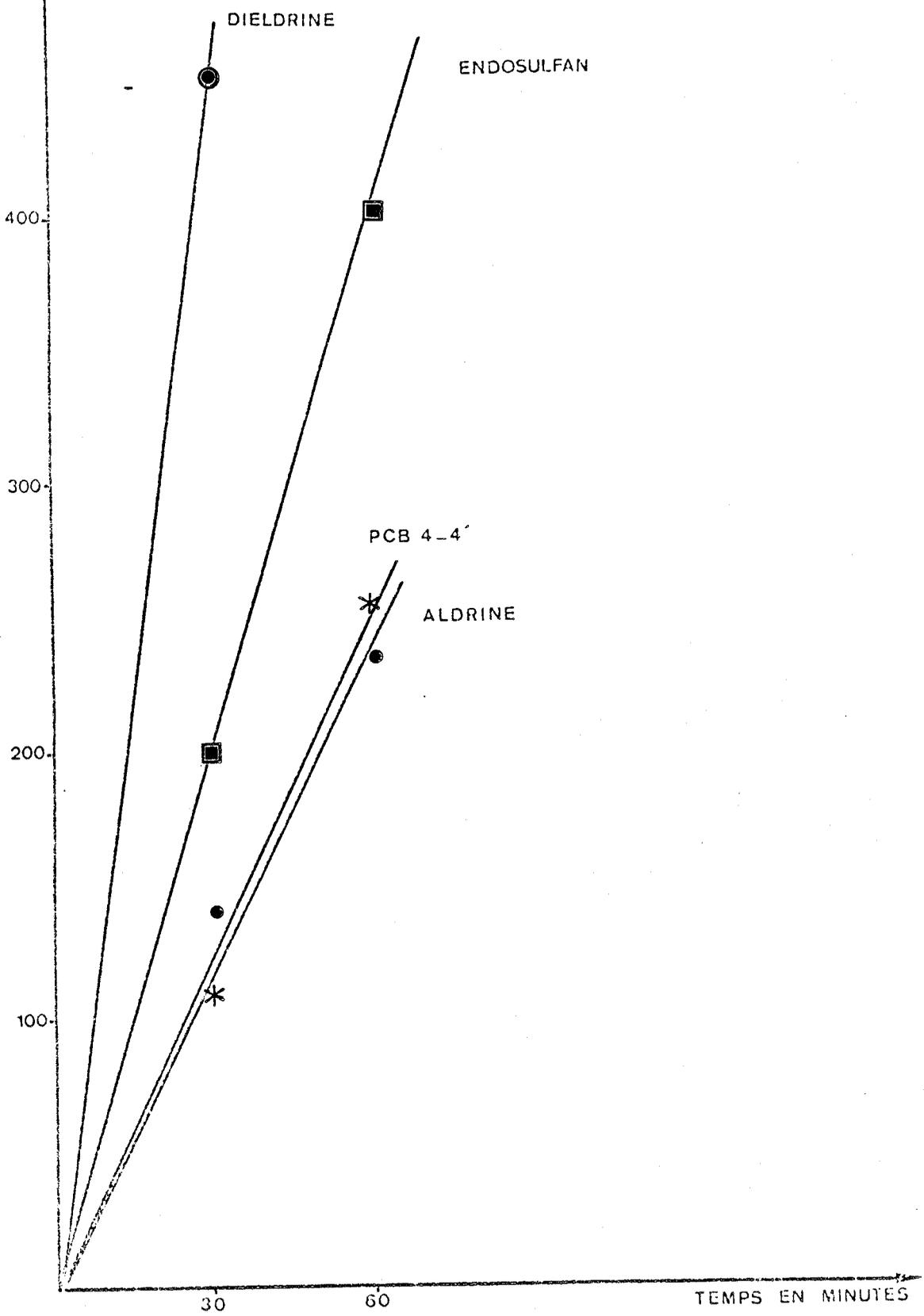


FIG. 49. Nombre de vacuoles digestives formées par 50 cellules en présence de pesticides purs à l'état microdispersé.



Résultats :

a) Influence de la nature du pesticide ajouté :

Nous avons étudié l'activité phagotrophique du *Colpidium* vis-à-vis de 4 pesticides et d'une suspension bactérienne.

Le Cilié présente une activité très différente selon les produits (figure 49). La préférence va, par ordre croissant, de l'aldrine et du PCB 4-4' à l'endosulfan et à la dieldrine. Comparativement, le Protozoaire forme pendant le même temps de 2, 5 à 8 fois plus de vacuoles digestives en présence de bactéries.

b) Etude opacimétrique de l'ingestion : (fig. 50 p. 192)

Cette étude a été réalisée en mesurant l'évolution de la densité optique d'une suspension de 4-4' dichlorobiphényle (100 mg/l) au contact d'une population dense de Ciliés (150 à 200.000 cellules/ml) qui, en absorbant massivement le produit, éclaircissent le milieu.

La figure 50a montre que la densité optique de la suspension diminue rapidement pendant les deux premières heures de contact. Les cellules apparaissent bourrées de pesticide. Au delà de la deuxième heure, les premières vacuoles digestives s'ouvrent au dehors. Le pesticide est rejeté sous forme de pelotes fécales compactes et ne peut plus être absorbé à nouveau. La densité optique augmente alors progressivement pour se rapprocher des conditions initiales.

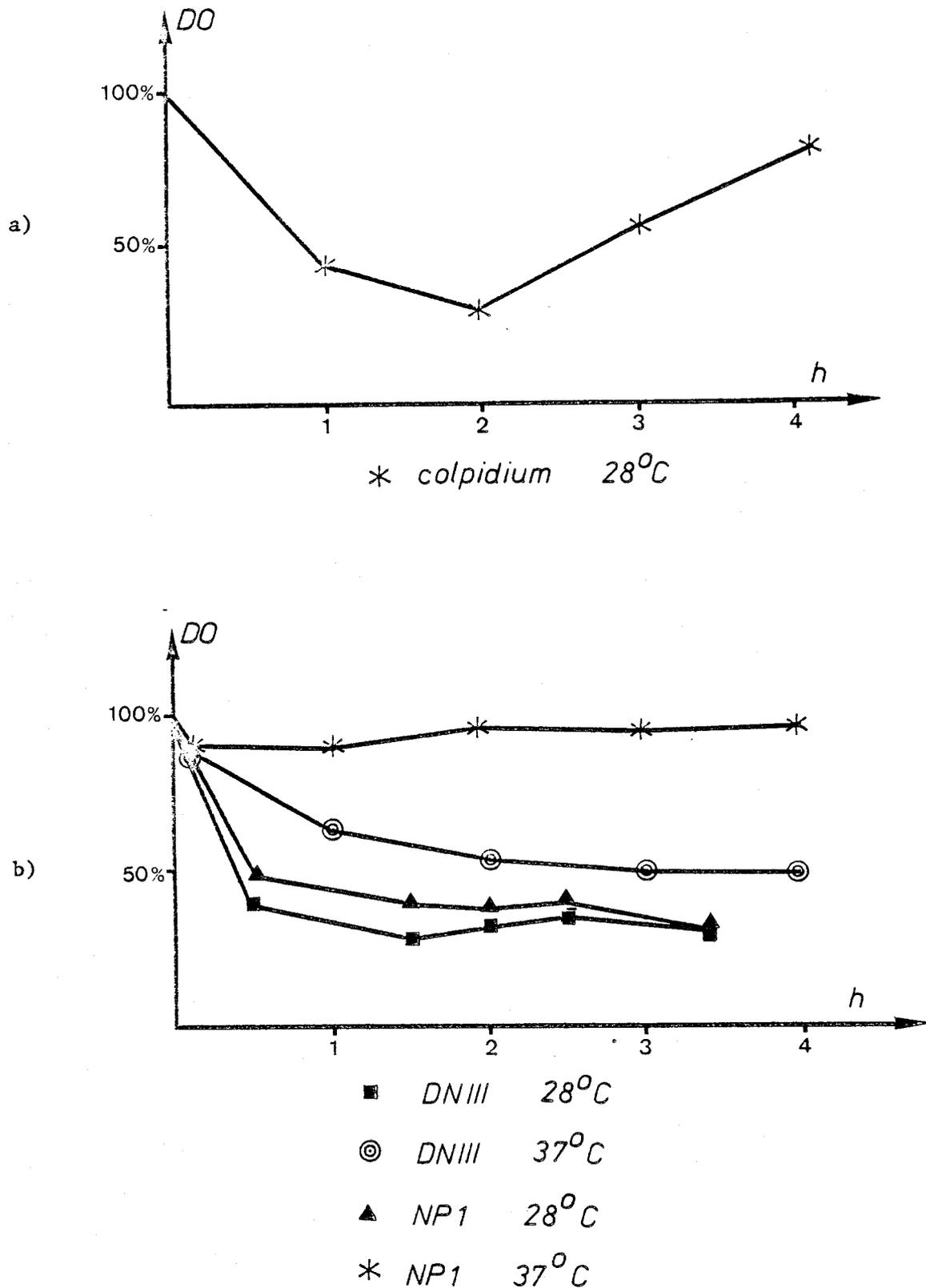


FIG. 50 Diminution de la densité optique d'une suspension de 4-4' dichlorobipnyle consécutive à l'action phagotrophique de Ciliés
 a) avec *Colpidium campylum*
 b) avec *Tetrahymena thermophila*
 La soude NP1 est un mutant thermosensible de DN III, incapable de former des vacuoles digestives à 37° C.

Il fallait vérifier si la diminution de densité optique était réellement due à l'endocytose de *Colpidium* et non à une précipitation des produits comme cela peut parfois se produire en présence de bactéries, le Cilié sécrétant des produits extra-cellulaires floculants (50). Pour cela nous avons utilisé *Tetrahymena thermophila*. La figure 50 b rend compte des résultats obtenus. A 28°C, l'éclaircissement du milieu est le même avec les deux souches. A 37°C, l'endocytose est un peu moins active chez la souche DN₃, mais totalement bloquée chez le mutant NP₁ et on n'observe aucune diminution de densité optique dans le milieu. La voie orale est donc bien la voie unique de passage du pesticide à l'état précipité. Pour savoir si le pesticide transite passivement dans la cellule, il nous fallait pouvoir l'identifier in vitro et vérifier son intégrité chimique. Pour cela, nous avons utilisé la microsonde moléculaire à effet Raman.

3) IDENTIFICATION INTRACELLULAIRE DE PESTICIDES

a) Méthode :

La microsonde MOLE : La diffusion de la lumière par des molécules ou des cristaux s'accompagne de changements de fréquence, dus essentiellement aux vibrations et aux rotations moléculaires. Ce phénomène est l'effet Raman. La diffusion Raman ne constitue qu'une très faible proportion de la lumière incidente. Seul l'emploi de lasers permet d'obtenir des spectres

en un temps réduit. La microsonde MOLE est constituée par un spectromètre Raman à laser, couplé à un microscope, l'ensemble permettant d'examiner des structures de très petite taille. La focalisation du rayon laser permet de tracer le spectre Raman de particules dont la taille avoisine 1 μ . Le spectre Raman d'une substance est en rapport avec sa configuration moléculaire et constitue une sorte d'"empreinte digitale" très précise qui permet de suivre l'évolution d'un produit. Un changement de structure modifie en effet la proportion relative des pics d'émission ou leur longueur d'onde (64).

Préparation des cellules. Nous avons utilisé le 4-4' dichlorobiphényle et l'endosulfan à des concentrations allant de 2,5 à 25 mg/l. Les cultures de *Colpidium* de 24 heures sont centrifugées et resuspendues dans du Tris 10 mM (pH 7,2). La densité cellulaire est comprise entre 50 et 100.000 cellules/ml. A des temps variables, des aliquotes sont prélevées et fixées avec un volume égal de glutaraldéhyde à 2 % et on laisse décanter les cellules.

Pour l'examen en spectrométrie, deux techniques ont été utilisées

- 1 goutte de suspension cellulaire est examinée entre lame et lamelle ;
- 1 goutte de suspension est déposée sur une lame et séchée.

Sous un grossissement de 800 à 1000, le laser est focalisé au niveau des vacuoles digestives contenant apparemment du matériel insoluble.

A partir du spectre étalon tracé à partir de pesticides en suspension dans le milieu, on vérifie la présence des raies majeures d'émission puis on trace un spectre entre 100 et 3500 cm^{-1} , les raies de diffusion les plus intéressantes se situant entre 100 et 2000 cm^{-1} .

La fig. 51 p.196 montre respectivement les spectres de référence du 4-4' dichlorobiphényle et du β -endosulfan et la fig. 52 p. 197 montre les spectres des produits insolubles contenus dans les vacuoles digestives après contact avec les deux pesticides. Le tableau 26 donne les longueurs d'onde observées pour les deux produits à la fois dans l'étalon et dans les cellules. Les résultats montrent :

- que le matériel insoluble contenu dans les vacuoles est identique au produit standard donc c'est bien le pesticide qui a été ingéré ;

- l'aspect du spectre reste inchangé quelque soit l'âge de la vacuole digestive. Le produit n'est donc pas modifié et transite passivement dans la cellule.

Les deux méthodes de préparation permettent d'obtenir de bons résultats, bien que chacune possède ses avantages spécifiques. Par la méthode classique (humide), la recherche des cellules et la localisation des vacuoles sont très faciles, mais des courants de convection peuvent se produire dans la préparation ; ils sont dûs essentiellement à l'effet thermique local provoqué par le rayon laser. De ce fait, la cellule peut se déplacer et la vacuole peut sortir du champ de focalisation des rayons. Avec la méthode à

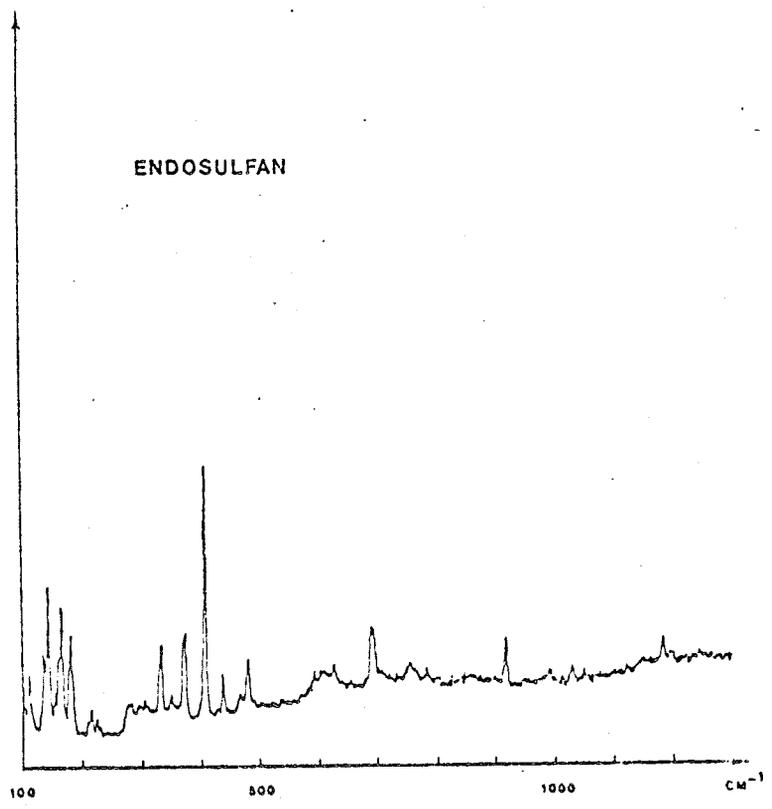
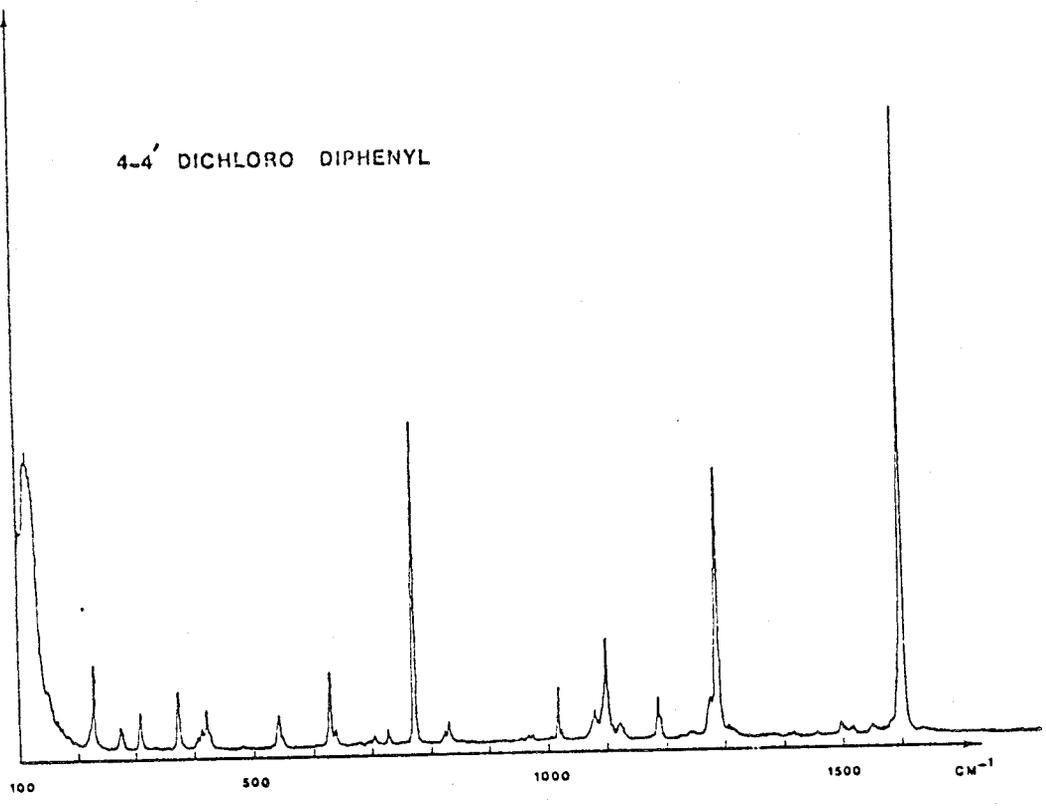


FIG. 51 - Spectres RAMAN du 4-4' dichlorobiphényle et du βendosulfan
Résultats obtenus en collaboration avec DEVYNCK, LEROY et
MOSCHETTO, INSERM C.T.B.M. LILLE -

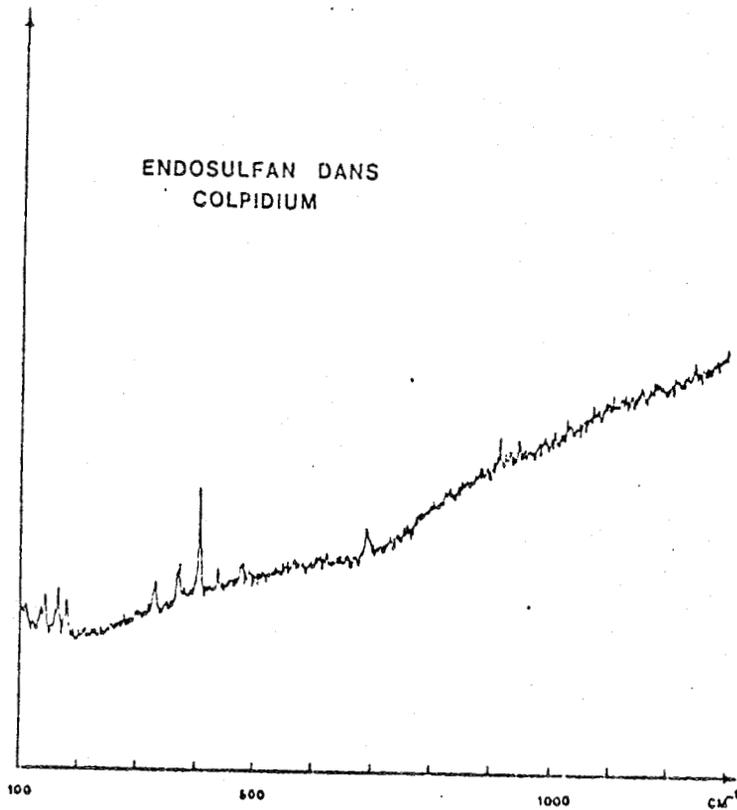
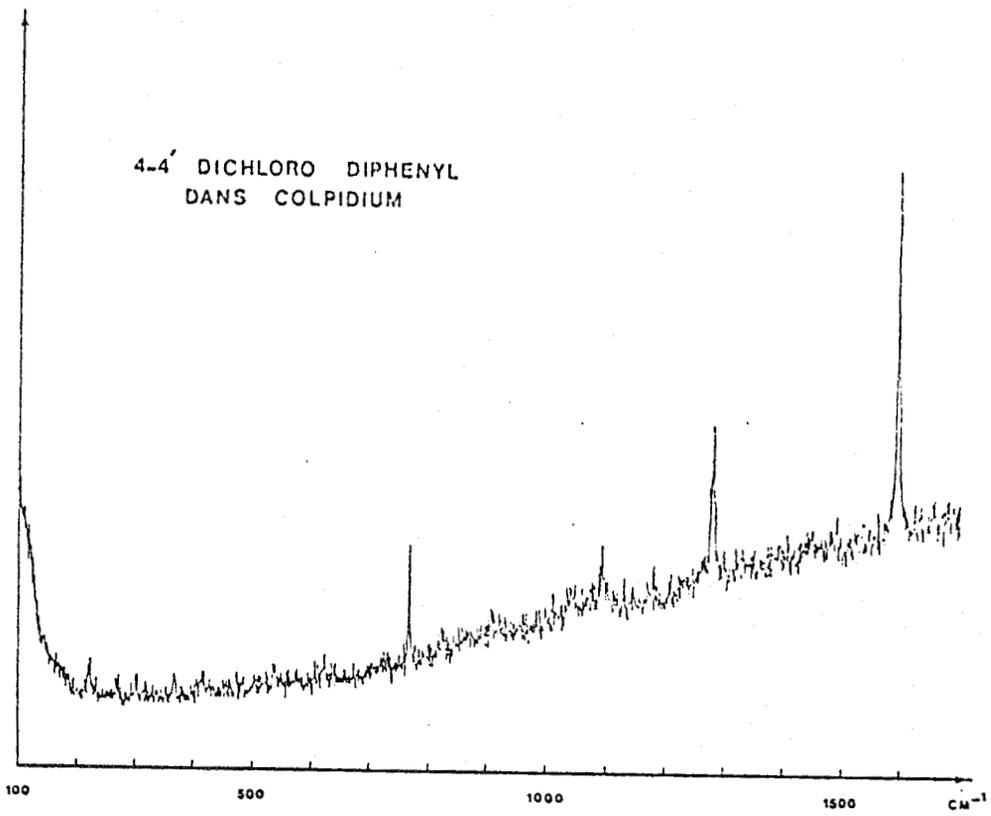


FIG. 52 - Spectre RAMAN des particules de pesticides contenues dans les vacuoles digestives de *C. campylum*.

Résultats obtenus en collaboration avec DEVYNCK, LEROY et MOSCHETTO, INSERM C.T.B.M. LILLE -

TABLEAU 26. Caractéristiques spectrales Raman du 4-4' dichlorobiphényle et du β endosulfan en suspension et à l'intérieur des vacuoles digestives des Ciliés.
Longueurs d'onde (en cm^{-1}) et intensité des pics d'émission.

Endosulfan	Endosulfan dans les vacuoles	4-4' PCB	4-4' PCB dans les vacuoles
112 F	112	227 M	227
135 F	135	271 TF	272
145 M	145	307 F	307
160 M	160	372 F	372
167 M	167	420 F	420
182 M	182	540 F	540
332 F	332	628 M	628
375 F	375	770 FO	770
407 FO	407	1017 F	1017
437 F	437	1098 M	1098
480 F	480	1185 F	1185
692 F	692	1285 FO	1285
917 F	912	1600 TFO	1600

Codes d'intensité : TF, très faible ; F, faible ; M, moyen ;
FO, forte ; TFO, très forte.



sec, la morphologie des cellules est très altérée et il devient très difficile de repérer les structures intéressantes. L'avantage réside dans la bonne stabilité des cellules sous le pinceau laser. Nous avons pu identifier avec la MOLE des particules de pesticide de 1 à 2 μm . La concentration en produit doit être suffisamment élevée (solution molaire). Cette condition est toujours remplie quand on s'adresse à du matériel à l'état cristallisé ou précipité.

Si beaucoup de pesticides ne sont pas toxiques pour *Colpidium campylum*, ils peuvent être concentrés intensément dans les vacuoles digestives si la taille et la forme des particules insolubles autorisent l'endocytose. L'utilisation de la microsonde MOLE nous a permis de vérifier la réalité de l'ingestion du pesticide. En outre, nous avons appris que, au moins pour le 4-4' dichlorobiphényle et le β -endosulfan, aucune transformation ne se produit dans la cellule. Nous avons déjà obtenu des résultats similaires lors de l'étude des PCB. Si nos résultats ne peuvent être étendus à tous les pesticides, ils peuvent certainement s'appliquer à bon nombre d'entre eux, en particulier les organochlorés de faible solubilité. Ces produits transitent dans la cellule et sont rejetés sous forme de pelotes fécales. Il est possible qu'une proportion très faible du produit, solubilisée dans le milieu extérieur, traverse les membranes. L'absence de toxicité est due soit à une résistance réelle du *Colpidium*, soit à une solubilité trop faible du produit qui ne permet pas d'atteindre une concentration suffisante pour qu'un effet toxique se manifeste, soit à l'imperméabilité de la barrière membranaire au toxique. Pourtant, la plupart des pesticides présen-

BUS
LILLE

tent un coefficient de partage octanol/eau très important et sont susceptibles de se fixer rapidement au niveau des lipides membranaires.

Dans la nature, les conditions expérimentales que nous avons utilisées ne sont jamais rencontrées, les concentrations de pesticides restant limitées à quelques $\mu\text{g/litre}$. Dans ces conditions, la plupart des pesticides n'auront aucune action directe sur les Protozoaires ciliés présents. La bioaccumulation directe à l'état particulaire sera tout à fait exceptionnelle et de courte durée, liée à la durée du cycle des vacuoles digestives.

Toutefois, des accumulations ou effets toxiques indirects ne peuvent être exclus. On sait, en effet, que les pesticides s'adsorbent avec une très grande facilité sur les surfaces ou sur les particules en suspension (191). Les bactéries peuvent servir de site d'adsorption pour un pesticide et ainsi fixer ce produit. Capturés et digérés par les Ciliés qui s'en nourrissent, les microorganismes peuvent constituer une voie d'accumulation ou, peut être même, d'intoxication.

Cette voie de recherche, qui n'a pas encore été explorée, devrait permettre de mieux comprendre les phénomènes de transmission des polluants entre Ciliés et bactéries, premiers maillons des chaînes alimentaires détritivores.

V - APPLICATION A L'ETUDE DE MYCOTOXINES

Les mycotoxines représentent un danger redoutable pour la santé de l'homme. Or, il n'existe pas de méthode biologique simple de détection de ces substances dans les produits contaminés ou à partir du champignon suspect ; nous avons donc effectué une exploration de différentes toxines connues et des acides gras contaminant toujours les extraits mycéliens.

Les métabolites de *P. roqueforti* et la botryodiplodine nous ont été fournis par le Docteur MOREAU (142). Les autres toxines ont été obtenues auprès de Makor Chemicals. Les acides gras de haute pureté (> 99 %) ont été obtenus chez Sigma Chemicals. Les produits sont administrés sous forme de solution acétonique selon la technique classique du test de croissance. La concentration maximale testée a été 10 µg/ml.

1) TOXICITE DE MYCOTOXINES PURES ET DE DERIVES VIS-A-VIS DE

C. CAMPYLUM (Tableau 27 - p. 202)

Les résultats obtenus (tableau 27) montrent que des toxines extrêmement actives sur les mammifères ne sont pas toxiques, aux plus fortes doses administrées, pour *C. campylum*. C'est le cas de l'Aflatoxine B, de l'Ochratoxine B et de la Stérigmatocystine. La botryodiplodine est toxique à 4 µg/ml. La patuline et le diacétoxyscirpénol sont détectés à la dose de

TABLEAU 27. Dose Minimale Active de diverses
mycotoxines pour *Colpidium campylum*. (mg/l)

Aflatoxine B ₁	> 10
Ochratoxine B	> 10
Stérigmatocystine	> 10
Botryodiplodine	4
Diacétoxyscirpénol	0,5
Patuline	0,5
P.R. Toxine	0,25



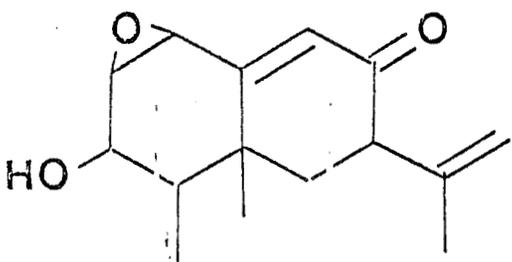
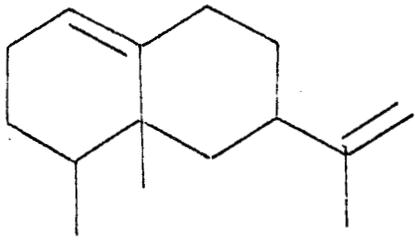
0,5 µg/ml. Enfin, la PR toxine est le produit le plus actif ; sa DMA est de 0,25 µg/ml.

Un schéma de la biosynthèse de la PR toxine a été proposé par MOREAU (142) et il est représenté sur la fig.53 - p. 204 Malgré une structure très proche de celle de la PR toxine, tous les métabolites sont au moins 40 fois moins toxiques(aucun n'a été toxique à la dose de 10 µg/ml)

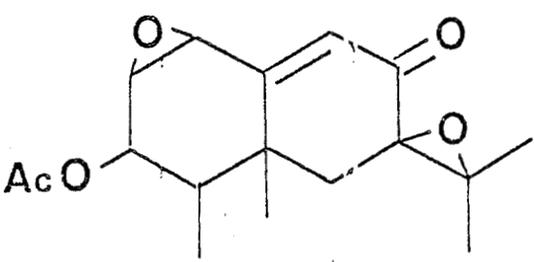
4 produits dont la structure est apparentée à la structure d'une partie du squelette sesquiterpénique de la PR toxine (figure 54) ont été testés avec *Colpidium*. Aucun de ces produits ne s'est montré toxique pour le Cilié.

Les résultats que nous avons obtenus indiquent clairement que le site toxique de la molécule est situé sur les carbones 7, 8, 11, 12, 13. On peut attribuer une haute toxicité à la fonction aldéhyde du carbone 12 et, peut être, une influence plus réduite de la fonction epoxide entre C₇ et C₁₁. L'étude des produits de synthèse indique pourtant que l'existence de ces deux fonctions chez la substance 71D n'est pas suffisante pour voir apparaître une toxicité. Si la partie de la molécule extérieure à la région C 7-8-11-12-13, n'intervient pas dans le mécanisme de toxicité, ce qui n'est pas prouvé, il faudrait invoquer un rôle possible de la fonction cétone située en C 8. Tout ceci nécessite encore des travaux complémentaires pour démontrer le schéma proposé.

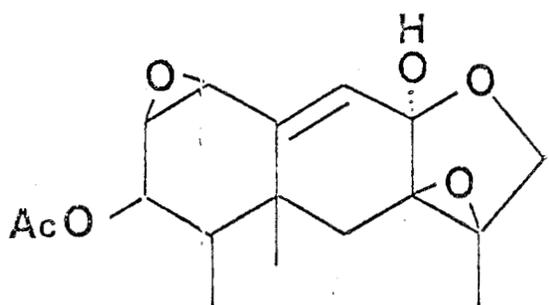
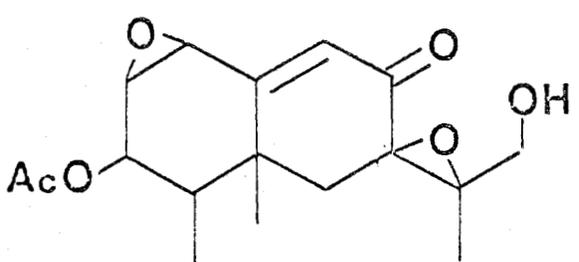
Hypothétique non isolé



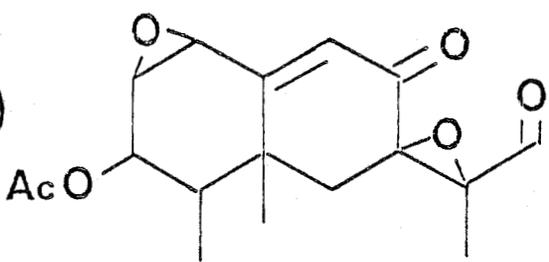
EB



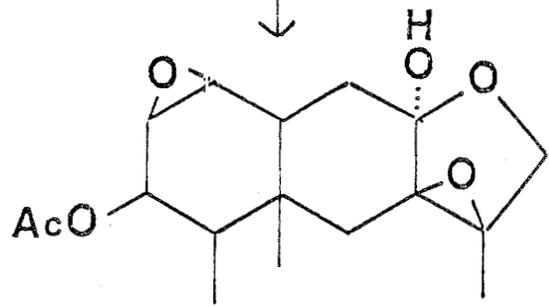
EA



EC



PRT

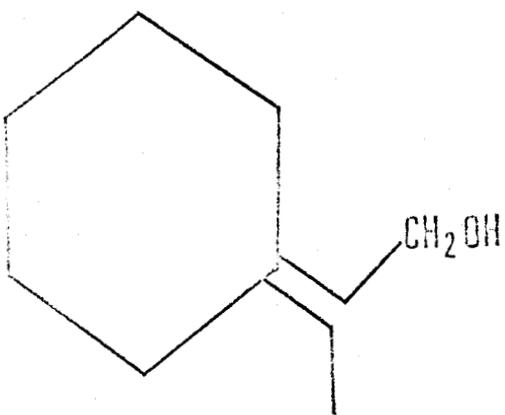


ED

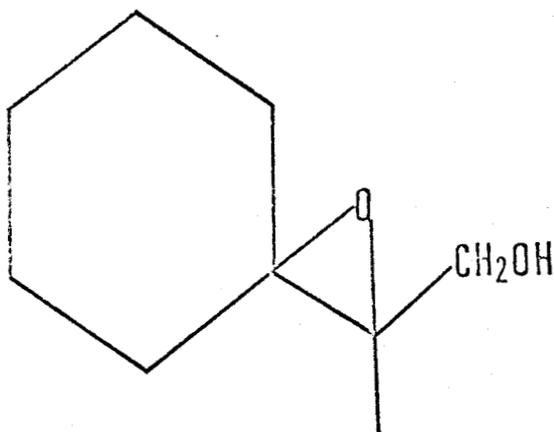
BIS
LILLE

FIG. 53 - Schéma de biosynthèse de la P.R. toxine, selon MOREAU S. (142)

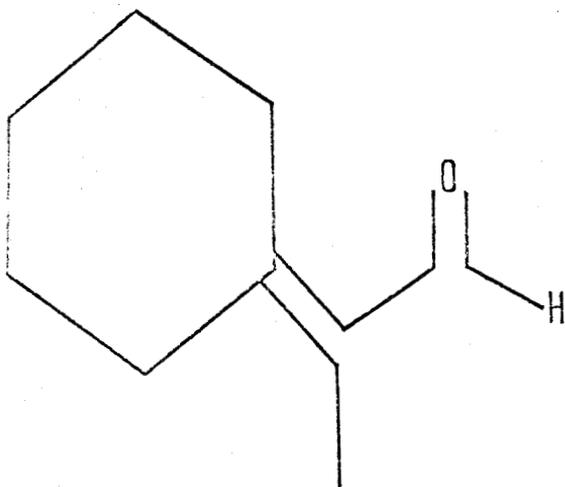
71 A



71 B



71 C



71 D

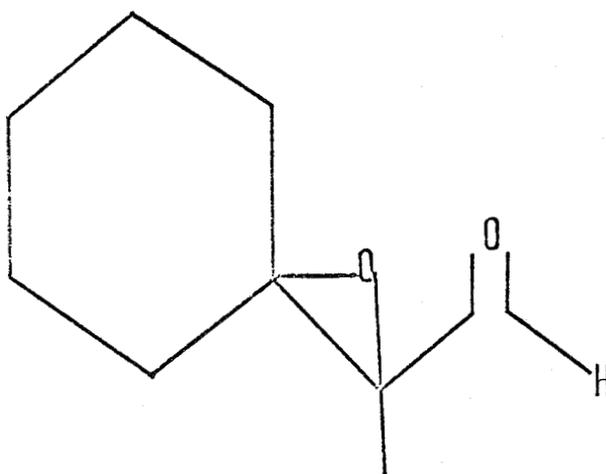


FIG. 54 - Formule chimique de 4 produits de synthèse (MOREAU-142) dont une partie de la molécule est proche de celle de la PR toxine ou de ses dérivés.

TABLEAU 28. Toxicité des acides gras vis-à-vis de C.c.

Acide	Structure	D.M.A. ($\mu\text{g/ml}$)	LC 50 <i>Artemia</i> ($\mu\text{g/ml}$)
Ac. arachidonique	20 : 4	40	1,5 - 2
Ac. linoléique	18 : 2	10	3,3
Ac. linoléinique	18 : 3	5 < DMA < 10	2,4
Ac. γ linoléinique	18 : 3	5 < DMA < 10	
Ac. laurique	12 : 0	5 < DMA < 10	5



2) TOXICITE DES ACIDES GRAS POUR *C. CAMPYLUM*

Les résultats des tests (tableau 28) indiquent que l'acide arachidique est le moins toxique. La zone de DMA pour les autres acides gras testés oscille entre 5 et 10 µg/ml. En regard, les résultats d'essais sur *Artemia* (55) montrent que ce crustacé est beaucoup plus sensible que les Ciliés à la présence d'acides gras dans les extraits à tester.

C - DEFINITION D'UN TEST DE VIABILITE MINIATURISE UTILISANT

C. CAMPYLUM

Parmi les nombreuses méthodes utilisables pour mesurer la toxicité à l'aide de Protozoaires, la méthode de mesure de viabilité de HEAF et LEE (105) nous a semblé très intéressante à utiliser.

Elle présente en effet de multiples avantages :

- Elle ne nécessite pas de matériel spécialisé, onéreux pour son exécution et sa lecture

- Elle permet d'exprimer les résultats d'une manière analogue à celle des tests classiques (Dose Inhibitrice ou Léthale 50 %)

Nous avons cherché à l'adapter pour la mesure courante de la toxicité sur *C. campylum*.

I - MATERIEL ET METHODES

C. campylum a été cultivé dans le milieu minéral à 28°C en présence d'*E. coli* lyophilisé (*E. coli* EC 11303 de Sigma Chemicals).

Pour distribuer les cultures et les toxiques, nous avons utilisé des pipettes multipointes (Titertek - Flow laboratories) ou un inoculateur automatique (Dynadrop - Dynatech).

Différents types de microplaques ont été testées. Certaines ne donnent pas de bons résultats. Les plus satisfaisantes pour notre travail sont des plaques à 96 trous en U (Nunc-Copenhague). Certaines plaques apparaissent toxiques. Cela peut être dû soit à la composition du plastique, soit aux phénomènes de tension superficielle intervenant dans les cupules selon le traitement de la surface.

Pour l'expérimentation, la culture de Ciliés est d'abord numéree en cellules de Nageotte après fixation par du lugol double (1/2 v/v). Elle est ensuite ajustée par dilutions à une concentration comprise entre 500 et 4.000 cellules/ml. La suspension finale est alors ajustée de la manière suivante :

- *E. coli* (50 mg dans 10 ml
d'eau distillée) 1 ml
- Suspension intermédiaire de
Colpidium q.s.p. 2.500 cellules
- Milieu minéral q.s.p. 100 ml

On peut opérer également une dilution directe de la culture de *Colpidium* pour obtenir 25 cellules/ml dans la solution finale.

A l'aide d'un distributeur automatique ou d'une pipette multipointe, on distribue 20 µl de cette suspension dans chacune des cupules d'une microplaque. On ajoute alors 200 µl de milieu minéral (témoin) ou de solution toxique.

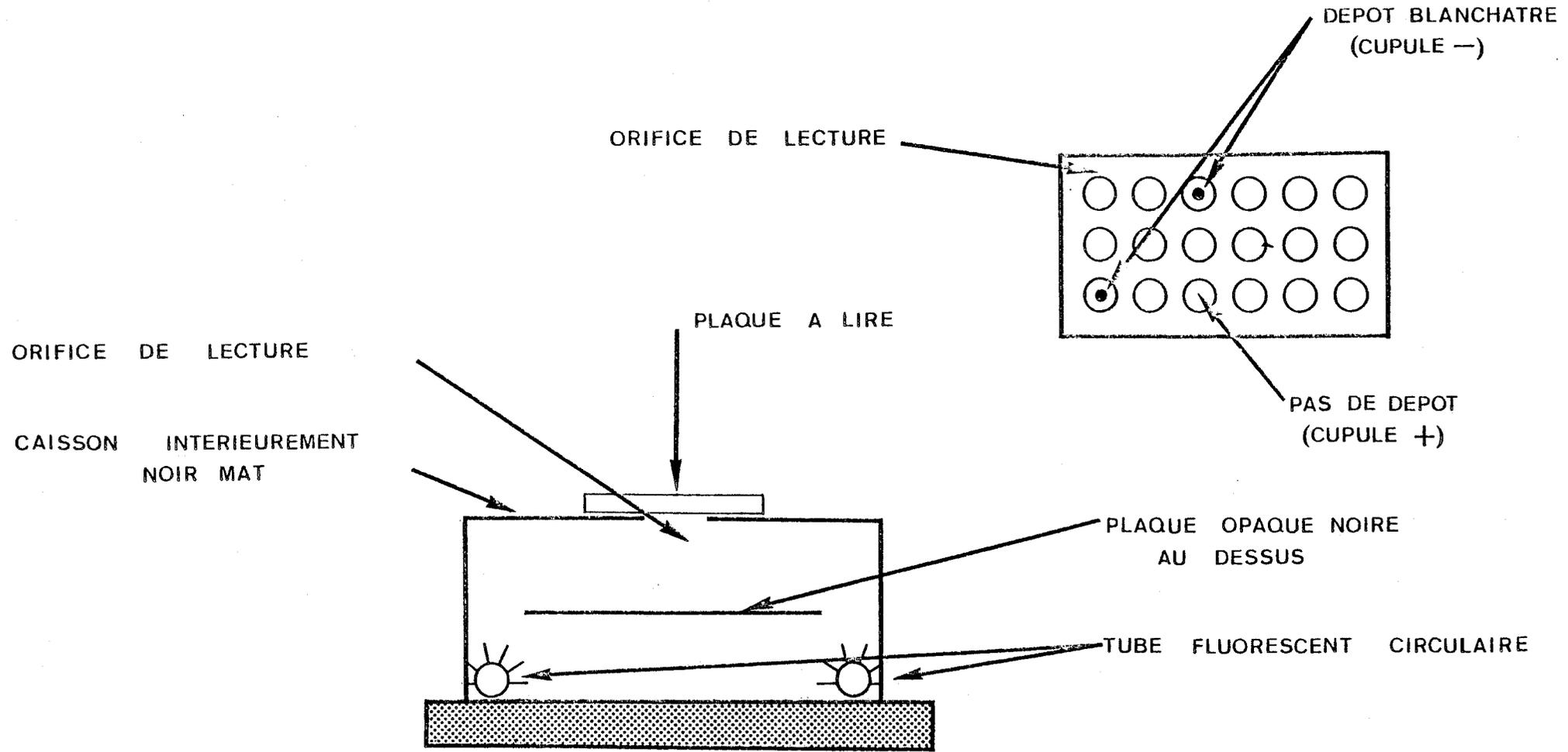


FIG. 55 Dispositif pour lire les plaques de microtitration

Les plaques sont incubées à 28°C pendant 6 jours. La lecture est effectuée sur fond noir (figure 55). Les cupules où l'on observe un dépôt blanchâtre à contour net sont négatives, les cupules optiquement vides sont positives.

II - ETUDE THEORIQUE ET INTERPRETATION DU TEST

1) PRINCIPE DU TEST

Un Protozoaire, isolé dans une cupule de plaque à microtitration, en absence de substances toxiques, va former un clone. S'il est cultivé monoxéniquement, il va consommer les bactéries ajoutées dans le milieu. Après incubation, les bactéries présentes dans une cupule ne contenant pas de Cilié forment un dépôt blanchâtre très net. Si un Cilié s'est développé en clone, les bactéries ont disparu et aucun dépôt n'est visible.

2) CALCUL DU NOMBRE REEL DE CILIES AYANT FORME UN CLONE

Soit C la concentration en ciliés dans un volume total V très supérieur aux aliquotes prélevées v. Le nombre total d'organismes est $N = CV$. La probabilité pour qu'un Cilié se trouve dans une aliquote v est $p_1 = \frac{v}{V}$ et la probabilité pour que toutes soient extérieures à l'aliquote est $p = (1 - p_1)^N$, p peut s'écrire $p = (1 - \frac{v}{V})^{CV} = (1 - \frac{Cv}{CV})^{CV}$. Si CV est grand (> 50), cette quantité est proche de e^{-CV} et $p = e^{-CV}$ d'où :

$$f = \frac{h \text{ (nombre de cupules négatives)}}{n \text{ (nombre total de cupules)}} = e^{-CV} \quad \text{et} \quad C = -\log f$$

c étant la concentration de Cilié par cupule.

Pour calculer l'inhibition de la croissance, il est inutile de calculer le nombre de clones réel. Nous avons calculé les tables de $c = -\log \left(\frac{h}{n}\right)$ en fonction du nombre de cupules positives selon que l'on utilisait 1 ou 2 plaques par concentration (voir Annexe IV).

3) CALCUL DE LA DOSE DE VIABILITE 50 % (DV 50)

On compare la valeur de c obtenue dans le témoin avec les valeurs obtenues en présence de toxique. Sur un papier Gausso-logarithmique, on reporte ensuite les % de viabilité en fonction de la dose de produit (figure 56). On peut ensuite calculer la DV 50 en traçant la droite de régression.

III - INFLUENCE DE LA METHODE DE DISTRIBUTION ET DU MATERIEL UTILISES

Des essais préliminaires réalisés sur 45 plaques distribuées avec Dynadrop ont montré une très large variation de la distribution. L'utilisation de graphiques d'anamorphose montre que la distribution des résultats ne suit pas une loi normale. Les valeurs obtenues pour la moyenne et surtout pour l'écart type différent selon la méthode de calcul :

- calcul arithmétique	$\bar{X} = 0,42$	$S = 0,24$
- calcul graphique	$\bar{X} = 0,38$	$S = 0,19$

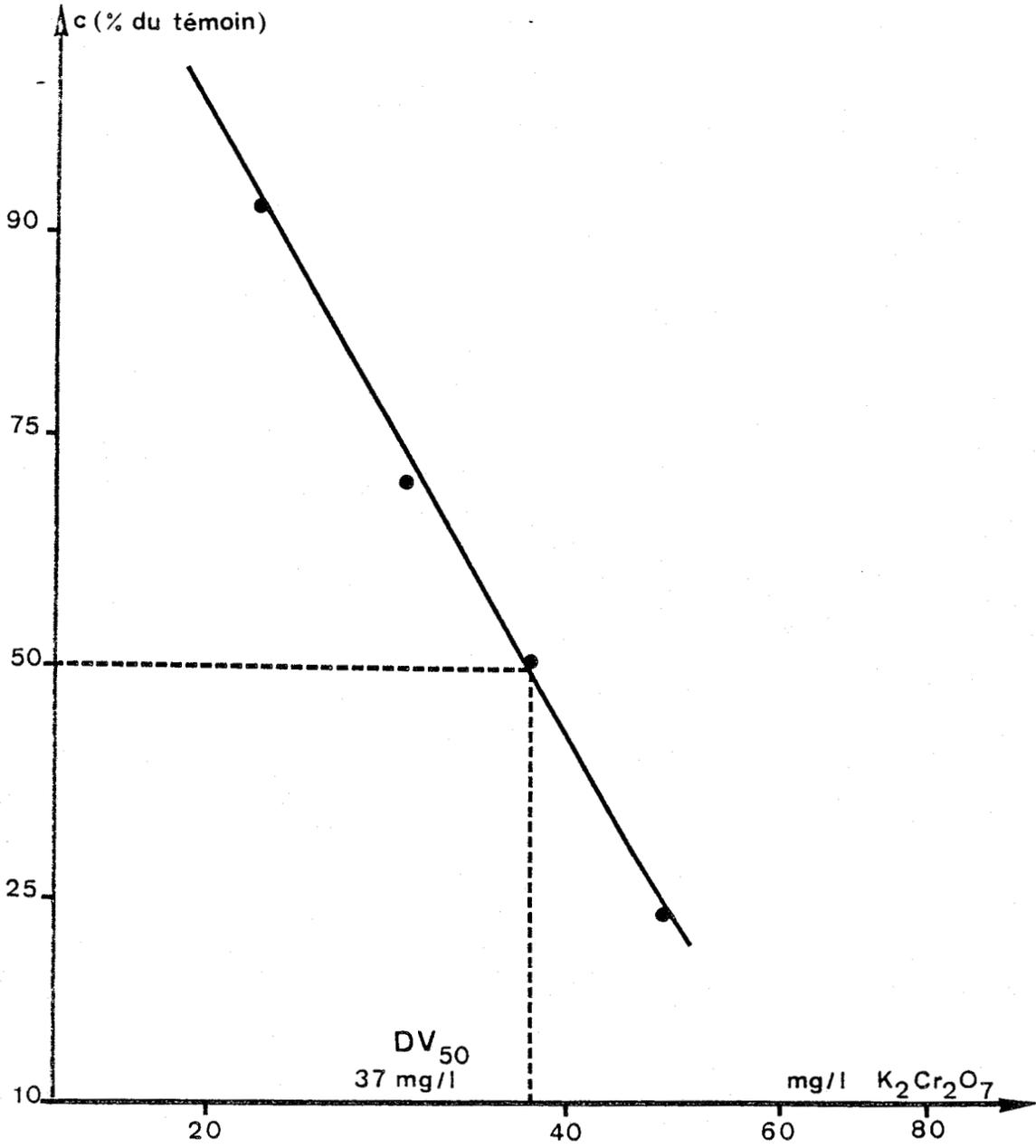


FIG. 56 - Calcul de la DV_{50} d'un produit à partir des rapports $\frac{100 c}{C \text{ témoin}}$

Les valeurs s'éloignant franchement d'une loi normale représentent 15 % de l'échantillon. Mais ce sont ces valeurs qui influent le plus sur la moyenne arithmétique.

Ces résultats préliminaires montrent qu'environ 80 % seulement des Ciliés théoriquement inoculés donnent effectivement des clones.

Cette perte peut être attribuée à plusieurs causes :

- La viabilité de *Colpidium* inoculé suivant cette technique n'est pas de 100 %

- La technique de distribution n'est pas inoffensive et un certain nombre de Ciliés sont tués pendant l'opération

- La méthode de dilution n'est pas indifférente et peut entraîner des erreurs importantes.

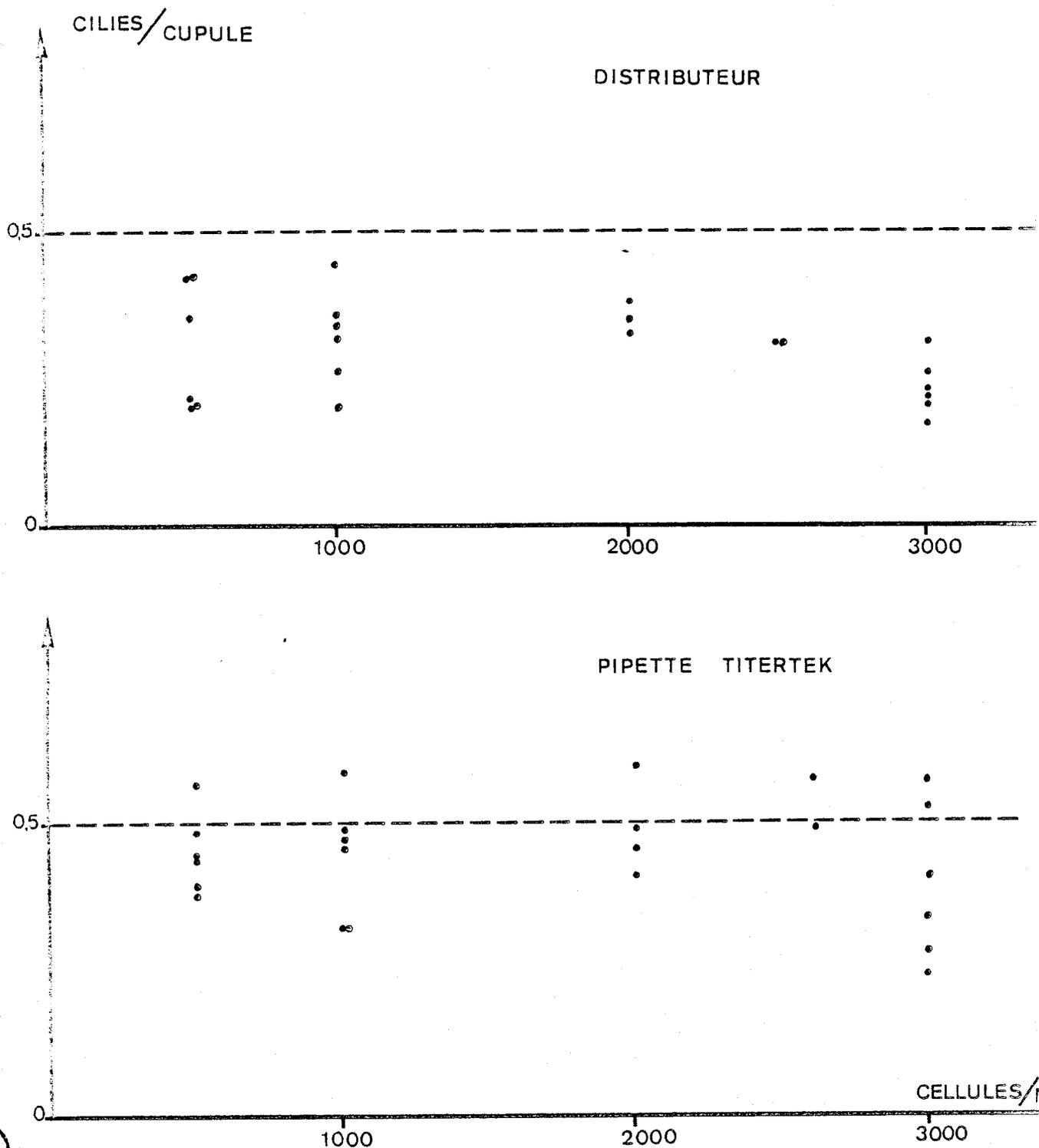
Pour vérifier l'influence de ces trois facteurs, nous avons pratiqué deux types d'expériences portant sur les appareils de distribution et sur la dilution de la culture mère de Protozoaires.

- A partir d'une préculture, nous avons effectué des dilutions de manière à obtenir des concentrations intermédiaires de 500, 1.000, 2.000 et 3.000 cellules par ml. Puis ces suspensions sont diluées pour obtenir la suspension finale contenant 25 cellules/ml qui est partagée en 2 aliquotes dont l'une est distribuée avec le Dynadrop et l'autre avec les pipettes Titertek multipointes.

Les résultats obtenus (fig.57 p.216, tab.29) montrent qu'une perte substantielle se produit lors de la distribution au Dynadrop. La récupération varie de 63 à 73 % pour les concentrations allant de 500 à 2.000 cellules/ml. Avec 3.000 cellules/ml, à peine la moitié du nombre théorique de clones est atteinte. Avec les pipettes Titertek, le pourcentage moyen de récupération varie de 82 à 96 % mais les tests confirment que les moyennes observées ne diffèrent pas significativement de 0,5. Avec 3.000 cellules/ml, on observe une chute du taux de récupération.

La distribution avec le Dynadrop entraîne une perte importante de cellules durant la distribution. Les cellules sont soumises, dans cet appareil, à des variations brutales de pression et circulent à grande vitesse dans des tubes capillaires. Ces conditions doivent entraîner la mort d'une partie des cellules. Les pipettes multipointes permettent un contrôle de l'aspiration et du refoulement ce qui permet de mieux respecter l'intégrité des cellules. Sans être aussi rapide que le Dynadrop, les pipettes Titertek sont moins brutales, mais surtout plus reproductibles et moins sujettes aux problèmes techniques (colmatage de tubes, réétalonnage etc...).

- Nous avons ensuite réalisé des suspensions finales contenant 25, 50, 100 et 150 cellules/ml respectivement par dilution directe ou à partir de suspensions intermédiaires contenant 500, 1.000, 2.000 et 3.000 cellules/ml, diluées au 1/20ème pour réaliser la suspension finale. Dans quelques cas, la suspension finale a été séparée en 2 aliquotes dont l'une était distribuée au Dynadrop et l'autre avec une pipette Titertek.



BUS
LILLE

FIG. 57 - Concentration (Ciliés/cupule) obtenue en fonction du type de distributeur et de la concentration intermédiaire en Ciliés utilisée.

TABLEAU 29. Concentration (cellules/cupule) réelle observée en fonction du type de distributeur et de la concentration intermédiaire en cellules utilisée .

Concentration réelle observée avec :		Concentration de la dilution intermédiaire (cellules/ml)			
		500	1.000	2.000	3.000
Dynadrop	\bar{X}	0,316	0,33	0,366	0,235
	S	0,104	0,081	0,025	0,045
	n	6	6	3	6
Pipette Titertek	\bar{X}	0,454	0,441	0,482	0,385
	S	0,069	0,102	0,08	0,133
	n	6	6	4	6

\bar{X} = moyenne ; s = écart type ; n = nombre d'observations.



Lors du report sur graphique, un exemple étant donné dans la figure 58, nous nous sommes rendus compte que la dispersion des résultats augmentait avec la moyenne. Nous avons donc procédé à une transformation log-log qui permet d'obtenir une variance homogène pour l'ensemble des données. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 30 et la figure 58 :

- Le Dynadrop donne des résultats beaucoup plus irréguliers que les pipettes Titertek ;

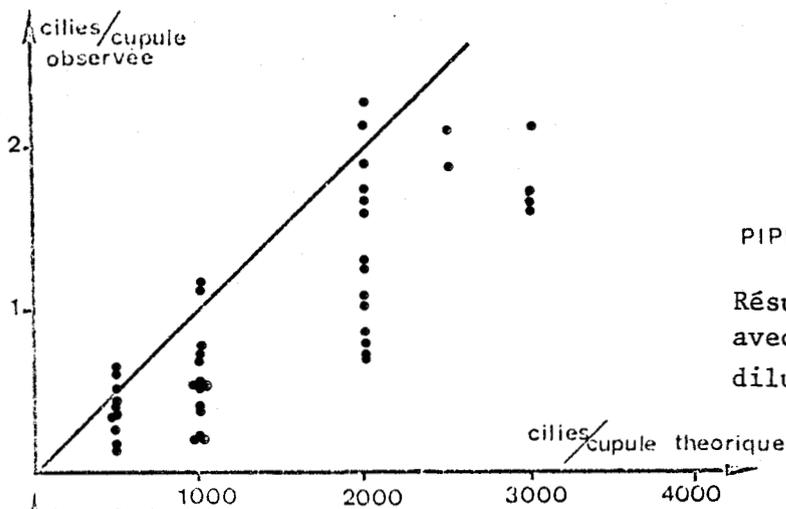
- La méthode de dilution directe entraîne une perte importante de clones ;

- Quand on utilise la méthode indirecte, il y a affaiblissement du rendement quand la concentration en cellules s'élève. Ceci est particulièrement net quand on utilise des suspensions contenant 100 et 150 cellules/ml. Les pipettes Titertek associées à une dilution indirecte, donnent des résultats très satisfaisants pour des concentrations finales de 25 à 50 cellules/ml.

La technique de dilution joue donc un rôle très important, qui peut paraître surprenant au premier abord, mais deux remarques peuvent être faites à ce sujet :

- L'erreur d'échantillonnage est plus faible quand on travaille sur des volumes de culture importants (cas de la méthode indirecte). L'échantillon prélevé est en effet plus représentatif de la population initiale.

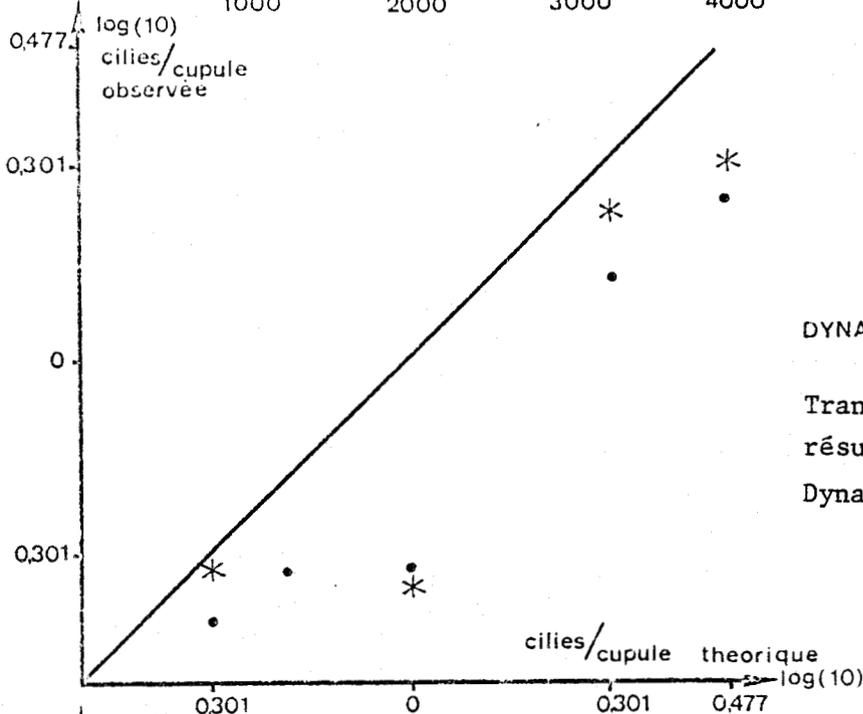
a)



PIPETTE DIRECT

Résultats numériques obtenus avec une pipette Titerteck en dilution directe

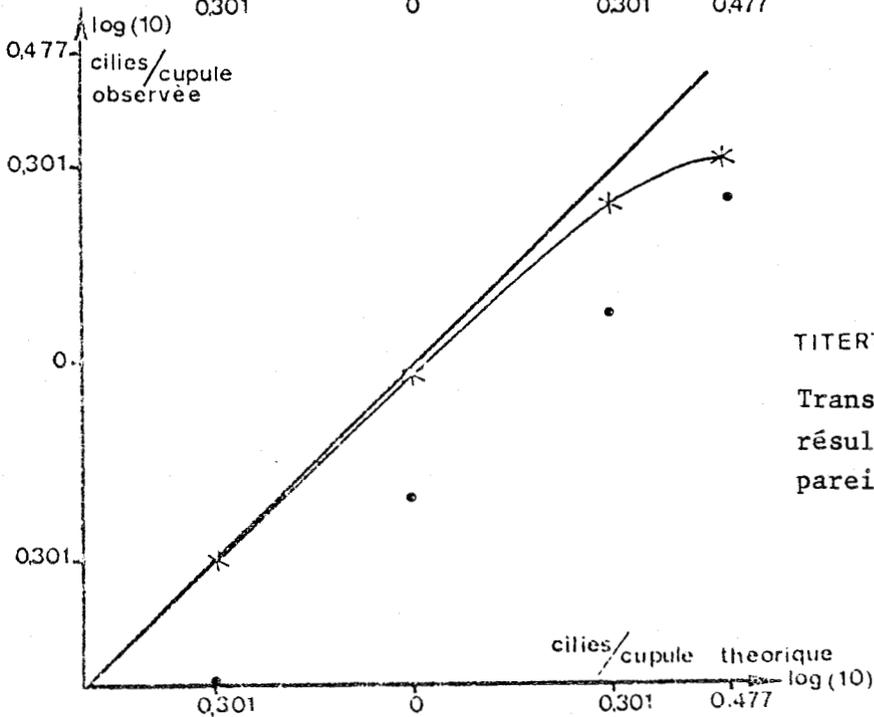
b)



DYNADROP

Transformation log log des résultats obtenus avec le Dynadrop

c)



TITERTEK

Transformation log log des résultats obtenus avec l'appareil Titerteck



FIG. 58 - Influence de la méthode de dilution, de la concentration finale théorique et de l'appareil de distribution sur la concentration réelle observée (Ciliés/cupule)

*: dilution indirecte

: dilution directe

TABLEAU 30. Logarithme de la concentration réelle obtenue selon la technique de distribution et la méthode de dilutions utilisées.

Technique de distribution et de dilution	Log ₁₀ de la concentration théorique (concentration théorique en cellules/cupule entre parenthèses)				
	- 0,301 (0,5)	0 (1)	+ 0,301 (2)	+ 0,477 (3)	
<u>- Dynadrop :</u>					
Dilution directe	\bar{X}	- 0,397	0,322	0,104	0,246
	S	0,122	0,045		0,107
	n	4	4	2	4
Dilution indirecte	\bar{X}	- 0,316	- 0,351	0,226	0,3
	S	0,168	0,027	0,162	0,092
	n	6	5	4	6
<u>- Pipettes Titertek :</u>					
Dilution directe	\bar{X}	- 0,501	- 0,259	0,075	0,251
	S	0,169	0,223	0,142	0,05
	n	16	18	14	4
Dilution indirecte	\bar{X}	- 0,306	- 0,015	0,244	0,310
	S	0,084	0,121	0,082	0,103
	n	12	18	10	6

\bar{X} = moyenne ; S = écart type ; n = nombre d'observations.



- Les deux méthodes doivent donner des résultats équivalents si la préculture est tout à fait homogène. Or, cela est loin d'être le cas et on observe souvent des *Colpidium* groupés en amas de 4 à 10 individus. Même si l'on homogénéise le mieux possible la culture avant le prélèvement, la prise d'un petit volume de culture peut amener une grande variation dans la méthode directe si un ou plusieurs amas sont pris avec l'échantillon. Si l'on prélève un plus grand volume, l'hétérogénéité possible de la culture n'a qu'une influence très atténuée. Comme la suspension intermédiaire est mélangée à son tour, les derniers amas se disloquent et la distribution finale est beaucoup moins fluctuante.

A partir des expériences préliminaires, nous avons pu définir les conditions optimales d'expérimentation :

- Pipettes Titertek multipointes de 200 μ l et 20 μ l
- Plaques de microtitration Nunc 96 trous en U
- Concentration finale théorique comprise entre 0,5 et 1 cilié par cupule pour conserver la linéarité de réponse
- Temps d'incubation : 6 jours.

IV - APPLICATION A LA MESURE DE TOXICITE

1) ESSAI AVEC LE BICHROMATE DE POTASSIUM

Des essais d'étalonnage réalisés avec le bichromate de potassium ont donné les résultats suivants :

TABLEAU 31. DV₅₀ et D.M.A. de quelques substances pour *C. campyllum*.

Substance	Sel	DV ₅₀	D.M.A.
Hg	HgCl ₂	0,011	0,040
Co	Co(NO ₃) ₂	0,35	0,1
Cu	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,012	0,25
Cd	Cd(NO ₃) ₂	0,24	0,16
Pb	Pb(CH ₃ COO) ₂	0,53	0,4
Al	Al(NO ₃) ₃	0,42	
S D S		13	10 - 30
Diocylsulfosuccinate		30	
Pentachlorophénol		0,1	0,6
Hexachlorophène		3,5 - 10	0,3
Bromophosméthyl		1	5,6
Parathion méthyl		1 - 3,5	6,3
Heptachlorépoxyde		1 - 3,5	3,16
Fenclorphos		1 - 3,5	3,16
PCB ₄		3,5 - 10	1 - 10
PCB ₂		10	1
2 phényl phénol		10	6,3
Dinoseb		1 - 3,5	
Carbaryl		1	10
H C H		1	10

RUS
1111

- $DV_{50} = 28,33 \text{ mg/l}$
- s = 11,97
- n = 12
- $Ic_{0,05} = 7,59$
- $Ic_{0,01} = 10,7$

Les résultats obtenus pour d'autres toxiques sont groupés dans le tableau 31 et comparés à la D.M.A. obtenue par la méthode de croissance.

Dans l'ensemble, les zones de sensibilité sont identiques pour les deux méthodes, ce qui veut dire que la DV_{50} est très proche de la Dose Minimale Active, des discordances importantes étant observées avec le Cuivre le Pentachlorophénol et l'HCH où la DV_{50} est inférieure à la D.M.A.

La méthode microplaque reflète donc bien, en général, la sensibilité du *Colpidium* telle que nous l'avons définie avec la méthode de mesure de croissance.

DISCUSSION GENERALE

Les travaux que nous avons réalisés avec les produits toxiques amènent à s'interroger sur deux types de problèmes concernant l'utilisation de *Colpidium campylum* en écotoxicologie :

- les contraintes techniques comparées à celles d'autres tests ;
- les applications et la représentativité des Protozoaires comparé à celle des autres organismes.

I - LES METHODES DE TESTS

Il est intéressant de comparer les aspects techniques des méthodes de tests sur Protozoaires avec ceux de méthodes normalisées comme la Daphnie ou le poisson zèbre.

Les deux tests normalisés exigent une pièce climatisée (poissons) ou au moins une très grande enceinte à température constante. L'encombrement dû aux bacs d'élevage de daphnies ou aux containers de stockage des poissons est très important. Dans le cas des tests Protozoaires, l'encombrement est minimum et une simple étuve bactériologique, plus un petit plan de travail suffisent pour les tests.

Sur le plan méthodologie, si les tests poissons et daphnies sont d'une technique très simple à mettre en oeuvre, les tests Protozoaires peuvent être effectués par n'importe quel laboratoire de bactériologie. Le test de viabilité est le plus simple à réaliser, mais le test "croissance" est plus rapide à mettre en oeuvre. Si l'exigence d'un compteur de particules est restée longtemps un handicap pour le test de mesure de croissance, on trouve actuellement dans le commerce des appareils coûtant le prix d'un spectrophotomètre de qualité moyenne, qui peuvent être polyvalents et servir tout à la fois pour compter des Protozoaires, des Algues et même de jeunes

Crustacés. L'interprétation de la mesure de la DL_{50} (poisson), de la CI_{50} (daphnie) semble, au premier abord, plus simple à mesurer que la Dose Minimale Active ou la DV_{50} qui nécessitent quelques calculs. Mais le calcul précis de la DL_{50} demande le passage par les probits et l'usage d'un petit ordinateur est le bienvenu. Nos calculs sont aisément effectués à l'aide d'un petit calculateur et permettent de contrôler au maximum les fluctuations du matériel.

Sur le plan standardisation, les cultures de Protozoaires sont plus strictement contrôlées que les élevages de crustacés ou de poissons. La reproductibilité de la croissance est excellente. Les travaux effectués sur la culture axénique et la mise au point du test "viabilité" avec *Colpidium* nous ont permis d'améliorer encore le test "croissance". En travaillant actuellement à 28°C avec des bactéries séchées du commerce dans 10 ml ou même 5 ml, nous obtenons actuellement les résultats en 24 heures avec une reproductibilité de croissance de 3 %.

Le test "croissance" peut rivaliser, dans ces conditions, avec les tests normalisés, en ce qui concerne la durée. Sur ce point précis, le test de viabilité se trouve handicapé par sa durée de cinq jours, difficile à réduire, même en utilisant un Protozoaire à croissance plus rapide que celle de *Colpidium* comme *Tetrahymena*.

Travaillant sur les Protozoaires avec des volumes de culture réduits, nos besoins en produit à tester sont moins importants que pour le test daphnie et surtout le test poisson zèbre. Ceci est très intéressant quand il s'agit de connaître la toxicité de produits très onéreux ou de fabrication difficile.

Les contraintes techniques demandées par les tests Protozoaires sont donc comparables à celles des autres tests normalisés ; nos méthodes sont en particulier bien standardisées et moins gourmandes en espace et en produit à tester. Les exigences de calcul pour l'interprétation sont identiques et le temps de réponse est comparable dans le cas du test "croissance". Il nous faut maintenant examiner les applications possibles de ces tests.

II - APPLICATION

1) APPLICATION AUX MESURES DE TOXICITE SIMPLE

Nous avons examiné en détail dans un travail précédent (65) les possibilités d'applications aux eaux usées et aux eaux de surface. Les écueils principaux au test sont : 1) les particules présentes dans l'eau à tester ; 2) les bactéries et la matière organique pouvant provoquer une surcroissance des Ciliés.

La première difficulté est levée presque totalement par une décantation classique de 2 heures, analogue à celle pratiquée pour les tests normalisés. La seconde est beaucoup plus difficile à tourner. Actuellement, seule une filtration préalable du rejet permet de pratiquer le test. Cette filtration élimine, bien sur, une partie de la toxicité qui peut être présente dans les particules en suspension ou adsorbées à leur surface. Il faut toutefois garder à l'esprit que pour le *Colpidium*, toute particule supérieure à 2 μm n'est pas ingérée et son importance sur le plan toxicité s'en trouve grande

diminuée. Le test réalisé sur un filtrat donnera une approximation de la toxicité "soluble" contenue dans l'effluent. Quoique moins représentatifs que les tests normalisés Daphnie ou Poisson zèbre, les tests *Colpidium* sont quand même susceptibles d'apporter des indications sur la toxicité des effluents. Pour tous les organismes microscopiques susceptibles d'être utilisés (bactéries, levures, microalgues, protozoaires) pour des tests, la présence de particules en suspension constitue un handicap pour des mesures rapides. En effet, le comptage manuel, qui lève toutes les hypothèques contre les tests protozoaires, nous semble difficilement compatible avec des mesures de toxicité en série sur des effluents.

Nos travaux montrent que la sensibilité de *Colpidium campylum* est tout à fait comparable à celle des tests normalisés en ce qui concerne les polluants minéraux, les détergents et les solvants. Notre méthode est même plus sensible pour un certain nombre de substances. Pour les pesticides, *Colpidium* est un indicateur nettement moins efficace, mais notre Cilié est très éloigné, sur le plan organisation et physiologie, des espèces cibles des pesticides (champignons, plantes et insectes). Ceci explique sa sensibilité moins grande. Il existe, à l'heure actuelle, peu de tests Protozoaires réellement opérationnels pour les mesures de toxicité. C'est pourquoi nous pensons que le test *Colpidium* basé sur la croissance pourrait être proposé à titre de test Protozoaire dans le cadre des fiches écotoxicologiques demandées par la C.E.E. dans les dossiers d'agrément des substances nouvelles. Plus sensibles que les bactéries, représentatifs des chaînes trophodynamiques détritivores, les Protozoaires constituent un maillon important des systèmes naturels et leur réaction aux polluants peut constituer un indice utile en écotoxicologie.

2) APPLICATION A LA RECHERCHE EN ECOTOXICOLOGIE

Les domaines de recherche ouverts à l'application des tests *Colpidium* en écotoxicologie sont très importants et variés.

La méthode simple permet, grâce à l'analyse factorielle, l'étude des interactions entre toxiques et la modélisation de pollutions mixtes complexes. On peut également étudier les interactions toxique-solvant et optimiser les conditions expérimentales. La mesure de l'accumulation des toxiques est possible et l'étude de toxiques insolubles peut être réalisée aisément grâce à la petite taille et à la transparence de notre organisme par des méthodes très performantes comme la spectrométrie Raman exécutée à l'échelle microscopique.

Un des domaines d'application les plus intéressants est l'étude des relations entre structure chimique et toxicité. Nous avons montré tout l'intérêt de nos techniques pour l'étude des polychlorobiphényles. Nos besoins réduits en produits ont permis l'étude d'isomères purifiés qui n'étaient disponibles qu'en petite quantité et nous ont permis d'établir certaines relations entre la structure des molécules et la toxicité des produits. Nous avons pu, de la même façon, repérer le site actif probable de la PR toxine et analyser la chaîne de métabolisation de ce produit dans le champignon, les produits étant alors disponibles en quantités de l'ordre du mg. La détection directe de certaines toxines dans les extraits mycéliens de champignon suspect est plus aisée à réaliser qu'avec *Artemia salina* car le *Colpidium* est moins sensible aux acides gras que le crustacé. La détection des souche

toxinogènes de champignons doit pouvoir s'étendre, en plus de la PR toxine, au diacétoxyscirpénol, à la patuline et, à un moindre degré, à la botryodiplo-dine. Le test *Colpidium* ne permet pas la détection des Aflatoxines et de l'Ochratoxine, certainement à cause d'un métabolisme particulier. On sait, en effet, que *Tetrahymena* est capable de métaboliser l'Aflatoxine (218). L'application du test *Colpidium* apparaît donc intéressante dans le domaine de l'industrie alimentaire, surtout dans la détection de contamination des produits du maïs (diacétoxyscirpénol) et des produits à base de pommes (patuline). Il faut dans ce cas essayer de rendre les méthodes encore plus sensibles et nous nous y employons actuellement grâce à des cultures axéniques de *Colpidium*. Le champ d'application des tests *Colpidium* se montre extrêmement étendu dans le domaine de l'écotoxicologie expérimentale. Nos travaux actuels et futurs s'orientent vers deux directions principales : l'application pratique à la détection des souches fongiques toxinogènes et l'influence de la complexation des métaux sur leur toxicité. Dans ces deux domaines, le *Colpidium* par sa sensibilité plus grande que celle des crustacés et des poissons, constitue un outil idéal de travail.

CONCLUSION GENERALE

Nos travaux nous ont permis d'approfondir les connaissances sur *Colpidium campylum*, tant dans le domaine de sa nutrition que dans celui de sa sensibilité aux toxiques où les résultats sont d'une portée plus générale et concernent la représentativité des Protozoaires en écotoxicologie.

L'étude de la culture axénique de *Colpidium campylum* nous a permis de mettre au point un milieu d'usage très simple permettant d'obtenir une multiplication rapide et des densités cellulaires importantes. Le milieu étant dépourvu de protéines à l'état précipité, nous pouvons obtenir aisément de grandes quantités de cellules non contaminées, donc particulièrement aptes aux études biochimiques. Nos travaux sur des milieux semi-synthétiques ont montré l'importance de certains éléments nutritifs comme des acides aminés particuliers (cystéine, cystine, tyrosine) et des lipides (acides oléiques, α céphaline et complexes phospholipidiques, stigmastérol) sur la croissance de *Colpidium*. Nous avons posé également un certain nombre de problèmes relatifs à la pénétration et au transport des substances nutritives. *Colpidium campylum* apparaît plus exigeant que *Tetrahymena* et se rapproche de *Paramecium* pour ses besoins nutritionnels. Enfin, nos expériences préliminaires nous ont permis de vérifier la possibilité de synchronisation de *Colpidium*. Ces travaux doivent être poursuivis afin de mettre à la disposition des chercheurs, un second modèle Protozoaire susceptible d'être utilisé dans de nombreux domaines et en particulier en toxicologie. Le temps de génération de notre souche (8 h) plus long que celui de *Tetrahymena* (2 h 30) permet une meilleure analyse du cycle cellulaire et de ses perturbations.

L'étude de la nutrition holozoïque de *Colpidium campylum* nous a permis d'apporter de nombreux résultats importants pour la compréhension de

l'alimentation des Ciliés dans la nature. Une concentration minimale en particules apparaît nécessaire dans le milieu environnant la cellule pour qu'une activité normale des membranelles soit induite. Les particules sont retenues ensuite en fonction de leur taille et de leur concentration par le filtre constitué par la membrane parorale. Le fait que des résultats convergents aient été obtenus en culture axénique et en culture monoxénique montre que le phénomène correspond à une réaction spécifique de *Colpidium* et qu'il est indépendant des conditions de culture.

Cette observation, transposée sur le plan de la nutrition qualitative incite à parler, non de préférence des Ciliés pour telle ou telle bactérie, mais de valeur nutritive. Les expériences que nous avons réalisées sur des mélanges de bactéries indiquent, en effet, que c'est la différence de taille et la composition chimique de la paroi qui conditionnent les résultats observés. La différence de valeur nutritive observée entre les bactéries Gram - et Gram + est éclairée par nos travaux sur les cultures axéniques. En effet, les bactéries Gram - contiennent dans leur paroi, de nombreuses substances qui activent nettement la croissance axénique de *Colpidium* (acides aminés, lipides), ces constituants étant pratiquement absents chez les bactéries Gram +.

Nous avons également apporté les preuves de la toxicité de certains pigments bactériens (pyocyanine, violacéine) après purification préalable.

Sur le plan écologique, nos résultats concordent avec les données d'analyses bactériologiques acquises sur le site d'isolement de notre souche.

Ils montrent également que *Colpidium campylum*, Cilié des eaux polluées, va jouer un rôle important dans les phénomènes d'auto-épuration microbienne en éliminant les germes de contamination fécale et l'excédent de bactéries produits lors de la minéralisation de la matière organique.

Les données microbiologiques quantitatives recueillies sur le terrain concordent également avec les seuils critiques que nous avons définis expérimentalement et permettent d'interpréter d'une manière plus correcte les phénomènes de multiplication de *Colpidium campylum* dans la nature.

L'application des Protozoaires pour la mesure de toxicité n'a fait l'objet, jusqu'à présent, que de travaux limités à quelques produits. Seule l'étude extensive réalisée par BRINGMANN et KUHN (26) avec *Entosiphon sulcatum* peut se comparer avec la gamme de produits que nous avons testée grâce à *Colpidium campylum*.

Nous avons pu mettre au point deux techniques simples offrant des applications multiples, à la fois fondamentales et appliquées.

L'utilisation de l'inhibition de la croissance de *Colpidium campylum* pour effectuer des mesures de toxicité nous a permis d'apporter les résultats suivants :

- *C. campylum* constitue un outil excellent pour la mesure de toxicité de nombreux polluants minéraux et organiques pour lesquels sa sensibilité est comparable ou meilleure que celle des tests normalisés. Pour les pesticides, il s'est avéré être un indicateur moins efficace. Les petits volumes

de culture et le peu d'espace requis, la simplicité et la reproductibilité du test, l'entretien des cultures qui appartient aux techniques bactériologiques classiques, sont à l'avantage de notre technique. Le dénombrement électronique des populations augmente la rapidité de la lecture et le nombre d'essais possibles simultanément.

Il paraît souhaitable d'appliquer cette méthode dans le cadre des tests écotoxicologiques nécessaires à l'agrément de nouveaux produits chimiques au titre de test sur microorganisme.

Outre ce type d'application, nous avons montré son intérêt dans les recherches écotoxicologiques de type fondamental. C'est ainsi que nous avons pu analyser en détail la toxicité des PCB en rapport avec leur structure et déterminer le site actif de la P.R. toxine.

La méthode miniaturisée que nous avons développée présente plusieurs avantages par rapport aux méthodes déjà décrites :

- Elle ne nécessite pas de matériel lourd spécialisé pour sa mise en oeuvre. Le matériel courant utilisé en sérologie ou en immunologie est parfaitement adapté.
- La lecture est rapide et facile.
- Grâce aux tables, les calculs sont réduits au minimum.
- Elle définit la DV_{50} qui est d'interprétation générale très classique.
- Elle n'exige qu'un minimum de produit pur ou d'eau à tester.

L'inconvénient majeur de notre technique réside actuellement dans sa durée. Il faut, en effet, 5 à 6 jours en travaillant à 28°C pour obtenir une réponse cohérente. Nous avons espéré pouvoir améliorer ces délais en utilisant *Tetrahymena pyriformis* G.L., qui se multiplie beaucoup plus vite que *Colpidium* mais la durée du test reste de 4 à 5 jours.

Malgré cet inconvénient, la simplicité de la méthode en microplaques plaide en faveur de son application pour la mesure de toxicité de nombreux produits. Elle constitue en effet, avec le test de BRINGMANN et KUHN (26) la seule méthode opérationnelle simple pour les Protozoaires.

L'application des tests *Colpidium* continue d'ailleurs actuellement, orientée principalement vers l'étude des interactions entre les complexants naturels (acides humiques) et certains métaux lourds (cadmium, cuivre, plomb).

Comment doit se développer, dans l'avenir, l'utilisation des Ciliés dans les recherches écotoxicologiques ?

Outre l'usage des deux méthodes décrites pour les tests systématiques sur des substances pures, les tests *Colpidium* peuvent résoudre un certain nombre de problèmes pratiques comme la détection de souches de champignons toxigènes ou des métabolites toxiques dans des produits alimentaires (céréales). La limite de sensibilité étant atteinte dans le cadre de nos techniques actuelles, nous pensons utiliser dans l'avenir des cultures axéniques de Ciliés (*Colpidium*, *Tetrahymena*) et même, des cultures synchrones qui pourraient permettre une analyse plus fine des phénomènes. Le domaine

d'application des Protozoaires pour la mesure de toxicité se trouverait ainsi étendu à l'analyse toxicologique et à la détermination des cibles cellulaires des toxiques.

ANNEXES

TECHNIQUES

ANNEXE I

MILIEUX DE CULTURE ET D'ETUDE POUR *COLPIDIUM CAMPYLUM*

1 - ISOLEMENT DE LA SOUCHE DE COLPIDIUM CAMPYLUM

La souche de Cilié étudiée a été isolée à partir d'un bassin de lagunage de la région de LILLE. Elle a été obtenue par enrichissement sur une suspension bactérienne (*Enterobacter cloacae*) à partir de l'eau du bassin. Elle a été isolée en clone, puis établie en culture axénique par traitement aux antibiotiques après antibiogramme de la flore contaminante. La caractérisation de la souche a été réalisée après coloration au nitrate d'argent (39) en utilisant le Dahl (118). Elle a été confirmée par l'imprégnation au protargol et par étude en microscopie électronique de la bouche. Les figures 1, 2 et 3 montrent respectivement l'aspect général de la cellule photographiée en contraste interférentiel (fig. 1), l'aspect général et la structure de la bouche après imprégnation au protargol (fig. 2) et l'aspect révélé par la microscopie électronique (fig. 3).

2 - MILIEUX POUR L'ETUDE DE LA CULTURE AXENIQUE DE COLPIDIUM CAMPYLUM

A/ MILIEU DE BASE D'ENTRETIEN (AXM) (4)

Dans ce milieu, l'autolysat de levure a été remplacé par de l'extrait de levure

Caséine alcalisoluble (Merck)	2,5 g
Extrait de levure (Difco)	0,5 g
K ₃ PO ₄	1 g
H ₂ O distillée	950 ml

On dissout la caséine dans 100 ml d'eau bouillante en ajoutant goutte à goutte KOH concentrée jusqu'à dissolution. On ajoute alors l'extrait de levure, puis le phosphate tripotassique. On complète à 950 ml avec de l'eau distillée et on ajuste à PH 7,0 avec de l'acide orthophosphorique. La caséine précipite alors finement. Après stérilisation à l'autoclave (115° C, 20 mn), on ajoute aseptiquement:

.../...

glucose 5 g
H₂O 50 ml

Cette solution est stérilisée à part.

Le milieu est alors réparti en flacons ou en fioles d'Erlenmeyer .

B/ MILIEU PROTEOSE PEPTONE EXTRAIT DE LEVURE (PPYS)

C'est le milieu type utilisé pour la culture de *Tetrahymena pyriformis* défini par Plesner (162)

- Base Proteose Peptone

Proteose Peptone (Difco) 7,5 g
Extrait de levure(Difco) 7,5 g
H₂O distillée q.s.p. 1000 ml

- Solution saline A

MgSO₄, 7 H₂O 10 g
Fe(NH₄)₂(SO₄)₂,6H₂O 2,5 g
MnCl₂ 4 H₂O 50 mg
ZnCl₂ 5 mg
H₂O q.s.p 1000 ml

- Solution saline B

CaCl₂ 2H₂O 5 g
CuCl₂ 2H₂O 500 mg
FeCl₃ 6H₂O 125 mg
H₂O q.s.p 1000 ml

On dissout peptone et extrait de levure dans l'eau distillée, on ajoute 10 ml de chaque solution saline. On fait bouillir 5 mn puis on filtre sur papier filtre plissé. On répartit en flacons et on stérilise 20 mn à 121°C.

C/ MILIEU DEFINI (MD)

C'est le milieu minimum de base pour la culture de *Tetrahymena pyriformis* G.L (170).

Tous les produits sont de qualité Sigma Grade.

Solution stock 1 Acides aminés

D.L. Alanine	3 g
L Arginine HCl	3 g
L Asparagine H ₂ O	2 g
L Acide Glutamique	4 g
L Glutamine	1 g
Glycine	4 g
L Histidine HCl, H ₂ O	2 g
L Isoleucine	2 g
L Leucine	2 g
L Lysine HCl	2 g
D.L. Methionine	3 g
D.L. Phenylalanine	3 g
L Proline	2 g
D.L. Sérine	3 g
L Thréonine	2 g
L Tryptophanne	1,5 g
D.L. Valine	2 g
H ₂ O distillée q.s.p	500 ml

Chauffer à 50° C pour favoriser la dissolution. Stériliser par filtration sous pression sur membrane de 0,22 µm, la partie non filtrée est conservée au congélateur.

Solution stock 2 Bases puriques et pyrimidiques

Uridine	100 mg
Adénosine	100 mg
Cytidine	100 mg
Guanosine	100 mg
H ₂ O distillée q.s.p	50 ml

.../...

Dissoudre à chaud. Stériliser sous pression sur membrane de 0,22 μ m. Congeler les solutions stocks.

Avant utilisation, chauffer au bain marie pour dissoudre la partie précipitée.

- Solution stock 3 A Vitamines

Acide nicotinique	45 mg
Pantothénate de calcium	37,5 mg
Thiamine HCl	25 mg
Riboflavine 5' PNa	22,5 mg
Pyridoxamine 2 HCl	2,5 mg
Pyridoxal HCl	2,5 mg
Biotine	0,05 mg
Acide D.L thioctique	0,5 mg
H ₂ O distillée q.s.p	250 ml

Solubiliser l'acide thioctique dans 2 ml d'éthanol. Ajouter la biotine et laisser solubiliser. Etendre avec une partie de l'eau distillée ; dissoudre les autres produits et compléter à 250 ml.

Stériliser sous pression sur membrane de 0,22 μ m.

Conserver à 5° C.

- Solution stock 4 Tampon phosphate

K ₂ H PO ₄	100 g
K H ₂ PO ₄	100 g
H ₂ O distillée q.s.p	1000 ml

- Solution stock 5 Glucose

Glucose	25 g
---------	------

H₂O distillée q.s.p 100 ml

Stériliser sous pression sur membrane de 0,22 μ m. Conserver à 5° C.

- Solution stock 6 A

Acide citrique H₂O 15 g
CaCl₂ 2H₂O 2,5 g
H₂O distillée q.s.p 250 ml

Dissoudre l'acide citrique en premier. Après dissolution totale, ajouter le chlorure de calcium. Stériliser sous pression sur membrane de 0,22 µm. Conserver à 5° C.

- Solution stock 6 B

Mg SO₄ 7 H₂O 12,5 g
H₂O distillée q.s.p 250 ml

Stériliser sous pression sur membrane de 0,22 µm.
Conserver à 5° C.

- Solution stock 7 Oligo éléments

Fe (NH₄)₂(SO₄)₂, 6 H₂O 284 mg
Zn SO₄ 7 H₂O 90 mg
Mn SO₄ 4 H₂O 32 mg
Cu SO₄ 5 H₂O 10 mg
Co (NO₃)₂ 6 H₂O 10 mg
Mo₇O₂₄ (NH₄)₆ 4H₂O 2 mg
H₂O distillée q.s.p 100 ml

Ajuster à PH 2,0 à l'aide d'HCl concentré.

Stériliser sous pression sur membrane de 0,22 µm

Conserver à 5° C.

Préparation du milieu

Pour 200 ml de milieu, on mélange :

Solution	Volume (ml)
1	10
2	20
3 A	2

3 B	0,2
4	0,5
5	2
6 A	2
6 B	2
7	1
H ₂ O distillée q.s.p	200 ml

Ajuster le PH entre 6,8 et 7,2 avec KOH ou HCl.

Préfiltrer sous pression sur membranes de 0,45 μ m et 0,22 μ m associées. Stériliser par filtration sous pression dans un flacon stérile avec une membrane de 0,22 μ m. Le milieu est conservé à 5° C jusqu'à utilisation.

3 - MILIEU POUR L'ETUDE DE LA NUTRITION BACTERIENNE QUALITATIVE ET POUR LES TESTS DE TOXICITE

A partir de cultures axéniques sur milieu AXM, *Colpidium campylum* a été établi en culture monoxénique dans le milieu minéral suivant, additionné d'*Enterobacter cloacae*

Ca (NO ₃) ₂	200 mg
Mg SO ₄ 7H ₂ O	20 mg
K ₂ H PO ₄	20 mg
NaCl	20 mg
H ₂ O distillée q.s.p	1000 ml
PH	6,5 - 6,7

Ce milieu est stérilisé à l'autoclave 20 mn à 120° C
Les suspensions bactériennes (1,2 D.O. à 650 mn) sont
ajoutées juste avant l'emploi.

Les cultures monoxéniques de *Colpidium campylum* ont été
incubées à 20° C et à l'obscurité et repiquées toutes les
semaines. La stérilité des cultures axéniques et la pureté
des cultures monoxéniques ont été contrôlées chaque semaine
par isolement sur gélose nutritive ordinaire.

ANNEXE II

MILIEUX DE CULTURE POUR LES BACTERIES

1/ MILIEU STANDARD

Extrait de viande de boeuf	5 g
Peptone	10 g
NaCl	5 g
Agar en poudre	15 g
H ₂ O distillée q.s.p	1000 ml

Chauffer jusqu'à dissolution parfaite. PH 7-7,2 ±

Stériliser 20 mn à 120° C.

La plupart des germes sont cultivés 18 H à 30° C.

Le temps de culture a été prolongé à 48 ou 72 H pour certaines espèces à croissance lente (*Yersinia*, *Flavobacterium*).

2/ MILIEU POUR *CHROMOBACTERIUM LIVIDUM*

La pigmentogenèse de *Chromobacterium lividum* a été favorisée par addition, à la gélose nutritive, de 1 % de gélatine, selon GAUTHIER (79).

L'incubation est de 4 jours à 20° C.

3/ MILIEU POUR LA PRODUCTION DE PIGMENT CHEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Gélysate (Merieux)	20 g
Glycérol	10 g
SO ₄ K2	10 g
MgCl ₂ 7H ₂ O	1,4 g
Tyrosine	1 g
H ₂ O distillée q.s.p	1000 ml

PH 7,2

Les bactéries sont cultivées pendant 48 H à 30° C dans une fiole d'Erlenmeyer de 1 litre contenant 200 ml de milieu. La culture est ensuite abandonnée 24 H à la lumière et à la température du laboratoire.

4/ PREPARATION DE LA PYOCYANINE

Les cultures en milieu liquide sont centrifugées à 3500 t. pendant 20 mn et le surnageant constitue la pyocyanine brute (P.B). 100 ml de produit brut ont été extraits par 2 fois 10 ml de chloroforme. Ce premier extrait est filtré, puis traité volume à volume par HCl N/50 ; la pyocyanine passe en milieu acide et le colore en rouge. Après décantation et neutralisation par NaOH concentrée, la solution (bleue en milieu neutre) est traitée à nouveau par le chloroforme, filtrée puis évaporée.

Le résidu sec, resolubilisé dans 10 ml d'eau distillée, correspond à la pyocyanine semi purifiée (P.S.P.). Un passage sur gel de Sephadex G 25 fine permet de séparer un contaminant jaune qui correspond à un peu de pyoxanthose résiduelle (149). La pyocyanine pure (P.P) est ensuite ajustée à une concentration équivalente à celle du pigment dans l'extrait brut.

Une analyse spectrophotométrique des fractions a été réalisée sur les solutions aqueuses. Elle montre clairement la différence entre la fraction bleue (pyocyanine) et le contaminant jaune (pyoxanthose) et constitue une vérification de la pureté du produit.

5/ LISTE DES SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES

<u>TAXONOMIE ET SOUCHE</u>	<u>CARACTERISTIQUE</u>
FAMILLE DES ENTEROBACTERIACEAE (GRAM ⁻)	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Escherichia coli</i> MR ⁺	Multirésistant aux antibiotiques
<i>Escherichia coli</i> MR ⁻	Multisensible aux antibiotiques
<i>Escherichia coli</i> GEI 026B6	pathogène
<i>Escherichia coli</i> GEI 0111 B ₄	pathogène
<i>Shigella dysenteriae</i>	
<i>Shigella boydii</i>	
<i>Shigella flexneri</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Citrobacter freundii</i>	
<i>Enterobacter cloacae</i>	souche de référence
<i>Enterobacter</i> sp	pigmenté en jaune
<i>Serratia marcescens</i> n° 1	non pigmentée
<i>Serratia marcescens</i> n° 2	pigmentée
<i>Proteus morgani</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Salmonella enteritidis</i>	
<i>Salmonella typhi</i>	
<i>Salmonella paratyphi</i> A	
<i>Salmonella paratyphi</i> B	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	

Famille des Vibrionaceae (Gram⁻)

Aeromonas hydrophila

Aeromonas dourgesi pigmenté

Famille des Pseudomonadaceae (Gram⁻)

Pseudomonas sp. non pigmenté

Pseudomonas fluorescens pigmenté

Pseudomonas putrefaciens pigmenté

Pseudomonas aureofaciens pigmenté

Pseudomonas aeruginosa pigmenté

Famille des Cytophagaceae (Gram⁻)

Cytophaga sp. pigmenté

Incertae sedis (Gram⁻)

Chromobacterium lividum pigmenté

Flavobacterium sp. pigmenté

Famille des Micrococcaceae (Gram⁺)

Micrococcus sp.

Micrococcus sp. pigmenté

Staphylococcus aureus pigmenté

Staphylococcus albus pigmenté

Famille des Streptococcaceae (Gram⁺)

Streptococcus faecalis

Streptococcus faecium

Streptococcus durans

Famille des Peptococcaceae (Gram⁺)

Sarcina sp.

Famille des Bacillaceae (Gram⁺)

Bacillus Polymixa

Bacillus circulans

Bacillus sphaericus

Bacillus macerans

Bacillus licheniformis

Bacillus subtilis

Bacillus cereus

ANNEXE III

LES TECHNIQUES DE DENOMBREMENT ET D'ANALYSE DE
POPULATION

1/ PREPARATION ET NUMERATION DES CELLULES BACTERIENNES

Les cellules sont émulsionnées dans du milieu minéral stérile et centrifugées à 3.500 t/mn pendant 20 mn. Les cellules obtenues sont lavées 3 fois dans le même milieu, puis conservées à 4° C au maximum 48 H.

Pour dénombrer les bactéries, les culots sont remis en suspension dans 10 ml de milieu minéral stérile, homogénéisés mécaniquement (1 mn au Vortex), puis soumis aux ultra-sons pendant 1 mn dans une cuve de nettoyage (Kerry Ultrasonics Ltd). La suspension est dénombrée en hématimètre Thoma après fixation au formol à 10 % neutre. Le nombre de bactéries est ensuite ajusté, selon les besoins, à une densité de 1 à 2.10^9 cellules/ml.

2/ DENOMBREMENT DES PROTOZOAIRES

1. DENOMBREMENT DES FAIBLES POPULATIONS

On utilise la méthode de Curds et Vandyke (54). 1 ml de culture bien homogénéisée est réparti sur un couvercle de boîte de Pétri de 90 mm sous forme de très petites gouttes. On compte ensuite sous la loupe binoculaire (grossissement 40 x) le nombre de Ciliés présents dans chaque goutte et on totalise pour avoir la population dans 1 ml.

2. DENOMBREMENT EN CELLULE

4 ml de culture sont fixés par 0,4 ml de formol neutre. On effectue deux dénombrements sur chaque échantillon à l'aide d'une cellule de Nageotte, au microscope (grossissement 40 à 100 x).

3. DENOMBREMENT ELECTRONIQUE

5 ml de culture de *Colpidium* sont fixés par 10 ml d'une solution contenant 7,5 % de chlorure de sodium et 75 % de formol neutre. Cette solution est filtrée sur membrane de 0,45 μm . Les cellules sont dénombrées à l'aide d'un compteur Coulter (modèle Z_{bic}) dans les conditions suivantes : Sonde 200 μm , impédance d'entrée = 10 k Ω , courant d'ouverture : 1, atténuateur : 1/2, trimmer de gain : 0, seuil minimum : 15, volume analysé : 0,5 ml. 3 dénombrements sont effectués sur le même échantillon puis la population réelle est calculée.

3/ ANALYSE DIMENTIONNELLE DE LA POPULATION DE COLPIDIUM

Pour les dénombrements et l'analyse dimensionnelle, nous avons utilisé le compteur Coulter Z_{bic} équipé d'un analyseur d'impulsions à 64 canaux (P 64 Coulter Electronics Inc), d'un intégrateur (M.C.V. hématocrite) et d'un enregistreur (X - Y).

Afin d'étudier les variations du volume des cellules, nous avons étalonné l'appareil à l'aide d'une suspension de pollen de noisetier d'un diamètre de $23,3 \mu\text{m}$ (Coultronics France).

L'analyse de populations de Protozoaires d'âge différent nous a permis de déterminer le seuil inférieur de sensibilité de l'appareil pour compter les plus petits individus.

Le volume maximal atteint par *C. Campylum* a été étudié par une expérience préliminaire. Les réglages ont été ajustés de façon à ce que toute la population de Ciliés soit dénombrée et analysée :

Coulter Counter : Sonde $200 \mu\text{m}$; Impédance d'entrée $10 \text{ k}\Omega$;
Courant d'ouverture = 1 ; Atténuateur = 8 ; Trimmer de gain = 4 ;
seuil = 3.

Analyseur P 64 et enregistreur XY.

L'analyseur P 64 classe les impulsions, proportionnelles au volume de chaque Cilié passant par l'orifice, en 64 classes de volume équivalent. Il offre trois possibilités d'analyse :

- Une analyse volumétrique exécutée pendant un temps fixé arbitrairement, réglable de 0 à 999 secondes
- Une analyse des individus contenus dans 0,05-0,5 ou 1 ml de culture fixée.

Ces deux premières méthodes donnent des résultats qualitatifs mais les données numériques ne sont pas directement accessibles.

- Une analyse poursuivie jusqu'à ce que la classe modale de la population étudiée contienne un nombre de cellules fixé à l'avance. Sur le graphique, $y = 100$ correspond à cette valeur. Il est facile de calculer le nombre d'individus correspondant à chaque classe et d'étudier ainsi la distribution de la population.

Les réglages utilisés pour le système P 64 XY ont été les suivants :

Analyseur P 64 : seuil de détection = 3 ; nombre d'impulsions dans la classe modale = 256

Enregistreur XY : $y = 100 = 256$ impulsions

$x = 100 = 80\ 000\ \mu\text{m}^3$

Réglage de l'intégrateur MCV hématoците.

Cet appareil intègre directement les valeurs des impulsions reçues pendant les analyses par le P 64 et fournit le volume moyen cellulaire de la population sans donner aucune indication sur la distribution elle-même. Nous avons adopté pour son utilisation le réglage 1 Unité MCV = $100\ \mu\text{m}^3$.

L'utilisation du comptage électronique exige la filtration sur membrane de $0,45\ \mu\text{m}$ du milieu minéral utilisé pour le lavage des bactéries et pour les cultures de *Colpidium*.

ANNEXE IV

CONCENTRATION MOYENNE PAR CUPULE SELON LE NOMBRE DE CUPULES POSITIVES

DANS UNE PLAQUE

NOMBRE DE CUPULES +	C						
1	0,01047	25	0,30166	49	0,71420	73	1,42885
2	0,02105	26	0,31585	50	0,73570	74	1,47330
3	0,03174	27	0,33024	51	0,75768	75	1,51982
4	0,04255	28	0,34484	52	0,78015	76	1,56861
5	0,05348	29	0,35965	53	0,80314	77	1,61990
6	0,06453	30	0,37469	54	0,82667	78	1,67397
7	0,07571	31	0,38996	55	0,85077	79	1,73113
8	0,08701	32	0,40546	56	0,87546	80	1,79175
9	0,09844	33	0,42121	57	0,90078	81	1,85629
10	0,11000	34	0,43721	58	0,92676	82	1,92529
11	0,12169	35	0,45347	59	0,95343	83	1,99939
12	0,13353	36	0,47000	60	0,98082	84	2,07944
13	0,14550	37	0,48681	61	1,00900	85	2,16645
14	0,15762	38	0,50390	62	1,03798	86	2,26176
15	0,16989	39	0,52129	63	1,06784	87	2,36712
16	0,18232	40	0,53899	64	1,09861	88	2,48490
17	0,19490	41	0,55701	65	1,13036	89	2,61843
18	0,20763	42	0,57536	66	1,16315	90	2,77258
19	0,22054	43	0,59405	67	1,19705	91	2,95491
20	0,23361	44	0,61310	68	1,23214	92	3,17805
21	0,24686	45	0,63252	69	1,26851	93	3,46573
22	0,26028	46	0,65232	70	1,30625	94	3,87120
23	0,27388	47	0,67252	71	1,34547	95	4,56434
24	0,28768	48	0,69314	72	1,38629		



CONCENTRATION MOYENNE PAR CUPULE EN FONCTION DU NOMBRE DE
CUPULES POSITIVES DANS 2 PLAQUES

Nombre de cupules +	C	Nombre de cupules +	C	Nombre de cupules +	C	Nombre de cupules +	C
1	0,00522	36	0,20763	71	0,46170	106	0,80314
2	0,01047	37	0,21407	72	0,47000	107	0,81484
3	0,01574	38	0,22054	73	0,47837	108	0,82667
4	0,02105	39	0,22705	74	0,48681	109	0,83865
5	0,02638	40	0,23361	75	0,49532	110	0,85077
6	0,03174	41	0,24021	76	0,50390	111	0,86304
7	0,03713	42	0,24686	77	0,51256	112	0,87546
8	0,04255	43	0,25354	78	0,52129	113	0,88804
9	0,04800	44	0,26028	79	0,53010	114	0,90078
10	0,05348	45	0,26706	80	0,53899	115	0,91368
11	0,05899	46	0,27388	81	0,54796	116	0,92676
12	0,06453	47	0,28076	82	0,55701	117	0,94000
13	0,07010	48	0,28768	83	0,56614	118	0,95343
14	0,07571	49	0,29465	84	0,57536	119	0,96703
15	0,08134	50	0,30166	85	0,58466	120	0,98082
16	0,08701	51	0,30873	86	0,59405	121	0,99481
17	0,09270	52	0,31585	87	0,60353	122	1,00900
18	0,09844	53	0,32302	88	0,61310	123	1,02338
19	0,10420	54	0,33024	89	0,62276	124	1,03798
20	0,11000	55	0,33751	90	0,63252	125	1,05280
21	0,11583	56	0,34484	91	0,64237	126	1,06784
22	0,12169	57	0,35222	92	0,65232	127	1,08310
23	0,12759	58	0,35965	93	0,66237	128	1,09861
24	0,13353	59	0,36714	94	0,67252	129	1,11436
25	0,13950	60	0,37469	95	0,68278	130	1,13036
26	0,14550	61	0,38229	96	0,69314	131	1,14662
27	0,15154	62	0,38996	97	0,70361	132	1,16315
28	0,15762	63	0,39768	98	0,71420	133	1,17995
29	0,16374	64	0,40546	99	0,72489	134	1,19405
30	0,16989	65	0,41330	100	0,73570	135	1,21444
31	0,17609	66	0,42121	101	0,74663	136	1,23214
32	0,18232	67	0,42918	102	0,75768	137	1,25016
33	0,18859	68	0,43721	103	0,76885	138	1,26856
34	0,19490	69	0,44531	104	0,78015	139	1,28720
35	0,20124	70	0,45347	105	0,79158	140	1,30625

BIBS
1962

Nombre de cupules +	C	Nombre de cupules +	C
141	1,32566	176	2,48490
142	1,34547	177	2,54944
143	1,36567	178	2,61843
144	1,38629	179	2,69254
145	1,40734	180	2,77258
146	1,42885	181	2,85960
147	1,45083	182	2,95491
148	1,47330	183	3,06027
149	1,49629	184	3,17805
150	1,51982	185	3,31158
151	1,54392	186	3,46573
152	1,56861	187	3,64805
153	1,59393	188	3,87120
154	1,61990	189	4,15888
155	1,64657	190	4,56434
156	1,67397	191	5,25749
157	1,70214		
158	1,73113		
159	1,76098		
160	1,79175		
161	1,82350		
162	1,85629		
163	1,89019		
164	1,92529		
165	1,96165		
166	1,99939		
167	2,03861		
168	2,07944		
169	2,12200		
170	2,16645		
171	2,21297		
172	2,26176		
173	2,31305		
174	2,36712		
175	2,42428		



BIBLIOGRAPHIE



1. ASSOCIATION FRANCAISE DE NORMALISATION. 1974. Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Crustace Cladocère).
Norme N.F. T 90 301
2. ASSOCIATION FRANCAISE DE NORMALISATION. 1977. Détermination de la toxicité vis-à-vis du poisson zèbre (*Brachydanio rerio*, Buchanan).
Norme N.F. T 90 303
3. ANDRIVON. 1978. Etude du système de régulation de la perméabilité à l'ion nickel chez *Paramecium* et de ses rapports avec le chenal calcique d'excitation. Thèse Université Sciences Exactes et Naturelles Clermont Ferrand
4. ANONYME. 1958. A catalogue of laboratory strains of free living and parasitic Protozoa. J. Protozool., 5 (1), 1-38
5. ANONYME. 1975. Parameciumtest. In ausgewählte Methoden der Wasser Untersuchung Band II, biologische, mikrobiologische and toxicologische Methoden. Veb. Gustav Fisher. Jena
6. APOSTOL S. 1972. Metoda testelor cronice de toxicitate pe protozoare. Stut. Cercet. Biol. Ser. Zool., 24, 215-223
7. APOSTOL S. 1973. Toxicitatea saponinei pentru nevertebratele acvative. Hidrobiol. Bucuresti, 13, 237-248
8. APOSTOL S. 1973. A bioassay of toxicity using Protozoa in the study of aquatic environment pollution and its prevention. Environ. Res., 6, 365-372
9. APOSTOL S. 1973. (Allemand). Effet du pesticide Dipterex sur le plancton de surface. Hidrobiol. Bucuresti, 14, 303-308
10. ARMSTRONG A.V., STEWART-TULL D.E.S. 1971. The site of the activity of extracellular products of *Pseudomonas aeruginosa* in the electron transport chain in mammalian cell respiration. J. Med. Microbiol. 4, 263

11. ARMSTRONG A.V., STEWART-TULL D.E.S., ROBERTS J.S. 1971. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* factor that inhibits mouse liver mitochondrial respiration. J. Med. Microbiol., 4, 249
12. ASHBY R.E. 1976. Long term variation in a protozoan chemostat culture. J. Experim. Mar. Biol. Ecol., 24, 227-235
13. BALAMUTH W., BRENT M.M. 1954. Biological studies on *Entamoeba histolytica* IV Direct action of the antibiotic prodigiosin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 75, 374-378
14. BENIJTS-CLAUS C., PERSOONE G. 1975. La toxicité de trois herbicides sur l'écosystème aquatique. Cent. Belg. Etude Doc. Eaux, 383, 1-8
15. BERGER D., MANNHEIM W. 1970. Anreicherung und Charakterisierung eines bakteriolytischen Amöbenenzym. Z. Naturforsch., 256, 1002-1010
16. BERGQUIST B.L., BOVEE E.L. 1973. Some adverse effects of cadmium on growth and locomotion of *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool., 20, 497
17. BERGQUIST B.L., BOVEE E.L. 1974. A rapid method for monitoring detrimental effects of chemicals on protozoan locomotor rates. J. Protozool., 21, 439
18. BERK S.G., COLWELL R.R., SMALL E.D. 1976. A study of feeding responses to bacterial prey by estuarine Ciliates. Trans. Am. Microsc. Soc., 95, 514-520
19. BERK S.G., MILLS A.L., HENDRICKS D.L., COLWELL R.R. 1978. Effects of ingesting mercury-containing bacteria on mercury tolerance and growth rates of Ciliates. Microb. Ecol., 4, 319-330
20. BERLIN M., GAGE J.C., HOLM S. 1974. Distribution and metabolism of polychlorobiphenyls. C.E.C., E.P.A. and W.H.O. Internat. Symp. Environment and Health Paris, June.

21. BONHOMME FLORENTIN A. 1966. Action des antibiotiques sur la culture des Ciliés oligotriches commensaux de la panse des ruminants. Ann. Univ. Reims, 4, 25-30
22. BONHOMME FLORENTIN A. 1970. Les Ciliés oligotriches, les bactéries du rumen et la digestion de la cellulose. Protistologica, 6, 383-388
23. BOZLER E. 1924. Über die Morphologie der Ernährungsorganelle und die Physiologie der Nahrungsaufnahme von *Paramecium caudatum* Ehrenberg. Arch. F. Protistenkd., 49, 163-215
24. BOZLER E. 1924. Über die physikälische Erklärung der Schundfadenströmungen, ein Beitrag zur Theorie der Protoplasmaströmungen. Z. Vergleich. Physiol., 2, 82-90
25. BRESSLAU E. 1922. Zur Systematik der Ciliatengattung *Colpidium*. Zool. Anz., 55, 21-28
26. BRINGMANN G., KUHN R. 1959. Wassertoxikologische Untersuchungen mit Protozoen als Testorganismen. Ges. Ing., 80, 239-242
27. BURBANK W.P. 1942. Physiology of the Ciliate *Colpidium colpoda*. I- The effect of various bacteria as food on the division rate of *Colpidium colpoda*. Physiol. Zool., 15, 342-362
28. BURBANK W.D., BIDDLE J.W. 1973. Bioassay of chemical toxicants using sessile Ciliates. Proc. IV Internat. Congress. Protozool. Clermont-Ferrand, 2-9 September 1973
29. BURBANK W.D., GILPIN D.W. 1946. Physiology of the Ciliate *Colpidium colpoda*. III- The possible use of the division rate of *C. colpoda* for identification of intestinal bacteria. Physiol. Zool., 19, 236-242
30. BURBANK W.D., SPOON D.M. 1967. The use of sessile Ciliates collected in plastic Petri dishes for rapid assessment of water pollution. J. Protozool., 14, 739-733

31. BUTTERFIELD. 1929. A note on the relation between food concentration in liquid media and bacterial growth. Publ. Hlth. Rep., 44, 2865
32. CAMERON I.L., JETER J.R.Jr. 1970. Synchronization of the cell cycle of *Tetrahymena* by starvation and refeeding. J. Protozool., 17 (3), 429-431
33. CANALE R.P., LUSTIG T.D., KEHRBERGER P.M., SALVO J.E. 1973. Experimental and mathematical modelling studies of protozoan predation on bacteria. Biotechnol. Bioengng, 15, 707-728
34. CARTER J.W., CAMERON I.L. 1973. Toxicity bioassay of heavy metals in water using *Tetrahymena pyriformis*. Water Res., 7, 951
35. CHANG S.L. 1960. Growth of small free living amoebae in various bacterial and bacteria free cultures. Can. J. Microbiol., 6, 397
36. CHATTON E., CHATTON M. 1923. L'action des facteurs externes sur les infusoires. Le déterminisme de la formation des chaînes (dystomie chez les *Colpidium*). C.R.Acad. Sci., 180, 1225-1228
37. CHATTON E., CHATTON M. 1923. Influence des facteurs bactériens sur la nutrition, la multiplication et la sexualité des infusoires. C. R. Acad. Sci., 176, 1262-1265
38. CHATTON E., CHATTON M. 1927. Sur le pouvoir cytolytique immédiat des cultures de quelques bactéries chromogènes. C. R. Soc. Biol. 93, 675-678
39. CHATTON E., LWOFF A. 1936. Techniques pour l'étude de protozoaires, spécialement de leurs structures superficielles (cinetome et argyrome). Bull. Soc. Fr. Micro., 5, 25
40. CLAUS C. 1976. Onderzoek naar de toxiciteit van drie herbiciden op het aquatisch ecosysteem. Thèse de Sciences Université de Gand.
41. COLAS-DELCOURT J., LWOFF A. 1925. L'utilisation des glucides par quelques protozoaires. C. R. Soc. Biol., 93, 1421-1432

42. COLEMAN G.S. 1964. The metabolism of *Escherichia coli* and other bacteria by *Entodinium candatum*. J. Gen. Microbiol., 37, 209-223
43. COLER R.A., GUNNER H.B. 1969. Microbial populations as determinants in protozoan succession. Water Res., 3, 149-156
44. COOLEY N.R., KELTNER J.M.Jr. 1972. Effect of Aroclor 1248 a polychlorinated biphenyl, on growth of population of *Tetrahymena pyriformis*. The A.B.S. Bull., 19 (2), 61
45. COOLEY N.R., KELTNER J.M.Jr., FORESTER J. 1972. Mirex and Aroclor 1254 effect on and accumulation by *Tetrahymena pyriformis* W. J. Protozool., 19 (4), 636-638
46. COOLEY N.R., KELTNER J.M.Jr., FORESTER J. 1973. The polychlorinated biphenyls Aroclor 1248 et 1260. Effect on and accumulation by *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool., 20 (3), 443-445
47. CORLISS J. 1952. Characterization of the family *Tetrahymenidae* nov. fam. Proc. Soc. Protozool., 3, 4
48. CORLISS J.O. 1953. Review of the genus *Colpidium*, Stein 1860, family *Tetrahymenidae*. Proc. Soc. Protozool., 4, 3-4
49. COY W.J.Mac. 1974. Updating the Tetrahymenids. I- General consideration and application to the genus *Colpidium*. Acta Protozool. XVI (14) 162-177
50. CURDS C.R. 1964. The flocculation of suspended matter by *Paramecium caudatum*. J. Gen. Microbiol., 33, 357-363
51. CURDS C.R. 1970. Continuous culture, a method for the determination of food consumption by ciliated Protozoa. Ecol. Conserv. Fr., 2, 127-129
52. CURDS C.R., COCKBURN A. 1969. Studies on the growth and feeding of *Tetrahymena pyriformis* in axenic and monoxenic cultures. J. Gen. Microbiol., 54, 343-358

53. CURDS C.R., COCKBURN A. 1971. Continuous monoxenic culture of *Tetrahymena pyriformis*. J. Gen. Microbiol., 66, 95-108
54. CURDS C.R., VANDYKE J.M. 1966. The feeding habits and growth rates of some freshwater Ciliates found in activated sludge plant. J. Appl. Ecol., 3, 127-137
55. CURTIS R.F., COXON D.T., LEVETT. 1974. Toxicity of fatty acids in assays for mycotoxins using the brine shrimp *Artemia salina*. Food Cosmet. Toxicol., 12, 233-235
56. CUTLER D.W., BAL D.V. 1926. Influence of Protozoa on the process of nitrogen fixation by *Azotobacter chroococcum*. Ann. Appl. Biol., 13, 516-534
57. CUTLER D.W., CRUMP L.M. 1923. The rate of reproduction in artificial cultures of *Colpidium colpoda*. Biochem. J., 17, 878-886
58. CUTLER D.W., CRUMP L.M. 1923. The rate of reproduction in artificial cultures of *Colpidium colpoda* III. Biochem. J., 18, 905-912
59. DE BRUIN A. 1976. Biochemical toxicology of environmental agents. Elsevier, North Holland, Biomedical Press, Amsterdam
60. DE LAMATER. 1939. Effect of certain bacteria on the occurrence of endomixis in *Paramecium aurelia*. Biol. Bull., 76, 217-225
61. DE PUYTORAC P. 1967. Bactéries et ciliés. Botaniste Fr., 50, 351-358
62. DEMBOWSKI J. 1922. Weitere Studien über die Nahrungswahl bei *Paramecium candidatum*. Trav. Lab. Biol. Neucki. Varsovie, 1, 1-16
63. DEWEY W.C., KIDDER G.W. 1978. Influence of sphingolipid bases, fatty acids and Tween 80 on the folate requirement of *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool., 25 (2), 270-273

64. DHAMELINCOURT P. 1979. Etude d'une microsonde pour la spectrométrie Raman. Thèse Université des Sci. et Techn. Lille
65. DIVE D. 1976. Etude d'une méthode standardisée utilisant le cilié *Colpidium campylum* pour la mesure de la toxicité. Thèse 3ème cycle, Université des Sci. et Techn. Lille
66. DRAKE J.F., TSUCHIYA H.M. 1977. Growth kinetics of *Colpoda steini* on *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., 34, 18-22
67. ELLIOTT A.M. 1933. Isolation of *Colpidium striatum* Stokes in bacteria free cultures and the relation of growth to pH of the medium. Biol. Bull., 65, 45-56
68. ELLIOTT A.M. 1935. Influence of pantothenic acid on growth of Protozoa. Biol. Bull., 68, 82-92
69. ELLIOTT A.M. 1935. Effect of carbohydrates on growth of *Colpidium*. Arch. Protistenkd., 84, 156-174
70. ELLIOTT A.M. 1935. Effects of certain organic acids and protein derivatives on the growth of *Colpidium*. Arch. Protistenkd., 84, 472-494
71. ELLIOTT A.M. 1939. The vitamin B complex and the growth of *Colpidium*. Physiol. Zoöl XII (4), 363-373
72. ESTEVE J.C. 1967. Observations ultrastructurales sur quelques aspects de l'évolution des vacuoles alimentaires chez *Paramecium caudatum*. C. R. Acad. Sci., 265 D, 1991-1994
73. FENCHEL T. 1980. Suspension feeding in ciliated protozoa : Feeding rates and their ecological significance. Microb. Ecol., 6, 13-15
74. FENCHEL T. 1980. Suspension feeding in ciliated Protozoa : Functionnal response and particle size selection. Microb. Ecol., 6, 1-11

75. FENCHEL T. 1980. Suspension feeding in ciliated Protozoa : Structure and functions of feeding organelles. Arch. Protistenkd., 123, 239-260
76. FINLAY B.J. 1977. The dependance of reproductive rate on cell size and temperature in freshwater ciliated Protozoa. Oecologia, 30, 75-81
77. FREAR D.E.H., BOYD J.E. 1967. Use of *Daphnia magna* for the microbiology assay of pesticides. Development of standardized techniques for rearing *Daphnia* and preparation of dosage mortality curves for pesticides. J. Econ. Entomol. , 60 (5), 1228-1236
78. GALTSOFF P.S., LUTZ F.E., WELCH P.S., NEEDHAM J.G. 1937. Culture methods for invertebrate animals. Comstock. Publ. Co. Inc. Ithaca, New York, p. 590
79. GAUTHIER N.J. 1970. Substances antibactériennes produites par les bactéries marines. 2ème partie. Lipopolysaccharides antibiotiques produits par certains germes marins appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Chromobacterium*. Rev. Intern. Océanogr. Med., 17, 23-45
80. GIESE A.C., TAYLOR C.V. 1935. Paramecia for experimental purposes in controlled mass cultures on a single strain of bacteria. Archiv. Protistenkd., 84, 225-231
81. GOTTSCHALD N. 1967. Methode zur Bestimmung der Toxizität von Detergentien. Hidrol. Közl., 7, 331-334
82. GRAY J.S., VENTILLA R.J. 1973. Growth rates of sediment living marine Protozoa as a toxicity indicator for heavy metals. Ambio., 2, 118-121
83. GREGORY W.W.Jr., REED K.J., PRESTER L.E.Jr. 1969. Accumulation of parathion and D.D.T. by some Algae and Protozoa. J. Protozool., 16 (1) 71-81

84. GROSCOP J.A., BRENT M.M. 1974. The effect of selected strains of pigmented microorganisms on small free living amoebae. *Can. J. Microbiol.* 10, 579-584
85. GUTIERREZ J. 1958. Observations on bacterial feeding by the rumen Ciliate *Isotricha prostoma*. *J. Protozoal.*, 5, 122-126
86. GUTIERREZ J., DAVIS R.E. 1959. Bacterial ingestion by the rumen Ciliate *Entodinium* and *Diplodinium*. *J. Protozoak.*, 6, 222-226
87. GUTIERREZ J., HUNGATE R.E. 1957. Interrelationships between certain bacteria and the rumen Ciliate *Dasytricha ruminantum*. *Science*, 176 (3272), 511
88. HALL R.P. 1937. Effects of manganese on the growth of *Euglena anabaena*, *Astasia* sp. and *Colpidium campylum*. *Arch. Protistenkd.*, 90, 178-181
89. HALL R.P. 1938. The oxygen consumption of *Colpidium campylum*. *Biol. Bull.*, 75, 395-408
90. HALL R.P. 1939. Pimelic acid as a growth stimulant for *Colpidium campylum*. *Arch. Protistenkd.*, 92, 315-319
91. HALL R.P. 1940. Nitrogen requirements of the Ciliate *Colpidium campylum*. *Rep. Proc. III Internat. Congr. Microbiol.*, New York, p. 412
92. HALL R.P. 1940. Riboflavin and thiamin as growth factors for the Ciliate *Colpidium campylum*. *Anat. Rec.*, 78, 164
93. HALL R.P. 1942. Incomplete proteins as nitrogen sources, and their relation to vitamin requirements in *Colpidium colpoda*. *Physiol. Zoöl.*, 15, 95-107
94. HALL R.P., ELLIOTT A.M. 1935. Growth of *Colpidium* in relation to certain incomplete proteins and amino acids. *Arch. Protistenkd.*, 85, 443-450

95. HALL R.P., LOEFER J.B. 1938. Effect of the addition of old culture medium on the growth of *Colpidium campylum*. Anat. Rec., 72, 50
96. HALL R.P., LOEFER J.B. 1940. Effects of culture filtrates and old medium on growth of the Ciliate *Colpidium campylum*. Proc. Soc. Exp. Biol., 43, 128-133
97. HAMILTON R.D., PRESLAN J.E. 1969. Cultural characteristics of a pelagic marine hymenostome Ciliate (*Uronema* sp.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 4, 90-99
98. HAMILTON R.D., PRESLAN J.E. 1970. Observations on the continuous culture of a planktonic phagotrophic Protozoan. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 14, 94-104
99. HARDIN G. 1944. Symbiosis of *Paramecium* and *Oikomonas*. Ecology, 25, 304
100. HARDING J. 1937. Quantitative studies on the Ciliate *Glaucoma*. I- The regulation of the size and the fission rate by the bacterial food supply. J. Experim. Biol., 14, 422-439
101. HARGITT G.T., FRAY W.W. 1917. The growth of *Paramecium* in pure culture of bacteria. J. Exp. Zool., 22, 421-455
102. HARRIS J.O. 1967. Non adaptative growth responses of *Tetrahymena pyriformis* grown on a single bacterial species. J. Protozool., 14, 600-602
103. HARWIG J., SCOTT P.M. 1971. Brine shrimp (*Artemia salina*) larvae as a bioassay for fungal toxins. Appl. Microbiol., 21 (6), 1011-1016
104. HAYES A.W., WYATT E. 1970. Survey of the sensitivity of microorganisms to rubratoxin B. Appl. Microbiol., 20 (1), 164-165
105. HEAF D.P., LEE D. 1971. A viability assay for *Tetrahymena pyriformis*. J. Gen. Microbiol., 68, 249-252

106. HETHERINGTON A. 1934. The role of bacteria in the growth of *Colpidium colpoda*. *Physiol. Zoöl.*, 7, 618-641
107. HOFFMANN E.K., RASMUSSEN L. 1972. Phenylalanine and methionine transport in *Tetrahymena pyriformis*. Characteristic of a concentrating inducible transport system. *Biochim. Biophys. Acta*, 266, 206-216
108. HOFFMANN E.K., RASMUSSEN L., ZEUTHEN E. 1970. Evidence for a common transport system for a group of aminoacids in *Tetrahymena*. *Compte Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, 38 (8), 133-143
109. HOFFMANN E.K., RASMUSSEN L., ZEUTHEN E. 1974. Cytochalasin B : aspects of phagocytosis in nutrient uptake in *Tetrahymena*. *J. Cell. Sci.*, 15, 403-406
110. HOLST SORENSEN H., RASMUSSEN L. 1971. Growth promoting effects of particulate material in cultures of *Acanthamoeba*. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, 38, 163-170
111. HOLTER H. 1959. Pynocytosis. *Internat. Rev. Cytol.*, 8, 481-504
112. HOLZ G.G.Jr., WAGNER B., ERWIN J., KESSLER D. 1961. The nutrition of *Glaucoma chattoni*. *J. Protozool.*, 8 (2), 192-199
113. JACQUET J., BOUTIBONNES P. 1970. Action des flavacoumarines (aflatoxine) sur les petits crustacés d'eau douce. Possibilité de création d'un test biologique. *Bull. Acad. Vet.* XLIII, 299-309
114. JAKUBCZAK E., LECLERC H. 1980. Mesure de l'ATP bactérien par bioluminescence : étude critique des méthodes d'extraction. *Ann. Biol. Clin.*, 38 (5), 297-304
115. JOHNSON D.F. 1936. Growth of *Glaucoma ficaria* Kahl in cultures with single species of other microorganisms. *Arch. Protistenkd.*, 88, 359-378

116. JOST J.L., DRAKE J.F., FREDRICKSON A.G., TSUCHIYA H.M. 1973. Interaction of *Tetrahymena pyriformis*, *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii* and glucose in a minimal medium. J. Bacteriol., 113, 834-840
117. JOST J.L., DRAKE J.F., TSUCHIYA H.M., FREDRICKSON A.G. 1973. Microbial food chains and webs. J. Theor. Biol., 41, 461-484
118. KAHL A. 1930-1935. Urtiere oder Protozoa. I. Wimpertiere oder ciliata, Infusoria. In "Die Tierwelt Deutschland" Dahl F. Edit., G. Fischer-Jena
119. KEENAN K., ERLICH E., DONNELLY H.K., BASEL M.B., HUTNER S.H., KASSOF R., CRAWFORD S.A. 1978. Particle based axenic media for Tetrahymenids. J. Protozool., 25 (3), 385-388
120. KIDDER G.W. 1938. The effect of biologically conditioned medium upon the growth of *Colpidium campylum*. Biol. Bull., 77, 297-298
121. KIDDER G.W. 1941. Growth studies on ciliates : VII. Comparative growth characteristics of four species of sterile ciliates. Biol. Bull., 80, 50-68
122. KIDDER G.W. 1953. Protozoa. In BOURNE G.H., KIDDER G.W. Biochemistry and physiology of nutrition, 2, 164-187
123. KIDDER G.W. 1967. Nitrogen : distribution, nutrition and metabolism. In Chemical Zoology - Florkin. Edit. Academic Press, vol. 1, Protozoa, p. 93-152
124. KIDDER G.W., DEWEY V.C., FULLER R.C. 1954. Nitrogen requirements of *Glaucoma scintillans* and *Colpidium campylum*. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 86, 685-689
125. KIDDER G.W., STUART C.A. 1938. The role of chromogenic bacteria on Ciliates growth. Biol. Bull., 75, 336

126. KIDDER G.W., STUART C.A. 1939. Growth studies on Ciliates. I- The role of bacteria in the growth and reproduction of *Colpoda*. *Physiol. Zoöl.*, 12, 329-340
127. KLINE A.P. 1943. The nitrogen compounds necessary for growth of *Colpidium striatum*, Stokes, with special reference to aminoacids. *Physiol. Zoöl.*, 16, 405-417
128. KUDO R.R. 1965. *Protozoology*. Charles C. Thomas Edit. Springfield. Ill. U.S.A., 5ème edit.
129. LAYBOURN J.E.M., FINLAY B.J. 1976. Respiratory energy losses related to cell weight and temperature in ciliated Protozoa. *Oecologia*, 24, 349-355
130. LAYBOURN J.E.M., STEWART J.M. 1974. Effect of food consumption and temperature on reproduction in the Ciliate *Colpidium campylum*. *J. Zool. London*, 174, 277-283
131. LAYBOURN J.E.M., STEWART J.M. 1976. Studies on consumption and growth in the Ciliate *Colpidium campylum* Stokes. *J. Anim. Ecol.*, 44, 165-174
132. LESLIE L.D. 1940. Nutritional studies in *Paramecium*. I- Quantitative and qualitative standardization of the food organism. *Physiol. Zoöl.*, 13, 243-250
133. LESLIE L.D. 1940. Nutritional studies in *Paramecium*. II- Bacterial food. *Physiol. Zoöl.*, 13, 430-438
134. LILLY D.M. 1967. Growth factors in Protozoa. In *Chemical Zoology* Florkin Edit. Academic Press, vol. 1, Protozoa, p. 275-304
135. LILLY D.M., STILWELL R.H. 1965. Probiotics : growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748

136. LISON L. 1958. Statistique appliquée à la biologie expérimentale. Gauthier Villars Edit. Paris
137. LOZINA-LOZINSKI L. 1931. Zur Ernährungs physiologie der Infusorien, Untersuchungen über die Nahrungsauswahl und Vermehrung bei *Paramecium caudatum*. Arch. Protistenkd., 74, 18-120
138. LUCK J.M., SHEETS G., THOMAS J.O. 1931. The role of bacteria in the nutrition of Protozoa. Quart. Rev. Biol., 6, 46-58
139. LUCQUIN M., MONTASTIER J., LANGRAND F., PERCHE A. 1969. Simulation sur ordinateur des réactions en chaînes ramifiées et autres processus de multiplication de populations. I- La ramification continue. J. Chim. Phys., 66, 1389-1398
140. LWOFF A., ROUKHELMAN N. 1926. Variations de quelques formes d'azote dans une culture pure d'infusoires. C. R. Acad. Sci., 183, 156-158
141. MARSHALL J.M., SCHUMAKER V.N., BRANDT P.W. 1959. Pinocytosis in Amoebae. Ann. N. Y. Acad. Sci., 78, 515
142. MOREAU S. 1980. Mycotoxines de *Penicillium roqueforti*. Thèse Univ. Sci. Techn. Lille
143. MORGAN J.R. 1972. Effects of Aroclor 1242 (a polychlorinated biphenyl) and D.D.T. on cultures of an Alga, Protozoan, Daphnid, Ostracod and Guppy. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 8 (3), 129-137
144. MORRISSON G.A., TOMKINS A.L. 1973. Determination of mean cell size of *Tetrahymena* in growing cultures. J. Gen. Microbiol., 77, 383-392
145. MUELLER J.A. 1968. Poisonous effects of *Pseudomonas aeruginosa* on *Paramecium aurelia*. J. Invert. Path., 11, 219-223
146. MULLER W.A., LEE J.J. 1969. Apparent indispensability of bacteria in foraminiferan nutrition. J. Protozool., 16, 471-478

147. MULLER M., ROHLICH P., TORO I.J. 1965. Studies on feeding and digestion in Protozoa VII. Ingestion of polystyrene latex particles and its early effects on acid phosphatase in *Paramecium multimicronucleatum* and *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool., 12, 27-34
148. NARDONE R.M., WILBER C.G. 1951. Nitrogenous excretion in *Colpidium campylum*. Proc. Soc. Experim. Biol., 75, 559-561
149. NEUZIL E., VALETTE J.P., LABEYRIE S. 1966. Utilisation de la chromatographie d'exclusion-diffusion sur colonne pour l'étude de la chromogénèse chez *Pseudomonas aeruginosa*. Arqu. Port. Bioquim., 10, 25
150. NILSSON J.R. 1978. Retention of lead within the digestive vacuole in *Tetrahymena*. Protoplasma, 95, 163-173
151. NILSSON J.R. 1979. Intracellular distribution of lead in *Tetrahymena* during continuous exposure to the metal. J. Cell. Sci., 39, 383-
152. NILSSON J.R., RICKETTS T.R., ZEUTHEN E. 1973. Effects of cytocholasin on cell division and vacuole formation in *Tetrahymena pyriformis*. Experim. Cell. Res., 79, 456-459
153. OEHLER R. 1921. Wirkung von Bakteriengiften auf Ziliaten. Zentralb. Bakt., 86, 494-500
154. ORIAS E., RASMUSSEN L. 1976. Dual capacity for nutrient uptake in *Tetrahymena*. IV- Growth without food vacuoles and its implications. Experim. Cell. Res., 102, 127-137
155. PAVLOVSKIS O.R. 1972. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin : effect on cellular and mitochondrial respiration. J. Infect. Dis., 126 (1) 48-53
156. PERSOONE G., UYTTERSROT G. 1975. The influence of inorganic and organic pollutants on the rate of reproduction of a marine hypotrichous Ciliate : *Euplotes vannus*. Rev. Internat. Ocean. Med., 37-38, 125-152

157. PETERSON R.E. 1942. Essential factors for the growth of the Ciliate protozoan *Colpidium campylum*. J. Biol. Chem., 146, 537
158. PHELPS A. 1934. Studies on the nutrition of *Paramecium*. Arch. Protistenk 82, 134
159. PHILLIPS R.L. 1922. The growth of *Paramecium* in infusions of known bacterial content. J. Experim. Zool., 36, 135-183
160. PHILPOTT C.H. 1926. Growth of Paramecia in the presence of diphterial toxin. Anat. Rec., 34, 156
161. PHILPOTT C.H. 1928. Growth of *Paramecium* in pure culture of pathogenic bacteria and in the presence of soluble products of such bacteria. J. Morph., 46, 85-129
162. PLESNER P., RASMUSSEN L., ZEUTHEN E. 1964. Techniques used in the study of synchronous *Tetrahymena*. In Synchrony in cell division and growth. E. ZEUTHEN Edit., John Wiley and Sons, New York, p. 543-563
163. PLICHON B., LUCQUIN M., GUILLAUME J.B. 1971. Vérification expérimentale des cinétiques de croissance obtenues par simulation sur ordinateur. Ann. Inst. Pasteur Lille, 22, 37-43
164. PRINGSHEIM E.G. 1915. Physiologische Untersuchungen an *Paramecium bursaria*. Ein Beitrag zur Symbioseforschung. Arch. Protistenkd., 64, 289-418
165. PROPER G., GARVER J.L. 1965. Mass culture of the protozoa *Colpoda steini*. Biotechnol. Bioengng., 8, 287-296
166. RASMUSSEN L. 1974. Food vacuole membrane and nutrient uptake by *Tetrahymena*. Nature, 250 (5462), 157-158

167. RASMUSSEN L. 1976. Nutrient uptake by *Tetrahymena pyriformis*. Carlsberg Res. Commun., 41 (3), 144-167
168. RASMUSSEN L., DIVE D. 1980. *Tetrahymena* : doubling times and phospholipids. Naturwissenschaften, 67 (5), 98
169. RASMUSSEN L., KLUDT T.A. 1970. Particulate material as a prerequisite for rapid cell multiplication in *Tetrahymena* cultures. Exptl. Cell. Res., 59, 457-463
170. RASMUSSEN L., MODEWEG-HANSEN L. 1973. Cell multiplication in *Tetrahymena* cultures after addition of particulate material. J. Cell. Science 12, 275-286
171. RASMUSSEN L., ORIAS E. 1975. *Tetrahymena* : growth without phagocytosis Science, 190, 464-465
172. RASMUSSEN L., ORIAS E. 1976. Dual capacity for nutrient uptake in *Tetrahymena*. Carlsberg Res. Commun., 41 (2), 81-90
173. RASMUSSEN L., RICKETTS T.R. 1977. Endocytosis, exocytosis and lysosome Proc. Vth Internat. Congr. Protozool., New York, p. 140-146
174. RASMUSSEN L., ZDANOWSKI M.K. 1980. Evidence for dipeptide uptake in *Tetrahymena*. Experientia, 36, 1044
175. RICKETTS T.R. 1971. Endocytosis in *Tetrahymena pyriformis* : the selectivity of uptake of particles and the adaptative increase in cellular acid phosphatase activity. Experim. Cell. Res., 66, 49-58
176. RICKETTS T.R. 1971. Periodicity of endocytosis in *Tetrahymena pyriformis* Protoplasma, 73, 387-396
177. RICKETTS T.R. 1972. The interaction of particulate material and dissolved foodstuffs in food uptake by *Tetrahymena pyriformis*. Arch. Mikrobiol., 81, 344-349

178. RICKETTS T.R. 1972. The induction of endocytosis in starved *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool., 19, 373-375
179. RICKETTS T.R., RAPPITT A.F. 1975. A radioisotopic and morphological study of the uptake of materials into food vacuoles by *Tetrahymena pyriformis* G.L. 9. Protoplasma, 86, 321-337
180. ROSENTHAL S., REED E.J., WEISMAN R.A. 1969. Effect of lytic enzymes of *Acanthamoeba castellanii* on bacterial cell walls. J. Bacteriol., 98, 182
181. ROUX J., SERRE A., BASSOULS C. 1964. Mise en évidence d'un phénomène d'immunité cellulaire chez un protozoaire : *Tetrahymena pyriformis*. C. R. Soc. Biol. Fr., 158, 673-675
182. RUTHVEN J.A., CAIRNS J.Jr. 1973. Response of freshwater protozoan artificial communities to metals. J. Protozool., 20, 127-135
183. SANDERS H.O., COPE O.B. 1966. Toxicity of several pesticides to two species of Cladocerans. Trans. Amer. Fish. Soc., 95, 165-169
184. SCHERBAUM O. 1957. The application of a standard counting method in estimation of growth in normal and heat treated cultures of *Tetrahymena pyriformis*. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 40, 7-12
185. SCHOOR W.P. 1975. Problems associated with low solubility compound in aquatic toxicity tests : theoretical model and solubility characteristics of Aroclor 1254 in water. Water Res., 9, 937-944
186. SEAMAN G.R. 1949. Relation between growth and lipid synthesis in *Colpidium campylum*. J. Cell. Comp. Physiol., 23 (2), 137-143
187. SEAMAN G.R. 1961. Some aspects of phagotrophy in *Tetrahymena*. J. Protozool., 8, 204

188. SEAMAN G.R., O'MALLEY B. 1949. The adaptative utilization of sucrose by the Ciliate *Colpidium campylum*. Biol. Bull., 97, 261
189. SEAMAN G.R., MANCILLA R. 1963. Progress in protozoology. 1ère edit. LUDVICK J., LOM J., VAVRA J. Edit. Academic Press
190. SERAVIN L.N., ORLOVSKAYA E.H. 1972 . En russe. Le choix de la nourriture chez les protozoaires. Vest. Leningr. Univ., 15, 7-19
191. SHAROM M.S., SOLOMON K.R. 1981. Adsorption and desorption of permethrin and other pesticides on glass and plastic materials used in bioassay procedures. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38 (2), 199-204
192. SHPIRT M.B. 1973. Toxicological evaluation of D.D.T., hexachlorocyclohexane, tetramethylthiuram, Sevin and Zineb on human cell cultures Gig. Tr. Prof. Zabol., 17 (3), 32-35
193. SICKELS G.M., SHAW M. 1935. The effect of purified diphtheria toxin on *Planaria maculata* and *Paramecium caudatum*. J. Bact., 31, 75
194. SINGH B.N. 1941. Selectivity in bacterial food by soil amoebae in pure mixed culture and in sterilized soil. Ann. Appl. Biol., 28, 52-64
195. SINGH B.N. 1941. The influence of different bacterial food supplies on the rate of reproduction in *Colpoda steini*. Ann. Appl. Biol., 27, 65
196. SINGH B.N. 1942. Selectivity of bacterial food by soil flagellates and amoebae. Ann. Appl. Biol., 29, 18-22
197. SINGH B.N. 1945. The selection of bacterial food by soil amoebae, and the toxic effect of bacterial pigment and other products on soil Protozoa. Brit. J. Experim. Path., 26, 316
198. SINGH B.N. 1946. Soil Acrasidae and their bacterial food supply. Nature 157, 302

199. SINGH B.N. 1946. A method of estimating the numbers of soil Protozoa, especially amoebae, based on differential feeding on bacteria by Protozoa. *Ann. Appl. Biol.*, 33, 112
200. SINGH B.N. 1948. Studies on giant amoeboids organisms. *J. Gen. Microbiol.* 2, 7
201. SINGH B.N. 1956. Occurrence and nature of an amoeba excystment factor produced by *Aerobacter* sp. *Nature*, 177, 621
202. SINGH B.N. 1958. The role of *Aerobacter* sp., *Escherichia coli* and certain aminoacids in the excystment of *Schyzopyrenus russellii*. *J. Gen. Microbiol.*, 19, 104
203. SINGH B.N. 1960. Inter-relationships between micropredators and bacteria in soil. *Proc. IV Indian Sci. Congr. Part. 2*, 14
204. SNEDECOR G.W., COCHRAN W.G. 1957. *Statistical methods*. 6ème edit. Iowa St. Univ. Press, Ames. Iowa, U.S.A.
205. STEWART-TULL D.E.S., ARMSTRONG A.V. 1972. The effect of 1 hydroxyphe-
nazine and pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* on mammalian cell
respiration. *J. Med. Microbiol.*, 5 (1), 67-73
206. STILWELL R.H. 1967. *Colpidium*-produced R.N.A. as a growth stimulant for
Tetrahymena. *J. Protozool.*, 14 (1), 19-22
207. STILWELL R.H., LILLY D.M. 1962. Stimulation of growth in *Paramecium*
candatum by product of *Colpidium campylum*. *Ann. Zool.*, 2, 562
208. STOKES A.C. 1886. Some new infusoria from american fresh waters.
Ann. Mag. Nat. Hist. (ser. 5), 17, 98-112
209. SUDO R., AIBA S. 1971. Growth rate of *Vorticellidae* isolated from
activated sludge. *Jap. J. Ecol.*, 21 (1-2), 70-75

210. SUDO R., AIBA S. 1973. Effect of copper and hexavalent chromium on the specific growth rate of Ciliates isolated from activated sludge. *Water Res.*, 7, 1301
211. SUDO R., KOBAYASHI K., AIBA S. 1975. Some experiments and analysis of a predator prey model : interaction between *Colpidium campylum* and *Alcaligenes faecalis* in continuous and mixed cultures. *Biotechnol Bioengng.*, 17, 167-184
212. SULLIVAN W.D. 1948. The effect of cholesterol on growth in *Colpidium campylum*. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 67, 262-265
213. TAKENOUCI M. 1918. Cytolytic action of normal and immune serum on Infusoria. *J. Infect. Dis.*, 23, 396-414
214. TAYLOR W.D. 1978. Growth responses of ciliate Protozoa to the abundance of their bacterial prey. *Microb. Ecol.*, 4, 207-214
215. TAYLOR W.D. 1979. Overlap among cohabiting Ciliates in their growth responses to various prey bacteria. *Can. J. Zool.*, 57 (4), 949-951
216. TAYLOR W.D., BERGER J. 1976. Growth responses of cohabiting Ciliate Protozoa to various prey bacteria. *Can. J. Zool.*, 54 (7), 1111-1117
217. TAYLOR W.D., BERGER J. 1979. Growth of *Colpidium campylum* in monoxenic batch culture. *Can. J. Zool.*, 54 (3), 392-398
218. TEUNISSON D.J., ROBERTSON J.A. 1967. Degradation of pure aflatoxins by *Tetrahymena pyriformis*. *Appl. Microbiol.*, 15 (5), 1099-1103
219. TUNNICLIFF R. 1928. Use of *Paramecium* for studying toxins and antitoxins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 26, 213-217
220. TUNNICLIFF R. 1929. Use of *Paramecium* for studying toxic substances in urine. *J. Infect. Dis.*, 45, 244-246

221. UPADHYAY J.M. 1968. Growth and bacteriolytic activity of a soil amoebae *Hartmannella glabrae*. J. Bact., 95, 771-774
222. UPADHYAY J.M., DIFULCO T.J. 1972. Isolation, purification and properties of a second bacteriolytic enzyme from *Hartmannella glabrae*. Arch. Biochem. Biophys., 149, 470-475
223. VILLAREAL E., CANALE R.R., AKCASU Z. 1977. Transport equations for a microbial predator prey community. Microb. Ecol., 3, 131-142
224. VAN WAGTENDONK W.J. 1955. The nutrition of Ciliates. In Biochemistry and physiology of Protozoa. HUTNER S., LWOFF A. edit. Academic Press, New York, p. 57-90
225. VAN WAGTENDONK W.J., HACKETT P.L. 1949. The culture of *Paramecium aurelia* in the absence of other living organisms. Proc. Nat. Acad. Sci., 35, 155-159
226. VAN WAGTENDONK W.J. 1974. *Paramecium*, a current survey. Elsevier Sci. Publ. Co. Amsterdam, p. 339-376
227. WALKER J., LECLERC H. 1973. Traitement expérimental d'épuration d'une eau de surface par lagunage : aspects chimiques et microbiologiques. Water Res., 7, 707-728
228. WEIL L.von., DURE G., QUENTIN K.E. 1974. Wasserlöslichkeit von insektiziden chlorierten Kohlenwasserstoffen und Polychlorierten Biphenylen im Hinblick auf eine Gewässerbelastung mit diesen Stoffen. Wasser. Abw. Forsch., 7 (6), 169-175
229. WICHTERMAN R. 1953. Biology of *Paramecium*. Blakiston Co. Inc. Edit., New York
230. YAMAGUCHI N., WADA O., ONO T., YAZAKI K., TOYOKAWA K. 1973. Detection of heavy metal toxicity by *Tetrahymena pyriformis* culture method. Ind. Health., 11, 27-31

231. ZDANOWSKI M.K., RASMUSSEN L. 1979. Tyrosine requirement in *Tetrahymena* revealed by nutritional amino acid imbalances. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62 A, 331-334
232. ZDANOWSKI M.K., RASMUSSEN L. 1979. Peptidase activity in *Tetrahymena*. *J. Cell. Physiol.*, 100 (3), 407-412
233. ZEUTHEN E. 1964. Synchrony in cell division and growth. John Wiley and sons, New York
234. ZEUTHEN E. 1971. Synchrony in *Tetrahymena* by heat shocks spaced a normal cell cycle apart. *Experim. Cell. Res.*, 68, 49-60

