

## V. — TENEUR EN VITAMINE B12 DU FOIE ET DU CONTENU DE L'INTESTIN

PAR

**R. FÉVRIER, J. P. VACHEL, M. MICHEL**

Station de Recherches sur L'Élevage, Jouy-en-Josas

De nombreux auteurs ont montré qu'il existait des relations encore mal connues entre l'action des antibiotiques et le métabolisme de la vitamine B12.

Pour obtenir des informations plus complètes sur ce point, nous avons effectué des dosages de vitamine B12 sur les échantillons des contenus du tube digestif prélevés pour les études précédemment relatées (IV), ainsi que sur le foie des mêmes animaux.

### Méthode de dosage

La méthode microbiologique employée dérive de celle décrite par BURKHOLDER (P. R.) et al. (1951) ; elle utilise comme organisme-test un mutant d'*Escherichia Coli* souche 113-3.

Dans des conditions standardisées, la croissance du germe est proportionnelle à la concentration en vitamine B12. Nous avons vérifié que la méthionine, qui peut aussi stimuler la croissance du germe, n'interférait pas.

### 1° Préparation des milieux

#### BOUILLON DE CULTURE (pour l'inoculum).

|   |       |                 |
|---|-------|-----------------|
| Peptone .....                           | 5     | g               |
| Levure .....                            | 5     |                 |
| Extrait de foie.....                    | 0,5   | l               |
| (correspondant à 500 g de foie de porc) |       |                 |
| NaCl .....                              | 3,5   | g.              |
| PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> .....   | 3,68  |                 |
| PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K .....  | 1,32  |                 |
| Glucose .....                           | 5     |                 |
| Eau q. s. p. ....                       | 1 000 | cm <sup>3</sup> |

Autoclavage 12 minutes à 112°C.

Ce milieu est distribué avant autoclavage en tubes de 10 cm<sup>3</sup>.

## GÉLOSE NUTRITIVE.

|                   |                     |
|-------------------|---------------------|
| Peptone .....     | 1,25 g              |
| Levure .....      | 0,75                |
| Gélose .....      | 5                   |
| Eau q. s. p. .... | 250 cm <sup>3</sup> |

## BOUILLON POUR LE DOSAGE. Acides aminés :

|                                      |                     |
|--------------------------------------|---------------------|
| Glycocolle .....                     | 100 mg              |
| Asparagine .....                     | 4 g                 |
| Arginine .....                       | 100 mg              |
| Acide glutamique .....               | 100                 |
| Proline .....                        | 100                 |
| Histidine .....                      | 100                 |
| Tryptophane .....                    | 1 g                 |
| Eau bidistillée .....                | 100 cm <sup>3</sup> |
| HCl q. s. pour amener à pH 2,5 ..... | 2,5                 |

Cette solution est autoclavée 12 minutes à 112°C.

|  |               |
|--|---------------|
|  | Mélange salin |
|  | —             |
| Citrate de sodium 3H <sub>2</sub> O .....  | 0,5 g         |
| SO Mg, 7 H <sub>2</sub> O .....            | 0,1           |
| So <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) 2 ..... | 1 g           |
| PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> .....      | 5             |
| PO <sub>4</sub> H <sup>+</sup> K .....     | 3             |
| Glucose anhydre .....                      | 10            |

Ces produits sont broyés et mélangés à sec. Le bouillon nécessaire au dosage de la semaine est préparé comme suit :

|                                 |                       |
|---------------------------------|-----------------------|
| Solution d'acides aminés .....  | 100,4 cm              |
| Mélange salin .....             | 19,6 g                |
| Eau bidistillée : q. s. p. .... | 1 000 cm <sup>4</sup> |

Le pH obtenu est de 6,5 — autoclavage 12 minutes à 112°C.

## 2° Culture du germe

La souche d'E. coli est repiquée tous les 15 jours sur gélose inclinée.

Pour préparer l'inoculum, on ensemence, la veille du dosage, un tube de 10 cm<sup>3</sup> de bouillon à l'anse de platine, à partir de la culture sur gélose. L'incubation dure 16 heures à 37°C.

Le bouillon nécessaire au dosage — 5 cm<sup>3</sup> par tube — est ensemencé avec 1,25 p. 100 de cette culture.

## 3° Mise en solution de la vitamine B12

10 g d'échantillon à doser sont broyés au mixer avec 190 cm<sup>3</sup> d'eau bidistillée.

On prélève 10 cm<sup>3</sup> de la suspension, que l'on met dans une fiole de 100 cm<sup>3</sup> avec 20 cm<sup>3</sup> de solution de CNK à 50 mcg/cm<sup>3</sup>. Après autoclavage (10 minutes à 112°C) et refroidissement, on ajoute 20 cm<sup>3</sup> de tampon acide acétique, acétate de sodium à pH 4, 5, pour flocculer les protéines. La solution est transférée dans une fiole jaugée de 100 cm<sup>3</sup>. On rince et complète à 100 cm<sup>3</sup> avec de l'eau bidistillée. Après filtration sur

filtre à plis, la solution est ajustée à pH 6,5 et diluée pour amener le titre en vitamine B<sub>12</sub> à 1 millimicrogramme, d'après le titre prévu.

#### 4° Mesure turbidimétrique à l'électrophotomètre

Chaque solution est distribuée dans des tubes, en triple exemplaire, à raison de 0,1 — 0,4 — 0,6 et 0,8 cm<sup>3</sup>.

La gamme étalon est faite à partir d'une solution de B<sub>12</sub> pure à la concentration de 1 millimcg/cm<sup>3</sup>.

On ajoute ensuite 5 cm<sup>3</sup> de bouillon ensemencé par tube.

Les tubes sont placés au bain-marie à 37° pendant 4 h 30.

Après ce délai, la croissance est stoppée à l'aide de 3 gouttes de formol par tube. Puis on fait la lecture de la turbidité au photomètre.

La moyenne des chiffres obtenus pour chaque concentration étalon (pourcentage de transmission) est portée en ordonnée sur du papier millimétrique ; on place en abscisses les concentrations de B<sub>12</sub> et on trace la droite représentative.

Les concentrations en B<sub>12</sub> des solutions à doser sont déterminées sur la courbe, d'après leurs mesures de turbidité, et multipliées par l'inverse de la dilution.

#### 5° Résultat des dosages

Ils sont indiqués dans le tableau suivant (échantillons bruts) :

| Lot | Foie                   |            |                             | Intestin grêle               |                               |                            |                             |
|-----|------------------------|------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|     | B <sub>12</sub><br>γ/g | Poids<br>g | B <sub>12</sub> totale<br>γ | B <sub>12</sub> libre<br>γ/g | B <sub>12</sub> totale<br>γ/g | B <sub>12</sub> libre<br>% | B <sub>12</sub> totale<br>% |
| T   | 0,309                  | 1440,0     | 447,1                       | 0,062                        | 0,135 (11)                    | 46                         |                             |
| A   | 0,407                  | 1452,3     | 601,5 (1)                   | 0,044                        | 0,094 (10) (2)                | 47                         |                             |
| P   | 0,336                  | 1445,3     | 483,7                       | 0,041                        | 0,079 (9) (2)                 | 52                         |                             |

  

| Lot | Cæcum                        |                               |                                   | Colon                        |                               |                                   |
|-----|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
|     | B <sub>12</sub> libre<br>γ/g | B <sub>12</sub> totale<br>γ/g | B <sub>12</sub> totale %<br>libre | B <sub>12</sub> libre<br>γ/g | B <sub>12</sub> totale<br>γ/g | B <sub>12</sub> totale %<br>libre |
| T   | 0,093                        | 0,461 (12)                    | 20,2                              | 0,136                        | 1,109                         | 12,3                              |
| A   | 0,175                        | 0,842 (9) (2)                 | 20,8                              | 0,108                        | 1,380                         | 7,8                               |
| P   | 0,128                        | 0,593 (11) (2)                | 21,6                              | 0,032                        | 1,113                         | 2,8                               |

On constate les faits suivants :

1. — *Foie* : Il y a une augmentation du potentiel vitaminique B<sub>12</sub> du foie total, augmentation importante et significative dans le lot auréomycine seulement. Celle-ci est due uniquement à l'augmentation de la concentration de vitamine B<sub>12</sub> du foie frais, le poids total du foie étant sensiblement le même dans les trois lots.

2. — Si l'on se rappelle que le lot auréomycine est le seul à recevoir de la vitamine B<sub>12</sub> en plus d'un antibiotique, il semble que les anti-

biotiques n'augmentent la concentration vitaminique du foie que dans le cas où la ration contient de la B<sub>12</sub>.

Ces résultats paraissent être en accord avec ceux de CALET et al. obtenus chez le rat. Ces auteurs montrent qu'un régime renfermant très peu de vitamine B<sub>12</sub> permet un abondant stockage hépatique s'il contient de l'auréomycine et qu'au contraire, l'auréomycine n'a aucune influence sur les réserves du foie en B<sub>12</sub> quand la ration est totalement dépourvue de cette vitamine.

3. — Il se produit *dans le tractus intestinal* de tous les animaux, quel que soit leur traitement, *une synthèse considérable de vitamine B<sub>12</sub>*. Pour un animal en fin d'engraissement consommant par jour environ 3 kg de matière sèche avec auréomycine, l'ingestion quotidienne de B<sub>12</sub> est au minimum de 16 mcg/kg × 3 kg soit 48 mcg. Pour un animal des lots témoin et pénicilline, elle est pratiquement nulle. En revanche, l'animal excréant environ 2 000 g de fèces bruts par jour exporte : 2 200 à 2 800 mcg de vitamine B<sub>12</sub> par jour.

4. — L'importance de cette synthèse intestinale nous permet de considérer comme tout à fait négligeable la présence du facteur B<sub>12</sub> dans les ingesta d'un seul des trois lots, puisqu'il se trouve ultérieurement en quantités importantes dans le tractus intestinal de tous les animaux. *On peut ainsi attribuer à l'auréomycine seule, et non pas à l'auréomycine + vitamine B<sub>12</sub>, les différences significatives de croissance ou de stockage vitaminique dans le foie* observées dans le lot recevant de l'auréomycine et de la vitamine B<sub>12</sub>.

Nous devons cependant noter que de nombreux travaux ont mis en évidence l'influence sur la croissance de vitamine B<sub>12</sub> ajoutée à la ration.

5. — Dans *l'intestin grêle*, les teneurs en B<sub>12</sub> des lots recevant des antibiotiques sont significativement inférieures à celles du lot témoin ; dans le *caecum*, ces teneurs sont au contraire significativement supérieures à celles du lot témoin.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BURKHOLDER (P. R.). — « Determination of vitamin B<sub>12</sub> with a mutant strain of Escherichia Coli ». *Science*, **114** ; 459, 1951.
- CALET (C.), RERAT (A.), JACQUOT (R.). — « Action d'épargne des antibiotiques pour quelques vitamines du groupe B ». *C. R. Acad. Sci.* **236** ; 2340-42, 1953.
- CALET (C.), RERAT (A.), JACQUOT (R.). — « Signification des relations entre auréomycine et vitamine B<sub>12</sub> ». *C.R. Acad. Sci.*, 1954.
-