

UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTE DE PHARMACIE

Année 1991

THESE N° 302

# THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE  
DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 14 janvier 1991

par

**Laurence LACOUTURE**

Née le 27 septembre 1967

à Châteauroux (Indre)

**ETUDE DE LA TOXICITE DE QUELQUES  
DERIVES DU BENZAMIDO-2 NITRO-5 THIAZOLE  
SUR *Euglena gracilis* Klebs**

Examineurs

M. J.A. NICOLAS, Professeur . . . . . Président  
M. G. DREYFUSS, Maître de Conférences . . . . . Juge  
M<sup>elle</sup> C. GUIOCHET, Pharmacien . . . . . Juge  
M. P. VIGNOLES, Docteur ès-Science . . . . . Juge

# UNIVERSITE DE LIMOGES FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN de la FACULTE : Monsieur le Professeur **RABY**
- ASSESSEURS :       Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1<sup>er</sup> Assesseur)  
                          Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences (2<sup>e</sup> Assesseur)

## PERSONNEL ENSEIGNANT

### PROFESSEUR DES UNIVERSITES

<b>BENEYTOU</b> Jean-Louis	Biochimie
<b>BERNARD</b> Michel	Physique-Biophysique
<b>BROSSARD</b> Claude	Pharmacotechnie
<b>BUXERAUD</b> Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
<b>CHULIA</b> Albert	Pharmacognosie
<b>CHULIA</b> Dominique	Pharmacotechnie
<b>DELAGE</b> Christiane	Chimie Générale et Minérale
<b>GALEN</b> François Xavier	Physiologie
<b>GHESTEM</b> Axel	Botanique et Cryptogamie
<b>GUICHARD</b> Claude	Toxicologie
<b>HABRIOUX</b> Gérard	Biochimie Fondamentale
<b>LEFORT</b> des <b>YLOUSES</b> Daniel	Pharmacie Galénique
<b>NICOLAS</b> Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
<b>LOUDART</b> Nicole	Pharmacodynamie
<b>PENICAUT</b> Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
<b>RABY</b> Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
<b>TIXIER</b> Marie	Biochimie

### SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEFS DES SERVICES ADMINISTRATIFS

**CELS** René

A mes **Parents**

A mes **Frères**

A mes **Amis**

qui ont fait preuve d'indulgence et de patience tout au long de mes années d'études, je leur dédie affectueusement cette thèse.

**A Monsieur le Professeur J.A. NICOLAS**  
**Professeur des Universités de Bactériologie**  
**et Virologie, Parasitologie**

**Vous avez accepté la présidence de  
notre thèse.**

**Veillez y trouver l'expression de  
notre respectueuse reconnaissance.**

**A Monsieur G. DREYFUSS**  
Maître de Conférences des Universités de  
Parasitologie

Vous avez bien voulu diriger et  
juger ce travail.

Nous vous remercions pour les  
conseils que vous nous avez prodigués tout  
au long de notre travail.

**A Mademoiselle C. GUIOCHET**

**Pharmacien**

**Vous nous avez fait l'honneur de  
juger ce travail.**

**Nous vous remercions pour les  
excellents conseils prodigués au cours de  
nos stages.**

**A Monsieur P. VIGNOLES**

**Docteur ès-Sciences**

Vous avez accepté de juger ce travail.

Nous vous remercions pour l'aide précieuse que vous nous avez apportée tout au long de la réalisation de ce travail.

A Madame L. PEYRICHOU  
et au personnel du laboratoire de  
Parasitologie de la Faculté de Pharmacie  
de Limoges

Nous vous remercions pour votre  
aide et votre disponibilité lors de la  
réalisation de notre travail.

# PLAN

INTRODUCTION

CHAPITRE I : VALIDITE DU MODELE *E. gracilis*

CHAPITRE II : EVALUATION DE LA SENSIBILITE D'*E. gracilis* A QUELQUES  
DERIVES DU BNT

CHAPITRE III : RESULTATS

CHAPITRE IV : DISCUSSION

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

# INTRODUCTION

Les molluscicides sont des produits destinés à lutter contre les mollusques vecteurs de parasitoses. Ces parasitoses sont d'une grande importance en pathologie humaine en zone intertropicale et en pathologie animale dans des zones climatiques plus vastes.

Parmi ces parasitoses nous trouvons :

- la distomatose hépatobiliaire à *Fasciola hepatica* où l'hôte intermédiaire est un mollusque gastéropode pulmoné du genre *Lymnaea* (*Lymnaea trunculata*) ;
- les bilharzioses :
  - bilharziose à *Schistosoma haematobium* (ou bilharziose vésicale) qui a pour hôte intermédiaire un mollusque gastéropode pulmoné appartenant au genre *Bulinus* (*Bulinus truncata*) ;
  - bilharziose à *Schistosoma mansoni* (ou bilharziose hépato-intestinale) où l'hôte intermédiaire est un mollusque gastéropode pulmoné Planorbe du genre *Biomphalaria* (*Biomphalaria glabrata*) ;
  - bilharziose à *Schistosoma intercalatum* (ou bilharziose rectale) qui a pour hôte intermédiaire un mollusque du genre *Bullinus* (*Bulinus globulus*) ;
  - bilharziose à *Schistosoma japonicum* (ou bilharziose hépatosplénique) où l'hôte intermédiaire est un mollusque prosobranch appartenant au genre *Onchomelania*.

Dans le Limousin, en pathologie animale, les conséquences économiques sont telles que la maladie provoquée par *Fasciola hepatica* constitue l'un des fléaux de l'élevage. En effet, *Fasciola hepatica* (ou grande douve du foie) est un parasite commun des voies biliaires du mouton ou des bovins : elle occasionne chez ces herbivores domestiques la distomatose hépatique, maladie caractérisée par une faiblesse, un amaigrissement et un ictère par obstruction des canaux biliaires et rétention de bile.

Les molluscicides permettent alors l'interruption du cycle des parasites et s'inscrivent dans la lutte intégrée contre ces maladies. Actuellement un seul molluscicide est utilisé : le Niclosamide (Bayluscide®).

C'est un produit convenable mais il présente certains effets indésirables : il détruit la faune non visée, en particulier les poissons. Son insolubilisation pose des problèmes de dispersion dans certains types de gîte (GAYRAL et CAVIER, 1977).

Des résistances à ce produit étant apparues (JELNES, 1977), il est nécessaire de rechercher de nouveaux composés actifs. Les dérivés halogénés du benzamido-2 nitro-5 thiazole (BNT) ont donc été introduits pour servir d'alternative aux molluscicides actuellement utilisés. Leur activité molluscicide est connue depuis les années 70 (CAVIER *et al.*, 1978).

L'utilisation rationnelle de tels produits nécessite une parfaite connaissance de leur réactivité chimique afin d'éviter toute contamination intempestive de l'environnement. On note un retard dans l'utilisation de ces produits sur le terrain, car on ne connaît pas l'impact de ceux-ci sur la faune et la flore associée.

Des travaux antérieurs ont été réalisés sur l'impact des dérivés du BNT sur la flore (DUFOUR, en 1989, a étudié l'action d'un dérivé du BNT sur *Euglena gracilis*).

Notre travail consiste en l'étude de la sensibilité de *E. gracilis* à différents dérivés du BNT réputés molluscicides.

Nous envisagerons donc successivement :

- chapitre I : Validité du modèle *E. gracilis*.
- chapitre II : Evaluation de la sensibilité de *E. gracilis* à quelques dérivés du BNT.
- chapitre III : Résultats expérimentaux.
- chapitre IV : Discussion.

CHAPITRE I  
VALIDITE DU MODELE *Euglena gracilis*

## A. GENERALITES

### 1. CLASSIFICATION (ENCYCLOPEDIA UNIVERSALIS)

Les euglènes sont des eucaryotes avec des organes reproducteurs formés de sporocystes ayant des plastes sans amidon contenant les chlorophylles a et b, et des carotènes. Ce sont des cellules flagellées.

Phylum	:	Chromophytes
Embranchement	:	Euglénophytes
Classe	:	<i>Euglenophyceae</i>
Famille	:	<i>Euglenidae</i>
Genre	:	<i>Euglena</i>
Espèce	:	<i>Euglena gracilis</i>
Souche	:	Z

### 2. DESCRIPTION (PELLEGRINI, 1978)

L'euglène est un organisme unicellulaire de couleur verte, de 50 µm par 12 µm, fusiforme à pH 3,5 et en batonnet à pH 7,2.

Le corps est entouré d'un tégument (pellicule) souple, élastique, essentiellement protéique, qui permet à la cellule de se déformer (spasmodie, métabolie) en s'étirant, se contractant ou se distordant. Cette grande plasticité du corps de l'euglène explique les différentes formes observées après la fixation des cellules. La pellicule présente des ornements qui dessinent des stries parallèles disposées en hélices longitudinales. Les crêtes sont orientées vers la région postérieure de la cellule. Au moment de la division cellulaire, une nouvelle crête se développe dans chaque sillon compris entre deux crêtes préexistantes.

Près de l'extrémité antérieure de la cellule, la pellicule s'invagine à l'intérieur de la cellule et délimite un réservoir, sorte de poche profonde qui communique avec l'extérieur par un étroit goulot qui s'ouvre par un orifice étroit (cytostome).

Deux flagelles inégaux prennent chacun naissance sur un blépharoplaste localisé dans le cytoplasme à proximité de la membrane du réservoir :

- le flagelle le plus long, actif, onduleux, très souple traverse le réservoir, le goulot et sort par le cytostome. Sa partie libre, aussi longue que la cellule elle-même est pourvue de nombreux mastigonèmes disposés en file hélicoïdale. Ce flagelle se distingue au microscope par différence de contraste ;
- le second flagelle, très court, demeure à l'intérieur du réservoir et se fixe à l'autre flagelle au niveau d'une granulation : le photorécepteur.

Le stigma, extraplastidal, appliqué sur les flancs du réservoir, toujours bien visible en microscopie photonique, a l'apparence d'une masse granuleuse, dense, rouge.

Une vacuole pulsatile, limitée par une membrane, formée par la coalescence de très nombreuses petites vacuoles, se déverse rythmiquement dans le réservoir qu'elle borde.

Les chloroplastes, une dizaine environ, allongés, discoïdes se caractérisent par une structure lamellaire agranaire et par une membrane limitante double.

Le chondriome est formé d'un réticulum grêle, ramifié, dessinant des mailles irrégulières autour des chloroplastes, du noyau et du réservoir.

Le noyau, volumineux, situé dans la région centrale de la cellule est limité par une membrane qui persiste au moment de la division nucléaire. Les chromosomes et le nucléole demeurent toujours visibles. la période de division débute par la migration du noyau vers la région postérieure du réservoir. La multiplication est un phénomène asexué.

L'appareil de Golgi est constitué d'une dizaine de dictyosomes formés par l'empilement de nombreux saccules. Il présente une activité hypersécrétoire au début de la division cellulaire.

Le réticulum endoplasmique s'étend dans toute la cellule et s'étale en une nappe sous-pelliculaire.

### 3. MOBILITE

Les euglènes se déplacent en faisant un mouvement hélicoïdal consécutif aux battements du flagelle, ce qui se traduit par une progression rapide.

La mobilité dépend du pH :

- à pH 3,5 : les cellules ont une mobilité réduite pendant les trois premiers jours de l'expérience. Elles présentent une alternance de contractions et de distorsions ;
- à pH 7,2 : les euglènes sont immédiatement mobiles.

### 4. NUTRITION

Les euglènes peuvent être phototrophes, hétérotrophes ou phagotrophes. Les plastes des euglènes renferment de la chlorophylle a et b et des pigments caroténoïdes.

Les euglènes sont photo-auxotrophes et ont besoin de vitamines B1 et B12. *E. gracilis* est hétérotrophe facultatif c'est-à-dire capable de se développer à l'obscurité si le milieu contient des substances organiques. Elle perd alors ses chloroplastes au cours des divisions successives. Après la huitième division, elle ne possède plus que des organites rudimentaires, les proplastes. On dit que les cellules sont étiolées (FREYSSINET, 1972). Les cellules ainsi obtenues peuvent être maintenues dans cet état, les cultures se poursuivant à l'obscurité sur le même milieu. Remises à la lumière, un bouleversement métabolique et physiologique est observé, provoquant l'élaboration du système plastidien. La synthèse de la chlorophylle se

déroule alors de façon linéaire après une phase de latence variant de 3 à 12 heures. Mais des souches vertes, traitées soit par divers agents physiques à dose sub-létale tels les rayons UV ou des températures de culture élevées, soit par des agents chimiques, restent définitivement incolores. Elles sont devenues des hétérotrophes stricts aplatiés.

Grâce à la photosynthèse, les euglènes synthétisent des produits carbonés qui sont mis en réserve sous forme de paramylon qui est un  $\beta$ -1,3 glucan caractéristique de la famille des euglénidées. Le paramylon peut aussi être formé à partir de carbone organique présent dans le milieu.

## 5. ECOLOGIE

*E. gracilis* est un organisme photosynthétique autotrophe, hormis son besoin en vitamines B1 et B12. Soumis à un rythme régulier d'éclairement ce phytoflagellé présente une très bonne synchronisation naturelle liée au fait que la majorité des synthèses ont lieu au moment de la période diurne et, si la durée de la photopériode est de 8 heures, les mitoses surviennent seulement en période nocturne (BERTAUX, 1976).

Les besoins nutritifs des euglènes expliquent leur abondance dans les eaux riches en matières organiques.

La plupart vivent en eaux douces et peuvent supporter des écarts de pH important allant de 3,5 à 9.

On les trouve soit dans le plancton, soit sur les fonds boueux, soit sur la terre humide en bordure de mares et de fossés.

## B. VALIDITE DU MODELE

L'étude de pesticides implique la connaissance de quatre types de données :

- évaluation de l'activité du produit sur l'espèce visée ;
- caractéristiques physico-chimiques de la substance ;
- évaluation des risques pour l'environnement et de l'action de la substance dans le milieu (sur l'eau et les poissons par exemple) ;

- dégradation du produit dans la nature : connaissance de la rémanence, de l'action des produits de dégradation...

En écologie, deux grandes options peuvent être prises, à savoir de choisir :

- des espèces sensibles, indicateurs de pollution : dans les essais de toxicologie aiguë elles apportent un facteur de sécurité ;
- des espèces capables de cumuler et donc peu sensibles, pouvant être des points de départ de biomagnification des toxiques dans des chaînes alimentaires.

De toute façon, il faut des espèces :

- appartenant à un écosystème naturel ;
- fournissant des populations homogènes ;
- ayant une courte durée de cycles biologiques.

Les algues unicellulaires sont le plus souvent utilisées, d'une part parce qu'elles représentent la majeure partie du phytoplancton, d'autre part parce qu'elles sont de culture et de manipulation relativement faciles (JOUANY, 1981).

Pour notre étude nous avons choisi l'euglène.

De plus les études toxicologiques tendent à se faire *in vitro* sur des espèces animales ou végétales pour éviter des tests *in vivo* souvent longs et onéreux (GOLDBERG et FRAZIER, 1989).

## 1. SENSIBILITE DES EUGLENES

Plusieurs études ont été réalisées avec les euglènes comme modèle de base. L'euglène est sensible à de nombreux produits, parmi lesquels les herbicides (ROUX, 1984) : le CIPC (chlore-isopropyl-phenyl-carbamate) inhibe la croissance des euglènes par inhibition de la multiplication cellulaire. L'effet du CIPC sur la croissance des euglènes augmente avec la dose d'herbicide.

Une étude a également été menée pour connaître l'action des ions cadmium sur les euglènes (BONALY, 1978). La toxicité du cadmium se manifeste sur la croissance des euglènes à partir d'une concentration de  $5 \cdot 10^{-5}$  M et la dose de  $5 \cdot 10^{-2}$  M est immédiatement létale pour l'ensemble des éléments de la population.

Enfin, les euglènes sont sensibles aux pesticides, en particulier aux molluscicides car on note une inhibition de la croissance à partir de certaines concentrations pour les dérivés du BNT (DUFOUR, 1989).

## 2. REPRODUCTIBILITE

La croissance des euglènes se fait de façon reproductible. Ceci est démontré par les valeurs des taux de croissance maxima (k) des différents témoins :

- à 24 heures : k compris entre 0,48 et 0,53 ;
- à 48 heures : k compris entre 0,26 et 0,29 ;
- à 72 heures : k compris entre 0,18 et 0,21 ;
- à 96 heures : k compris entre 0,14 et 0,16.

Ces différents résultats permettent de montrer que le protocole de manipulation rigoureusement respecté assure une reproductibilité des cultures.

De plus, les ions  $Cd^{2+}$  ont sur les cellules d'euglènes une action toxique qui se manifeste au niveau de la croissance des populations algales selon des modalités constantes et rigoureusement reproductibles (BONALY, 1978).

## 3. FIABILITE D'INTERPRETATION

La culture des euglènes est facilement réalisable au laboratoire, ce qui permet d'obtenir des populations homogènes ayant une courbe de croissance reproductible.

Donc l'interprétation des résultats est relativement facile.

## 4. EVALUATION DE LA TOXICITE

Il y a plusieurs types d'évaluations possibles :

- résultat global : le critère choisi est la croissance. On recherche la concentration inhibitrice à 50 % (c'est la concentration de toxique dans le milieu provoquant une diminution de 50 % de la croissance de la population

cellulaire par rapport au témoin au bout d'un temps donné). Mais on peut également déterminer :

- le seuil de toxicité : c'est la plus faible concentration de toxique provoquant l'inhibition de la croissance algale (CMI : concentration minimale inhibitrice) ;
  - le seuil algicide : c'est la concentration minimale de toxique provoquant la mort (CML : concentration minimale létale) ;
  - la concentration létale à 50 % : c'est la concentration de toxique pour laquelle le taux de mortalité des cellules est de 50 % ;
  - le seuil algistatique : c'est la concentration minimale de toxique provoquant l'inhibition totale de la croissance sans tuer ;
  - la concentration activatrice maximale : c'est la concentration pour laquelle on obtient une activation maximale de la croissance.
- aspect fonctionnel : il en est ainsi des mesures de la teneur en chlorophylle, des échanges  $O_2/CO_2$ , des immobilisations du flagelle, de la numération des cellules vivantes via l'ATP (cela peut se faire grâce à la bioluminescence).
- modifications morphologiques.
- biochimie fine : mesure d'une activité enzymatique.

Pour notre étude, nous avons choisi comme matériel de travail des cellules d'*E. gracilis*. En effet, celles-ci présentent des caractéristiques se prêtant d'une façon satisfaisante à des études de cytologie. Leur volume cellulaire est relativement élevé. Leurs noyaux sont aisément colorables par les colorants spécifiques de l'ADN. Enfin, leur culture ne présente pas de grosses contraintes et de plus les cellules se séparent dès leur division.

De plus, les algues jouent un rôle très important dans l'environnement en intervenant dans divers domaines. En particulier, elles sont responsables de la photosynthèse dans les milieux aquatiques et sont capables en présence de lumière de libérer d'importantes quantités d'oxygène qui intervient comme agent oxydant et est utilisé par les micro-organismes hétérotrophes aérobies responsables de la dégradation des matières organiques. Elles jouent également un rôle dans la constitution des chaînes alimentaires.

Nous allons donc étudier la croissance d'*E. gracilis* ainsi que l'action que peuvent avoir les dérivés du BNT sur celle-ci. Pour évaluer la toxicité de ces dérivés nous allons calculer :

- les  $CI_{50}$  ;
- les  $CL_{50}$  ;
- les  $CA_{max}$ .

CHAPITRE II  
EVALUATION DE LA SENSIBILITE  
D'*E. GRACILIS* A QUELQUES DERIVES  
DU BNT

## A. CONDITIONS DE MODELISATION

### 1. ENTRETIEN DE LA SOUCHE

Une souche d'*E. gracilis* est entretenue au laboratoire dans le milieu de Schiff (décrit dans le paragraphe méthodologie).

La souche est repiquée chaque quinzaine de façon à ce que les algues se trouvent en phase exponentielle le jour de l'ensemencement. Le repiquage à partir d'euglènes en phase exponentielle permet en effet une bonne reprise de la culture avec une diminution du temps de latence.

L'entretien de la souche s'effectue dans un flacon en polystyrène type boîte de Roux (80 cm<sup>2</sup> de surface). A partir du milieu de culture préparé, nous prélevons 25 ml auxquels nous ajoutons 25 ml d'eau distillée pour obtenir un milieu une fois concentré par rapport au milieu de Schiff que nous préparons. Nous pratiquons ensuite une filtration stérilisante sur une membrane de 0,22 µm de porosité (Sartorius®).

Les euglènes sont ensuite repiquées dans le nouveau milieu par prélèvement de 1 à 2 ml de la culture précédente.

### 2. DEFINITION DES CONDITIONS DE L'EXPERIMENTATION

*E. gracilis* est cultivée à 25 °C dans une enceinte climatique. Les volumes employés au cours de l'expérience sont relativement faibles, 5 ml, ce qui permet d'éviter l'utilisation d'un agitateur. Les cellules sont cultivées sous un éclairage artificiel avec une photophase de

12 heures et une intensité de 3000 lux à la surface des récipients. Or les dérivés du BNT sont sensibles à la lumière (CLEDAT, 1989 ; FRAYSSE, 1987). Cette technique permet d'étudier l'efficacité des produits sur les euglènes dans des conditions d'éclairement similaires à celles utilisées lors de l'étude toxicologique sur les limnées et les gammares (VIGNOLES *et al.*, 1990 a).

La culture est ainsi maintenue pendant 12 jours afin d'obtenir un cycle de croissance complet. Le produit toxique est en grande partie dégradé au bout de 4 jours d'où une diminution de sa concentration dans le milieu. Il faut ensuite compter 4 à 5 jours de plus pour permettre une reprise des euglènes jusqu'à un palier maximum (DUFOUR, 1989).

La cinétique de croissance d'une culture d'euglènes, représentée en coordonnées semi-logarithmique, se décompose en 5 phases (MILLET, 1984) :

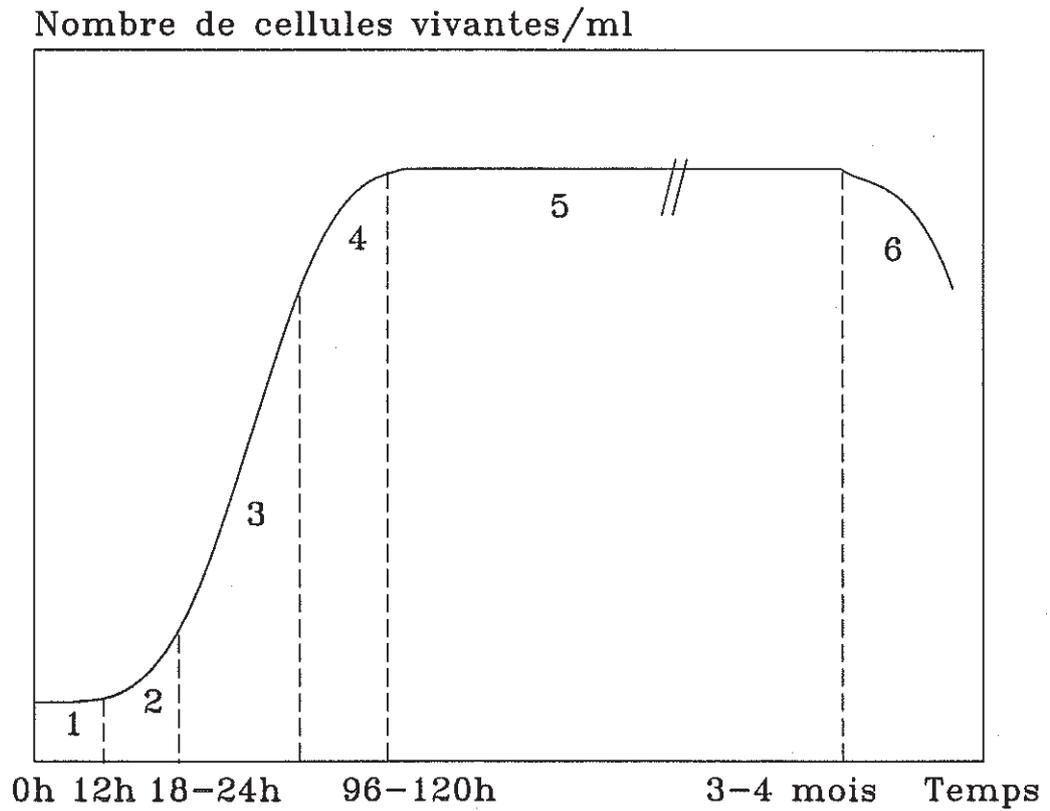
- phase de latence : elle est brève. Elle est due au temps d'adaptation de l'algue à son nouveau milieu ;
- phase exponentielle de croissance : c'est la période de croissance optimale pendant laquelle on observe la vitesse de croissance la plus élevée ;
- phase de ralentissement : c'est le début de l'appauvrissement du milieu dû à une densité cellulaire de plus en plus élevée ;
- phase stationnaire : elle est due à l'épuisement des ressources énergétiques du milieu. Durant cette phase les cellules se maintiennent grâce à la photosynthèse et à l'utilisation de leurs réserves ;
- phase de décroissance : toutes les réserves sont épuisées ; les cellules commencent à mourir.

La figure 1 représente la courbe de croissance théorique de l'euglène.

Pour effectuer la mise en culture des euglènes nous utilisons des flacons type boîte de Roux (25 cm<sup>2</sup> de surface). Ce sont des flacons en polystyrène à usage unique. Ces flacons permettent d'utiliser un volume de milieu assez faible (5 ml).

Dans ce type de flacons :

- l'évaporation du milieu est réduite ;
- l'adhérence des cellules contre les parois est faible ;
- les risques de contamination sont diminués ;



**Figure 1** : Courbe de croissance théorique des euglènes.

- 1 : Phase de latence.
- 2 : Phase de démarrage.
- 3 : Phase de croissance exponentielle.
- 4 : Phase de ralentissement.
- 5 : Phase stationnaire ou plateau.
- 6 : Phase de décroissance.

Les parties 2 à 5 correspondent à la courbe logistique.

- la lumière passe au travers du milieu même avec une densité cellulaire importante ;
- le nombre maximum de cellules est compris entre  $8.10^6$  et  $9.10^6$  par millilitre.

DUFOUR (1989) avait essayé d'effectuer ces cultures dans des erlens-meyers mais cela nécessitait une quantité de milieu plus grande (50 ml par erlen). De plus le bouchage était effectué par du coton cardé, donc, au fur et à mesure de l'expérience, les risques de contamination augmentaient. De plus, en fin de culture, la densité des cellules était telle que la lumière ne pouvait plus diffuser de manière homogène à travers le milieu.

Toutes les opérations effectuées pour la mise en culture des euglènes sont accomplies sous une hotte à flux laminaire pour éviter toute contamination. A la fin d'une expérience tout le matériel en plastique (flacons, pipettes...) est incinéré de façon à détruire tous les micro-organismes.

## B. METHODOLOGIE

### 1. COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE

Pour la culture des euglènes nous utilisons un milieu organotrophique qui va apporter tous les éléments nécessaires à la croissance des algues.

Le milieu utilisé est le milieu de Schiff (GREENBLATT et SCHIFF, 1959). Il a la particularité de permettre aux euglènes de se développer même à l'obscurité.

Ce milieu est composé d'une fraction organique et d'une fraction minérale.

La fraction organique comprend :

- fraction minérale	4,0 ml
- acide malique	0,8 g
- acide glutamique	2,0 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,08 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,16 g
- $\text{CaCO}_3$	0,2 g

- vitamine B1                    50,0 µl (solution à 15 mg/ml)
- vitamine B12                17,5 µl (solution à 2,5 mg/ml)
- H<sub>2</sub>O                            qsp 200,0 ml

Cette fraction apporte :

- des sources de carbone :

acide malique

acide glutamique

- des sources d'azote :

acide glutamique

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

- des sources de phosphore :

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- des sources de vitamines :

vitamine B1

vitamine B12

Nous ajoutons les vitamines B1 et B12 dans ce milieu car *E. gracilis* est carencée en absence de ces vitamines. Cette algue est incapable de les synthétiser (BERTAUX, 1976 ; BRE, 1982 ; FREYSSINET, 1977). Ces vitamines sont conservées à +4 °C. Elles sont à l'état de solutions concentrées, stérilisées par filtration sur une membrane de 0,22 µm.

La fraction minérale comprend :

- MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O            12,0 g
- CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O            0,9 g
- FeSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O            0,4 g
- BO<sub>3</sub>H                      0,2 g
- EDTA Na<sub>2</sub>                0,5 g
- ZnSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O            0,3 g
- MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O            0,1 g
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>                    10,0 ml
- H<sub>2</sub>O                        qsp 1,0 l

La fraction minérale est ajoutée à la fraction organique dans une proportion de 2 % de sa concentration. Elle va apporter des oligo-éléments dont le rôle est essentiellement plastique. Ils sont donc nécessaires au développement de la cellule.

## 2. DESCRIPTION DU MILIEU DE CULTURE

### a. PREPARATION DU MILIEU DEUX FOIS CONCENTRE

Nous préparons préalablement 200 ml du milieu en utilisant 196 ml d'eau distillée et 4 ml de la fraction minérale. L'acide malique, l'acide glutamique, le  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , le  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et le  $\text{CaCO}_3$  sont des poudres qui sont pesées puis mises dans un erlen-meyer. Nous ajoutons ensuite les 196 ml d'eau distillée tiédie ce qui permet une meilleure dissolution de l'acide glutamique. Enfin nous ajoutons les 4 ml de fraction minérale.

Ce milieu ainsi préparé a un pH de 3,5. Pour l'étude de la toxicité des dérivés du BNT sur *E. gracilis*, nous effectuons également une culture à pH 7,2.

Sur les 200 ml de milieu ainsi préparé, nous prélevons 25 ml auxquels nous ajoutons 25 ml d'eau distillée. Nous obtenons alors 50 ml d'un milieu une fois concentré qui servira au repiquage de la souche d'euglènes (cf II.A.1).

### b. PREPARATION DU MILIEU UNE FOIS CONCENTRE

Nous préparons deux flacons :

- le premier comprend 25 ml du milieu deux fois concentré à pH 3,5 auxquels nous ajoutons  $(25 - x)$  ml d'eau distillée ( $x$  étant le volume de PEG correspondant à celui de produit toxique que nous ajouterons lors de la mise en culture) ;
- le second est composé de 25 ml du milieu deux fois concentré dont le pH est amené à 7,2 par addition de KOH 1 N et  $(25 - x' - y)$  ml d'eau distillée ( $x'$  étant le volume de PEG correspondant à celui de produit toxique ;  $y$  est le volume de KOH 1 N nécessaire pour ramener le pH du milieu à 7,2).

Ces flacons, hermétiquement clos, sont stérilisés par autoclavage pendant 20 mn à 120 °C. Ces deux flacons constituent la série de milieux de culture qui sera appelée  $M_1$ .

Les 125 ml de milieu deux fois concentré restants, sont conservés au réfrigérateur à +4 °C jusqu'à la préparation du milieu de culture définitif.

A partir des 125 ml du milieu deux fois concentré conservés au réfrigérateur nous préparons une deuxième série de milieux de culture qui sera appelée  $M_2$ .

Cette série comprend deux flacons :

- un à pH 3,5 : nous mettons 25 ml du milieu deux fois concentré, x ml de produit toxique dissous dans le PEG et (25 - x) ml d'eau distillée ;
- un à pH 7,2 : nous mettons 25 ml du milieu deux fois concentré, x' ml de produit toxique en solution dans le PEG, y ml de KOH 1 N pour amener le pH de 3,5 à 7,2 et (25 - x' - y) ml d'eau distillée.

Ces deux milieux ainsi préparés subissent une filtration stérilisante sur une membrane de 0,22  $\mu\text{m}$  de porosité (Sartorius®) pour éviter la dégradation du produit.

### 3. REPARTITION DU MILIEU DANS LES DIFFERENTS FLACONS

La répartition du milieu de culture dans les différents flacons se fait sous la hotte à flux laminaire de façon stérile, pour éviter toute contamination bactérienne qui serait préjudiciable à la croissance des euglènes.

Nous préparons deux séries de flacons : l'une à pH 3,5 l'autre à pH 7,2. Pour chaque pH, nous préparons un témoin et quatre flacons de dilution croissante du produit. L'expérience est réalisée en double ce qui permet de faire une moyenne lors du comptage.

La répartition dans les différents flacons se fait comme suit :

- flacon témoin : 5 ml de milieu de la série  $M_1$
- $C_1$  : (5 -  $z_1$ ) ml de  $M_1$  +  $z_1$  ml de  $M_2$
- $C_2$  : (5 -  $z_2$ ) ml de  $M_1$  +  $z_2$  ml de  $M_2$
- $C_3$  : (5 -  $z_3$ ) ml de  $M_1$  +  $z_3$  ml de  $M_2$
- $C_4$  : (5 -  $z_4$ ) ml de  $M_1$  +  $z_4$  ml de  $M_2$

#### 4. PROTOCOLE OPERATOIRE

##### a. ENSEMENCEMENT DES EUGLENES

L'ensemencement des euglènes est réalisé à partir de la souche entretenue par repiquage toutes les quinze jours (cf II.A.1). Les euglènes se trouvent alors en phase exponentielle lors de la mise en culture. Avant l'ensemencement nous effectuons un comptage de la souche. Cette numération nous permet de déterminer le volume nécessaire à prélever pour obtenir  $50 \cdot 10^3$  cellules par ml dans les flacons expérimentaux.

La mise en culture étant effectuée, les différents flacons sont placés dans l'enceinte climatique durant les 12 jours d'expérience.

##### b. METHODE ET PERIODICITE DE COMPTAGE

Le comptage est effectué au microscope optique sur une cellule de Malassez. Cette cellule est constituée par une épaisse lame de verre au centre de laquelle se trouvent deux plates-formes rectangulaires, comportant vers le milieu un quadrillage gravé. Deux rigoles longitudinales séparent ces plates-formes de deux plateaux plus élevés qu'elles d'une hauteur connue, sur lesquels reposera une lamelle planée. Le quadrillage total est composé de 100 rectangles de  $1/4$  de mm de longueur et de  $1/5$  de mm de largeur soit une superficie de  $1/20$  de  $\text{mm}^2$  par rectangle et une superficie totale de  $5 \text{ mm}^2$  pour l'ensemble des 100 rectangles.

La profondeur de la chambre est de  $1/5$  de mm. Chaque rectangle correspond donc à un volume de  $1/100$  de  $\text{mm}^3$  et l'ensemble des 100 rectangles à  $1 \text{ mm}^3$  ( $1 \mu\text{l}$ ) (PIETTE, 1968).

Un dénombrement des euglènes survivantes et mortes est effectué deux fois par jours, les trois premiers jours suivant la mise en culture ; puis une fois par jour jusqu'à l'arrêt de la culture, soit au bout de 12 jours.

Lors de chaque comptage, un prélèvement est effectué dans chaque flacon dans des conditions stériles sous la hotte à flux laminaire.

Pour chaque flacon nous effectuons :

- un prélèvement auquel on ajoute une quantité déterminée d'acide sulfochromique à 1 %. Cet acide permet de fixer les cellules afin d'effectuer un comptage plus facile.
- un prélèvement dilué dans une solution de bleu Trypan qui va colorer en bleu les euglènes mortes. En effet, les cellules vivantes filtrent en permanence le milieu intra-cellulaire expulsant le colorant et évitant son incorporation. Les euglènes mortes voient leur cytoplasme s'équilibrer avec le milieu environnant d'où leur coloration bleue.

Le nombre de cellules vivantes est donné par la formule ci-dessous :

$$N_V = N_A - N_B$$

$N_V$ : nombre de cellules vivantes ;

$N_A$ : nombre de cellules fixées par l'acide sulfochromique (nombre de cellules totales) ;

$N_B$ : nombre de cellules colorées par le bleu Trypan (nombre de cellules mortes).

Différentes dilutions sont utilisées de manière à avoir environ 100 à 200 euglènes par cellule de Malassez : le tableau 1 montre à titre indicatif les volumes d'acide sulfochromique et d'eau distillée utilisés en fonction du nombre de cellules dans le milieu, pour la fixation des euglènes (A) et pour la coloration des cellules mortes (B).

Le nombre de cellules vivantes par millilitre est :

$$N = n \times \frac{1}{1/d} \times 10^3$$

$N$ : nombre de cellules par millilitre ;

$n$ : nombre de cellules comptées sur la cellule de Malassez ;

$d$ : dilution.

A

Nombre de cellules par ml	Volume prélevé en $\mu\text{l}$	Volume d'acide sulfochromique en $\mu\text{l}$
$50.10^3 - 200.10^3$	20	10
$200.10^3 - 4.10^6$	20	100
$> 4.10^6$	10	190

B

Nombre de cellules par ml	Volume prélevé en $\mu\text{l}$	Volume de bleu trypan en $\mu\text{l}$	Volume d'eau distillée en $\mu\text{l}$
$50.10^3 - 200.10^3$	20	10	-
$200.10^3 - 4.10^6$	20	10	20
$> 4.10^6$	10	10	80

**Tableau 1 :** Volumes utilisés en fonction du nombre de cellules par ml :  
 - pour la fixation des euglènes (A).  
 - pour la coloration des cellules mortes (B).

### c. MATERIEL UTILISE

Le matériel nécessaire à la répartition dans les différents flacons est constitué de :

- micropipettes automatiques à volume variable Gilson® ;
- embouts stériles ;
- porte-filtre de 50 mm de diamètre ;
- filtres de 0,22 µm adaptés aux portes-filtres. Cet ensemble est stérilisé 20 mn à l'autoclave.

## C. PRODUITS ETUDIES

Le tableau 2 regroupe les différents composés étudiés.

### 1. LE NICLOSAMIDE

#### a. GENERALITES

Le Niclosamide nous sert, dans cette étude, de molécule de référence. C'est le dichloro-2',5 nitro-4' salicylanilide.

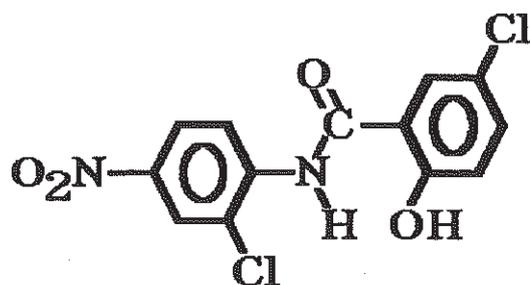
Le Niclosamide est le seul molluscicide existant sur le marché et utilisé sur le terrain (GAYRAL et CAVIER, 1977). Ce produit a fait l'objet de nombreuses études tant sur le terrain qu'en laboratoire (GILLES *et al.*, 1973 ; BARBOSA *et al.*, 1981 ; JELNES, 1977).

Il est très utilisé dans les régions tropicales où les bilharzioses sont très répandues.

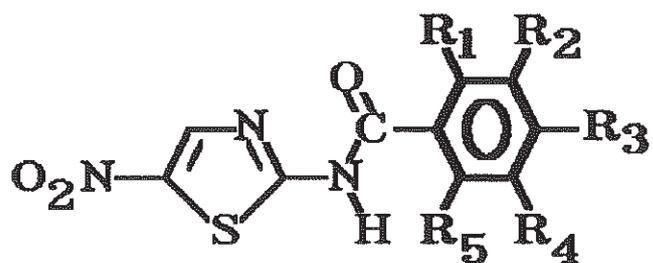
Le Niclosamide est rarement employé pur : il est souvent employé dans des formulations de sels d'éthanolamine en poudre mouillable à 60 % (Mollutox®) ou à 70 % de principe actif (Bayluscide®), ou en concentré émulsionnable à 25 % (Clonitralide®).

Le Niclosamide est un acide faible, insoluble dans l'eau. Il est très toxique pour les mollusques et les oeufs, légèrement rémanent. Il détruit également la faune non visée mais la restauration du milieu est très rapide (GAYRAL et CAVIER, 1977).

Produit de référence : le Niclosamide



Les dérivés du BNT



Substituants	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Noms					
BNT	H	H	H	H	H
Dichloro-3,4 BNT	H	Cl	Cl	H	H
Dichloro-3,5 BNT	H	Cl	H	Cl	H
Fluoro-2 BNT	F	H	H	H	H
Fluoro-4 BNT	H	H	F	H	H

Tableau 2 : Les différents composés étudiés : tableau récapitulatif.

Son insolubilité pose des problèmes de dispersion dans certains types de gîtes et il est légèrement irritant pour les mollusques.

Sa toxicité pour les mammifères est très faible.

Le Niclosamide est également utilisé en médecine humaine comme ténicide (Trédémine®).

## b. MECANISME D'ACTION

### α. RAPPEL SUR LA CHAÎNE RESPIRATOIRE

La figure 2a schématise les différents compartiments de la mitochondrie ainsi que la localisation et le mode d'action de la chaîne respiratoire.

Sa structure en double membrane lui permet d'accumuler les protons dans la chambre externe. Il se crée alors un gradient de pH associé à une différence de potentiel entre la chambre externe et la matrice. Le passage des protons au niveau d'une ATPase de la chambre externe vers la matrice mitochondriale permet la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP).

### β. MODE D'ACTION

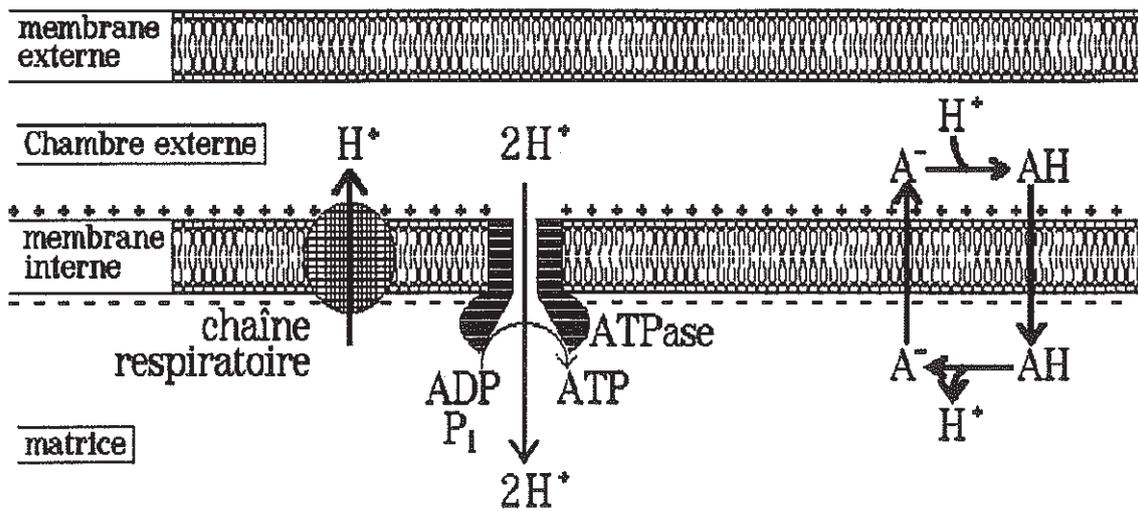
La figure 2b montre la protonation du Niclosamide en fonction du pH.

La fonction phénol du produit est indispensable à son action et confère à la molécule les propriétés d'un acide faible. De plus, ce produit est lipophile, ce qui facilite sa diffusion à travers la membrane interne de la mitochondrie.

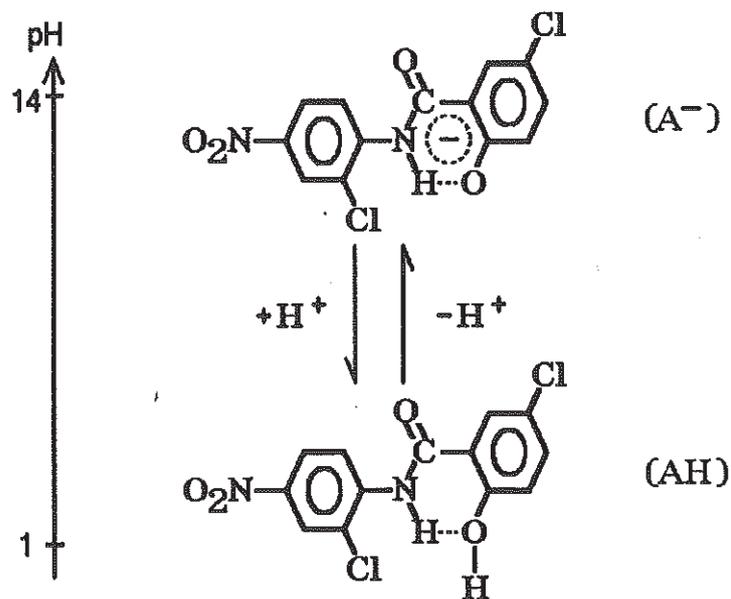
L'état d'ionisation de la molécule est fonction du pH. C'est pourquoi dans la matrice où le pH est proche du  $pK_A$  de la molécule, la forme majoritaire sera l'ion phénate alors que dans la chambre externe où le pH est plus faible, nous trouverons essentiellement la forme neutre.

Ces deux formes vont permettre un transport de protons contre le gradient créé par la chaîne respiratoire empêchant ainsi le couplage nécessaire à la synthèse d'ATP.

a



b



**Figure 2** : Le Niclosamide :

- Schématisation du mode d'action dans la mitochondrie (graphe a). AH : forme neutre de la molécule (en milieu acide),  $A^-$  : ion phénate (en milieu basique).
- Formes de la molécule en fonction du pH (graphe b).

## 2. LES DERIVES DU BNT

Les dérivés du BNT possèdent une forte activité molluscicide et antiparasitaire (CAVIER *et al.*, 1978 ; MADULO-LEBLOND *et al.*, 1981).

Ils pourraient donc être utilisés pour lutter contre les mollusques vecteurs de parasitoses. Une telle utilisation nécessitant la dispersion des produits dans l'eau, il importe de connaître leur comportement physico-chimique et leurs propriétés acido-basiques.

Un dérivé est cependant utilisé en médecine vétérinaire pour son action ténicide, sous le nom de Nitazoxanide (MURPHY et FRIEDMANN, 1985). Il est parfois plus efficace que le Niclosamide (CAVIER *et al.*, 1978).

### a. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Les dérivés halogénés du BNT se comportent comme des monobases faibles. La protonation se fait vraisemblablement sur l'azote endocyclique (CLEDAT *et al.*, 1989 b).

Ces composés sont instables en solution aqueuse. Ils possèdent en plus une photosensibilité : en effet la décomposition des dérivés du BNT en solution aqueuse alcaline est activée par la lumière et la température. Un pH acide ou alcalin favorise également leur dégradation (FRAYSSE, 1987).

L'effet attracteur des substituants halogénés diminue la stabilité de la molécule d'où l'importance de la position des substituants. Un travail antérieur (MADULO-LEBLOND *et al.*, 1981) a montré qu'il est possible d'exalter les propriétés molluscicides du BNT par substitution de son cycle benzénique, en position convenable, par un ou plusieurs atomes de chlore ou éventuellement de brome.

Enfin, la toxicité des produits est due essentiellement à la lipophilie pendant les 96 premières heures d'intoxication (VIGNOLES *et al.*, 1990 b).

### b. MODE D'ACTION

Le mode d'action des dérivés du BNT est inconnu, cependant leur structure permet d'émettre deux hypothèses :

- ces molécules sont des bases faibles et sont capables de capter un proton au niveau de l'azote endocyclique du groupement thiazole. Leur  $pK_A$  est proche du pH existant au niveau de la mitochondrie. De plus, elles sont lipophiles, permettant ainsi une diffusion facilitée à travers la membrane mitochondriale. Il est alors aisé de penser que les dérivés du BNT peuvent avoir une action découplante au niveau des chaînes respiratoires ;
- leur conformation relativement plane dans le cas de la forme protonée permettrait une interaction au niveau des bases de l'acide désoxyribonucléique des cellules. Cela entraîne des erreurs de transcription et de duplication, donc des désordres cellulaires.

### c. SOLUBILISATION DES PRODUITS ETUDIÉS

Les produits étudiés sont solides. Nous allons les dissoudre dans du polyéthylène glycol (PEG 400) car les dérivés du BNT sont des produits lipophiles et leur solubilité en milieu aqueux est très faible.

Les solutions-mères ne sont préparées qu'avec du PEG 400 et conservées à l'abri de la lumière.

### d. DOSAGE DES SOLUTIONS

Sur les filtrats des solutions-mères à pH 7,2 et pH 3,5 nous mesurons l'absorbance au spectrophotomètre. Cette mesure va permettre de déterminer la concentration totale en produit de la solution-mère en  $\text{mol.l}^{-1}$ .

Selon la loi de Beer-Lambert nous avons :

$$A = \epsilon.L.C$$

A : absorbance de la solution ;

$\epsilon$  : coefficient d'absorption molaire en  $\text{l.mol.cm}^{-1}$  ;

C : concentration totale du composé en  $\text{mol.l}^{-1}$  ;

L : longueur du trajet optique.

Les coefficients d'absorption molaire ont été déterminés par CLEDAT (1989) en tampon aqueux contenant 10 % (V/V) d'acétonitrile. Pour nos expériences, les produits sont dissous dans du PEG 400, par conséquent, la concentration obtenue par ces mesures sera une valeur approchée. Aux pH considérés il faut tenir compte de l'équilibre de protonation du BNT (base faible :  $B + H^+ \rightleftharpoons BH^+$ ).

$$x = \frac{[B]}{[BH^+]} = 10^{pH - pK_a}$$

$$A = LC \frac{\epsilon_1 + \epsilon_2 x}{1 + x} \quad (1)$$

$\epsilon_1$  : coefficient d'extinction de la forme acide  $[BH^+]$  en  $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

$\epsilon_2$  : coefficient d'extinction de la forme basique  $[B]$  en  $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$  ;

C : concentration totale en  $mol \cdot l^{-1}$ , avec  $C = [B] + [BH^+]$ .

A la longueur d'onde utilisée, correspondant au pic d'absorption de la forme neutre, la valeur  $\epsilon_1$  est négligeable et au pic d'absorption de la forme protonée, la valeur  $\epsilon_2$  est négligeable. Par conséquent la relation (1) se résume à :

$$A = LC \frac{\epsilon_2 x}{1 + x} \quad (\text{pH } 7,2)$$

$$A = LC \frac{\epsilon_1}{1 + x} \quad (\text{pH } 3,5)$$

Nous pouvons alors déterminer la concentration totale du produit en solution à l'aide des formules suivantes :

$$C = \frac{A}{\epsilon_2 L} \cdot \frac{1+x}{x} \quad (\text{pH } 7,2)$$

$$C = \frac{A}{\epsilon_1 L} \cdot (1+x) \quad (\text{pH } 3,5)$$

Les cuves de spectrophotomètre utilisées sont telles que le trajet optique L est égal à 1 cm.

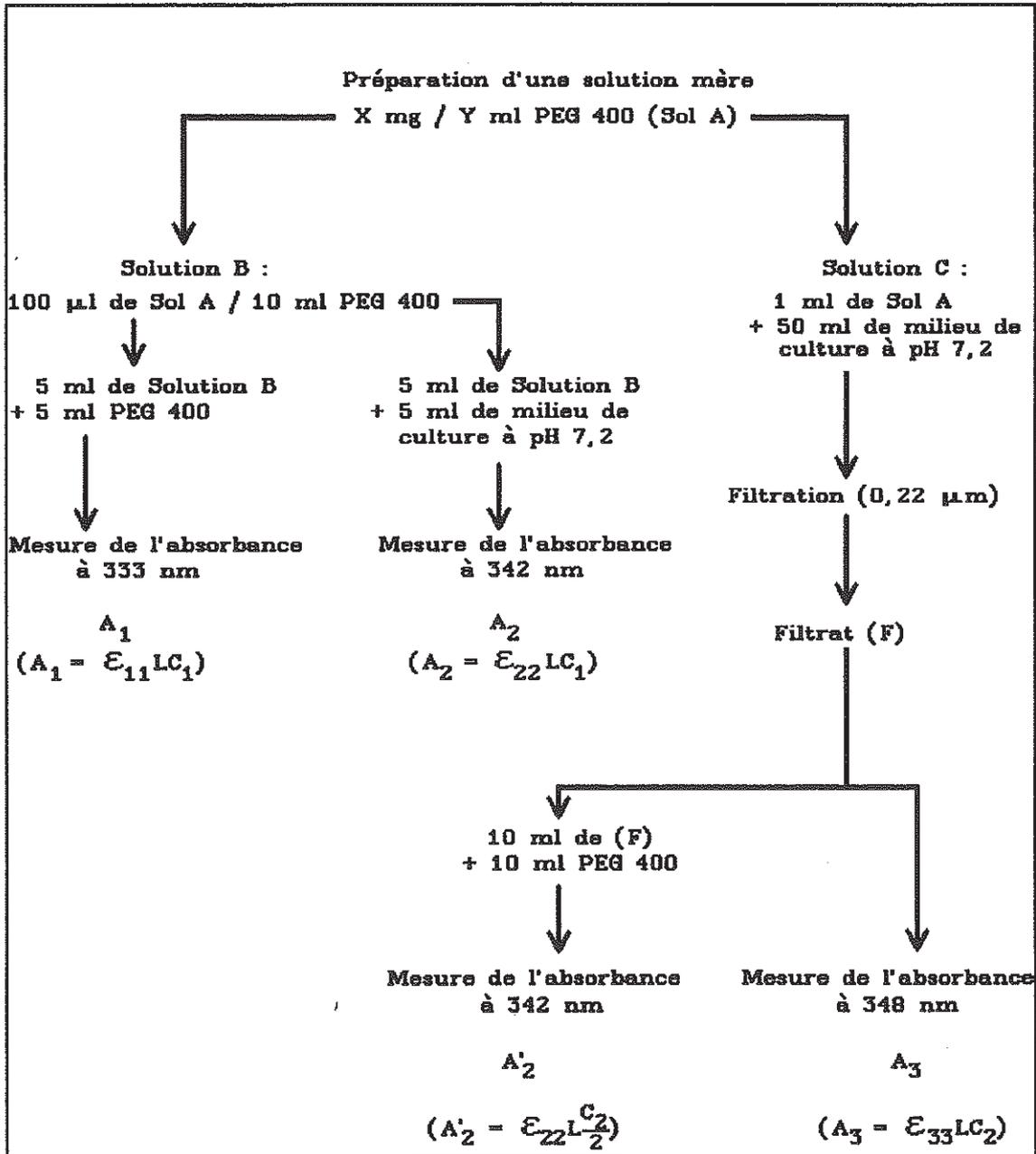
En ce qui concerne le Niclosamide, qui est un acide faible, la méthode utilisée par CLEDAT pour la détermination des  $pK_1$  et des coefficients d'absorption molaire n'a pas pu être utilisée car le Niclosamide précipitait à pH acide. Mais il a été possible de mesurer l'absorbance de la solution à pH 7,2 et nous avons pu estimer le coefficient d'absorption molaire à 330 nm :  $\epsilon = 10.432,2 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

Nous avons alors appliqué la loi de Beer-Lambert pour déterminer la concentration du produit dans le milieu de culture.

La figure 3 montre l'estimation de la concentration du Niclosamide (VIGNOLES, 1990).

Figure 3 : Estimation de la concentration en niclosamide.

Le schéma suivant indique les différentes étapes du protocole.



Une droite étalon a, au préalable, été réalisée sur ce produit dissous dans le PEG 400.  
L'équation de cette droite est :

$$A_1 = \epsilon_{11} LC$$

$A_1$  : absorbance du Niclosamide dans le PEG 400 à 333 nm.  
 $C$  : concentration du Niclosamide dans le PEG 400 (en mol.l<sup>-1</sup>)  
 $\epsilon_{11}$  : coefficient d'absorption molaire en l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 333 nm dans le PEG 400.  
 $L$  : 1 cm

Au moment de la filtration, une partie du produit en émulsion dans le milieu de culture est retenu par la membrane. Or, nous avons remarqué que le Niclosamide ne formait pas d'émulsion lorsque le milieu de culture contenait au moins 50 % de PEG 400. En diluant au demi, avec du PEG 400, le filtrat obtenu, nous pouvons mettre en relation la concentration du produit et l'absorbance de ce même composé dans le milieu de culture filtré.

Pour un filtrat préparé à partir d'une solution mère quelconque de Niclosamide, on a :

$$A = \epsilon_{33} LC$$

A : absorbance mesurée dans le filtrat

C : concentration en Niclosamide inconnue (en mol.l<sup>-1</sup>)

Or, d'après la figure précédente, on a :

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{\epsilon_{11}}{\epsilon_{22}} \quad (\text{constante calculée au cours de l'expérimentation})$$

$$\frac{2A_2'}{A_3} = \frac{\epsilon_{22}}{\epsilon_{33}} \quad (\text{constante calculée au cours de l'expérimentation})$$

d'où :

$$\epsilon_{33} = \epsilon_{22} \frac{A_3}{2A_2'} = \epsilon_{11} \frac{A_2}{A_1} \frac{A_3}{2A_2'}$$

avec :

$\epsilon_{11}$  : coefficient d'absorption molaire du Niclosamide dans le PEG 400 (l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)

$\epsilon_{22}$  : coefficient d'absorption molaire apparent du Niclosamide dans le milieu de culture dilué au ½ avec du PEG 400 (l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)

$\epsilon_{33}$  : coefficient d'absorption molaire apparent du Niclosamide dans le milieu de culture (l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)

$C_1$  : concentration en Niclosamide dans le PEG 400 (cf schéma)

$C_2$  : concentration en Niclosamide dans le filtrat (cf schéma)

Nous négligeons le volume de PEG 400 apporté par la solution A dans la mesure de l'absorbance  $A_2'$ .

Pour doser le Niclosamide à pH 3,5, nous avons ramené le milieu à pH 7,2 avec KOH 1 N avant d'appliquer la méthode décrite ci-dessus. Dans les calculs, nous avons tenu compte de la dilution effectuée.

**CHAPITRE III**  
**RESULTATS**

Nous avons regroupé dans ce chapitre nos résultats expérimentaux.

Dans un premier temps nous précisons certains rappels généraux sur la croissance des euglènes et le mode de calcul des paramètres étudiés.

Dans un deuxième temps, nous allons présenter les valeurs expérimentales de ces paramètres.

## A. COURBE DE CROISSANCE DE L'EUGLENE

La croissance des euglènes peut être modélisée en utilisant une courbe logistique. Cette dernière est une courbe théorique ajustée par régression non linéaire aux points expérimentaux. A l'aide de son équation, il est possible de déterminer le nombre  $N$  de cellules par ml à un instant donné, à partir des nombres observés à des instants différents.

L'équation de cette courbe est :

$$N = \frac{N_{\max}}{1 + \left( \frac{N_{\max}}{N_0} - 1 \right) \cdot \exp(-kt)}$$

$N_0$ : nombre initial de cellules par ml ;  
 $N_{\max}$ : nombre maximum de cellules par ml ;  
 $k$ : taux de croissance maximal exprimé en heures.

La régression non linéaire permet de calculer  $N_{\max}$  et  $k$  pour chaque essai et témoin.

La courbe de croissance théorique de l'euglène est décomposée en 5 phases.

La partie (2 - 5) correspond à la courbe logistique.

A titre d'exemple, nous avons indiqué la courbe de croissance des euglènes à pH 3,5 (figure 4a) et à pH 7,2 (figure 4b).

## B. PARAMETRES ETUDIES

### 1. LE TAUX DE MORTALITE

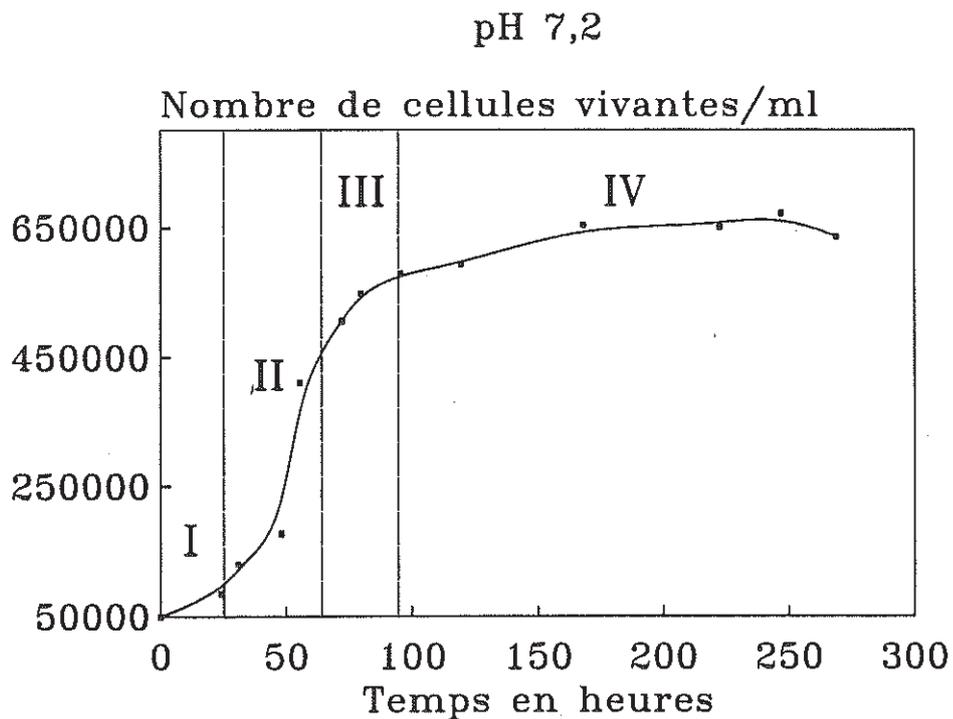
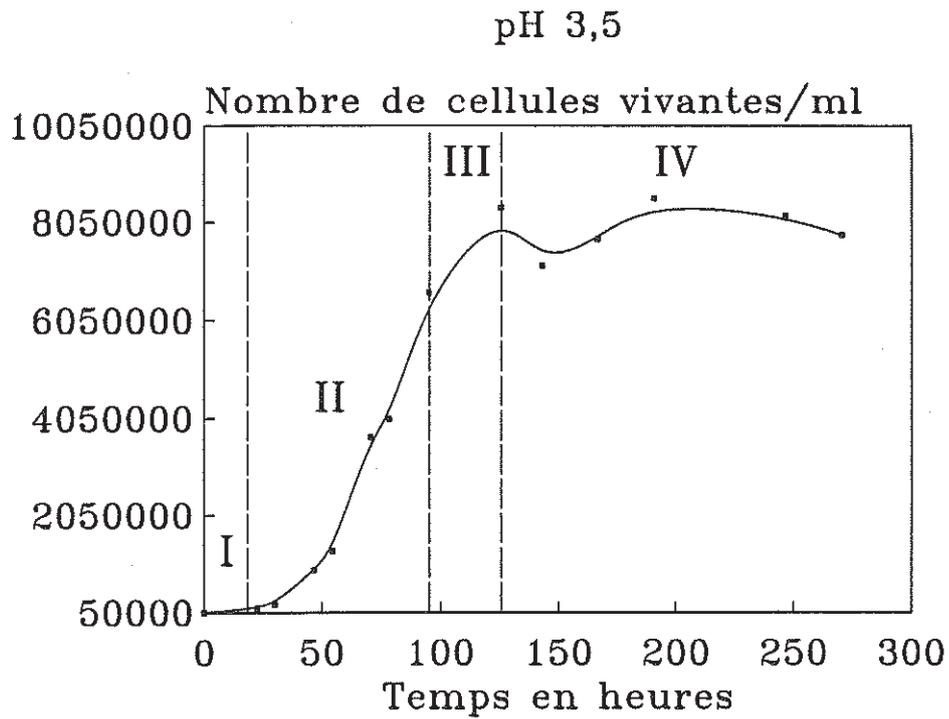
Le nombre de cellules mortes est égal au nombre de cellules colorées par le bleu Trypan.

Le taux de mortalité est calculé en réalisant le rapport entre le nombre de cellules mortes par millilitre dans l'essai à l'instant  $t$  et l'effectif total des cellules par millilitre dans l'essai au même instant.

On multiplie par 100 pour avoir le pourcentage de mortalité.

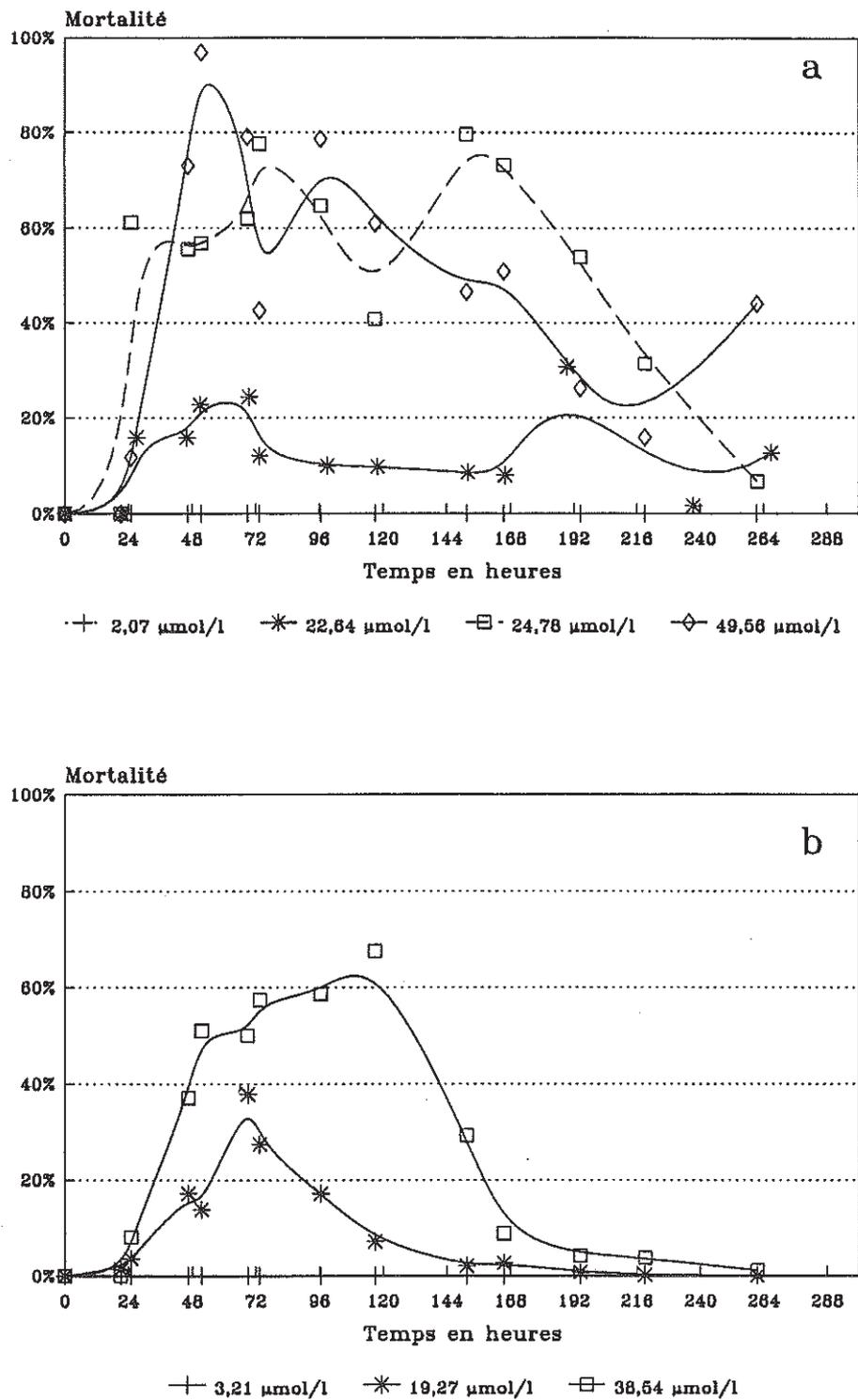
La mortalité des euglènes est précisée sur la figure 5 en fonction de la concentration en fluoro-4 BNT à pH 3,5 et 7,2 :

- la mortalité augmente en fonction de la concentration du produit : 0 % de cellules mortes avec  $2,07 \mu\text{mol.l}^{-1}$  de produit et 90 % avec  $49,56 \mu\text{mol.l}^{-1}$  (à pH 3,5 à la 48<sup>e</sup> heure) ;
- la mortalité, pour une concentration donnée, augmente pendant les premières heures d'expérience (jusqu'à la 48<sup>e</sup> heure à pH 3,5 et pH 7,2) et décroît par la suite ;
- plusieurs phases se reconnaissent lors de la diminution des pourcentages de mortalité :
  - à pH 3,5, on note une phase de décroissance lente pour les faibles concentrations. Cette phase a une durée qui s'accroît lorsque la dose augmente ;
  - la deuxième phase nous montre une chute du pourcentage de mortalité : il passe de 60 % à 10 % entre la 120<sup>e</sup> heure et la 168<sup>e</sup> heure (à pH 7,2 pour une concentration de  $38,54 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) ;



**Figure 4 :** Croissance des euglènes témoins cultivées à pH 3,5 (graphe a) et à pH 7,2 (graphe b) en présence de PEG 400 (concentration inférieure à 4 %), sans produit toxique.

I : phase de latence,	III : phase de ralentissement,
II : phase exponentielle,	IV : phase stationnaire.



**Figure 5** : Evolution du pourcentage de mortalité des euglènes au cours du temps en fonction de la concentration en fluoro-4 BNT à pH 3,5 (graphe a) et pH 7,2 (graphe b).

- lors de la dernière phase nous observons une diminution lente du pourcentage de mortalité qui tend à s'annuler lorsque le temps augmente.

## 2. LA CONCENTRATION LETALE A 50 % : CL<sub>50</sub>

### a. DEFINITION

La concentration létale à 50 % est la concentration de toxique pour laquelle le taux de mortalité des cellules est de 50 %. Ce paramètre est déterminé par régression linéaire sur les valeurs expérimentales comprises entre 5 % et 95 % de mortalité.

On utilise  $pCL_{50} = -\log CL_{50}$  ( $CL_{50}$  en mol.l<sup>-1</sup>).

La figure 6 schématise le calcul de cette valeur.

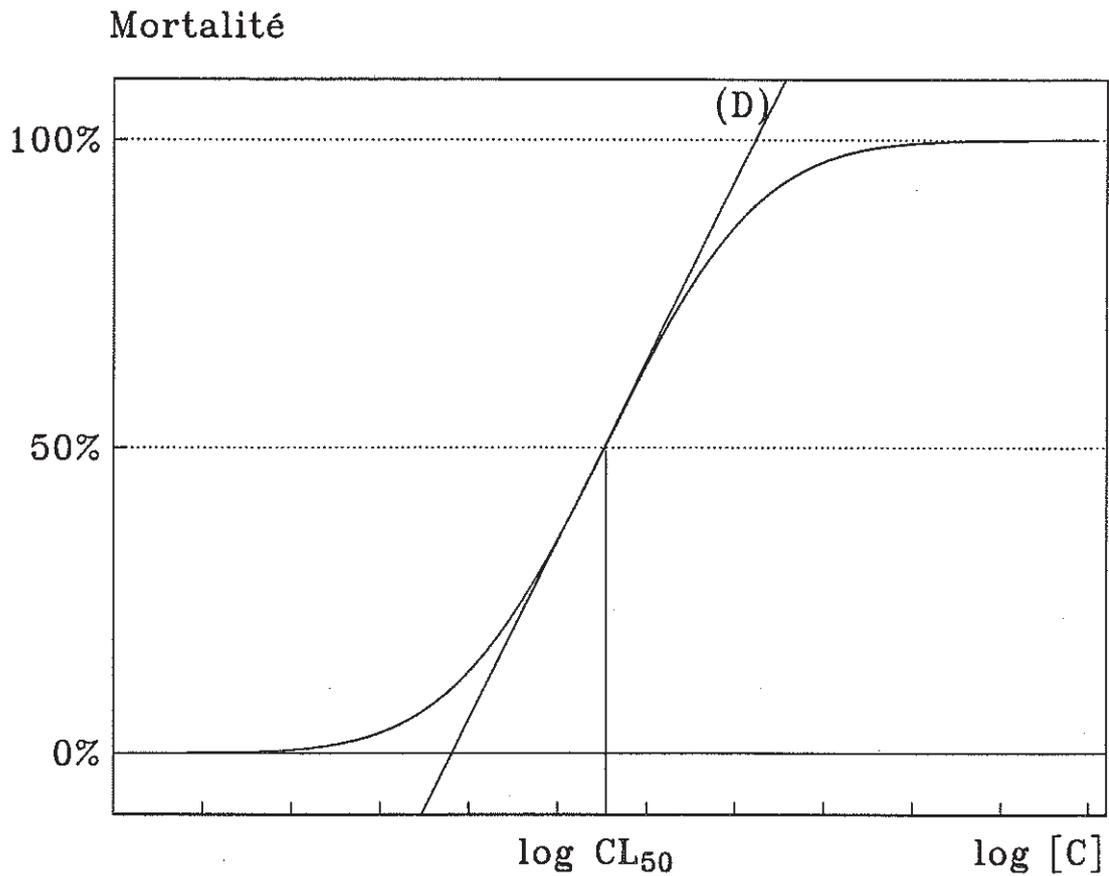
### b. CALCUL MATHEMATIQUE DES CL<sub>50</sub>

On utilise le fait que la partie moyenne de la courbe de mortalité est assimilable à une droite d'équation :  $p = ax + b$  avec  $x = \log [C]$  où C est la concentration de produit présent dans la solution.

Les paramètres a et b sont estimés par la régression linéaire des pourcentages observés  $y(i)$  sur les  $x(i)$ .

$$a = \frac{\sum x(i)y(i) - \frac{\sum x(i) \sum y(i)}{N'}}{\sum x(i)^2 - \frac{(\sum x(i))^2}{N'}}$$

$$b = \frac{1}{N'} [\sum y(i) - a \sum x(i)]$$



**Figure 6** : Schématisation de la détermination de la  $CL_{50}$

$pCL_{50} = -\log CL_{50}$ . La  $CL_{50}$  est la concentration pour laquelle on observe une mortalité égale à 50 %. Ce paramètre est déterminé à partir des résultats expérimentaux par régression linéaire sur les valeurs comprises entre 5 % et 95 % de mortalité.

(D): Représentation de la droite de régression.

où  $N'$  désigne le nombre de points situés dans la partie moyenne de la courbe.

On a alors :  $a.m + b = 0,5$  où  $m = -pCL_{50}$

$$\text{donc } m = \frac{0,5 - b}{a}$$

### 3. MODIFICATION DE LA CROISSANCE

#### a. LE POURCENTAGE DE MODIFICATION

Le pourcentage de modification de la croissance cellulaire à l'instant  $t$  est calculé selon la relation :

$$x(t) = 100 \frac{\log N_E(t) - \log N_{\min}}{\log N_T(t) - \log N_{\min}}$$

$N_E(t)$ : nombre de cellules par ml dans l'essai  
à l'instant  $t$  ;

$N_T(t)$ : nombre de cellules par ml dans le  
témoin au même instant ;

$N_{\min}$ : nombre minimal de cellules par ml  
dans l'essai.

En pratique, nous allons calculer ce pourcentage pour des valeurs de  $t$  égales à 24, 48, 72 et 96 heures. Lorsque les valeurs  $N_E(t)$  et  $N_T(t)$  correspondantes n'ont pas été mesurées, nous les déterminerons par interpolation à partir des courbes de croissance expérimentale. La fonction d'interpolation utilisée est :

- un polynome des moindres carrés dans la phase pré-exponentielle de la courbe ;
- une courbe logistique dans la phase ultérieure (cf III.A).

### b. LA CONCENTRATION INHIBITRICE A 50 % : $CI_{50}$

La  $CI_{50}$  est la concentration pour laquelle on obtient une inhibition de la croissance des algues égale à 50 %. Ce paramètre est déterminé par régression linéaire sur les valeurs expérimentales comprises entre 15 % et 95 % d'inhibition.

On utilise  $pCI_{50} = -\log CI_{50}$  ( $CI_{50}$  en  $\text{mol.l}^{-1}$ ).

### c. LA CONCENTRATION ACTIVATRICE MAXIMALE : $CA_{\max}$

La  $CA_{\max}$  est la concentration pour laquelle on obtient une activation maximale de la croissance. Elle correspond à l'abscisse du maximum de la courbe  $x = f(\log[C])$ .

Nous avons en effet constaté que pour certains composés et à certains temps d'exposition, la croissance des cellules exposées au produit pouvait être plus rapide que celle des cellules témoins.

On utilise  $pCA_{\max} = -\log CA_{\max}$  ( $CA_{\max}$  en  $\text{mol.l}^{-1}$ ).

La figure 7 schématise la détermination des  $CA_{\max}$  et  $CI_{50}$ .

## C. RESULTATS EXPERIMENTAUX

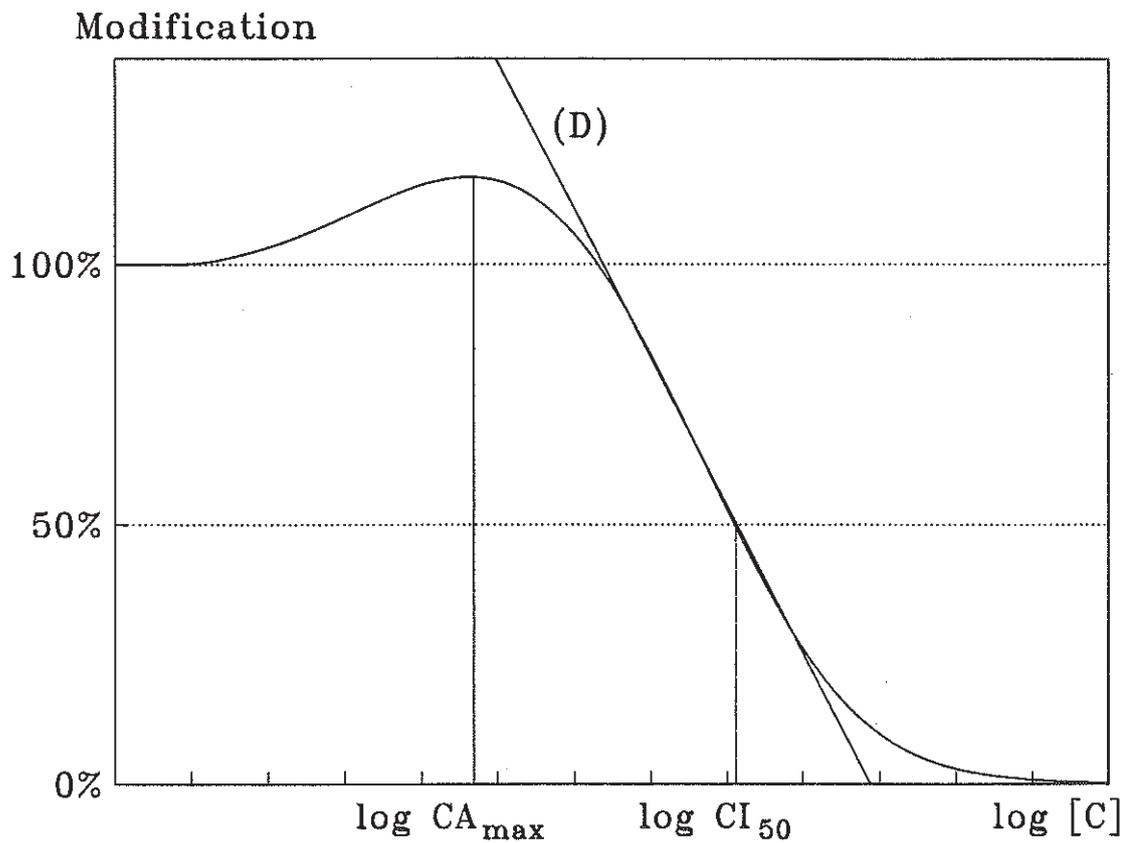
### 1. INFLUENCE DE LA DOSE

#### a. $CL_{50}$

Les résultats expérimentaux sont présentés dans le tableau 3.

La lecture de ce tableau permet de constater les points suivants :

- les produits les plus toxiques à pH 3,5 sont bisubstitués et possèdent des  $pCL_{50}$  supérieures à 5 au cours de l'expérience. A pH 7,2 le produit le plus efficace est le dichloro-3,4 BNT : il possède des  $pCL_{50}$  supérieures à 5 jusqu'à la 48<sup>e</sup> heure ;



**Figure 7:** Détermination des  $CA_{max}$  et  $CI_{50}$  pour les euglènes.

$pCA_{max}$  :  $-\log CA_{max}$ . La  $CA_{max}$  est la concentration pour laquelle on obtient une activation maximale de la croissance.

$pCI_{50}$  :  $-\log CI_{50}$ . La  $CI_{50}$  est la concentration pour laquelle on obtient une inhibition de la croissance des algues égale à 50 %.

(D) : Droite de régression.

Produits	pH 3,5				pH 7,2			
	Temps d'exposition (en h)				Temps d'exposition (en h)			
	24	48	72	96	24	48	72	96
BNT	4,84	4,85	4,85	4,85	4,70	4,55	4,30	4,01
Dichloro-3,4 BNT	5,49	5,37	5,28	5,23	5,66	5,11	3,81	< 3
Dichloro-3,5 BNT	5,71	5,95	6,03	5,98	2,40	2,97	3,71	3,97
Fluoro-2 BNT	4,56	4,15	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4
Fluoro-4 BNT	3,09	3,83	4,01	3,97	3,61	4,35	4,52	4,48
Niclosamide	5,29	5,31	5,31	5,31	5,13	4,97	4,71	4,37

**Tableau 3** : Valeurs des  $pCL_{50}$  obtenues sur *E. gracilis* pour chaque produit étudié en fonction du temps de l'expérience et du pH.

$pCL_{50}$  :  $-\log CL_{50}$  ( $CL_{50}$  en  $\text{mol.l}^{-1}$ ).

- les produits les moins toxiques à pH 3,5 sont le fluoro-2 BNT et le fluoro-4 BNT : ils ont des  $pCL_{50}$  voisines de 4. A pH 7,2 le dichloro-3,5 BNT et le fluoro-2 BNT sont les moins efficaces ;
- à pH 3,5 le dichloro-3,5 BNT a une toxicité supérieure à celle du Niclosamide. Jusqu'à la 48<sup>e</sup> heure le dichloro-3,4 BNT a également une toxicité supérieure à celle du Niclosamide.

Les  $pCL_{50}$  du BNT et du Niclosamide sont relativement constantes au cours du temps.

#### b. $CI_{50}$

Les résultats expérimentaux sont présentés dans le tableau 4.

La lecture de ce tableau permet de constater les points suivants :

- les dérivés inhibant le plus les euglènes sont le dichloro-3,4 BNT et le dichloro-3,5 BNT : ils ont des  $pCI_{50}$  supérieures à 5. A pH 7,2 seul le dichloro-3,4 BNT possède un effet inhibiteur marqué : il a aussi des  $pCI_{50}$  supérieures à 5 ;
- l'accroissement de l'inhibition au cours du temps est constaté pour le dichloro-3,5 BNT à pH 7,2 et le fluoro-4 BNT à pH 3,5 ;
- le Niclosamide a un effet inhibiteur marqué car les valeurs des  $pCI_{50}$  sont supérieures à 5. Cet effet inhibiteur à pH 3,5 est plus élevé que ceux du fluoro-2 BNT et du fluoro-4 BNT. Il est inférieur à celui du dichloro-3,5 BNT. A pH 7,2 seul l'effet inhibiteur du dichloro-3,4 BNT dépasse celui du Niclosamide ;
- par rapport au BNT seuls les dichloro-3,4 BNT et dichloro-3,5 BNT ont une activité inhibitrice supérieure.

#### c. $CA_{max}$

Les résultats expérimentaux sont présentés dans le tableau 5.

D'après ce tableau nous constatons :

Produits	pH 3,5				pH 7,2			
	Temps d'exposition (en h)				Temps d'exposition (en h)			
	24	48	72	96	24	48	72	96
BNT	4,96	5,00	5,00	5,00	4,68	4,74	4,66	4,30
Dichloro-3,4 BNT	5,33	5,32	5,05	4,29	5,26	5,51	5,42	5,35
Dichloro-3,5 BNT	5,17	5,61	5,87	5,75	3,94	4,61	4,72	4,77
Fluoro-2 BNT	3,83	4,22	4,00	3,95	3,98	4,15	4,11	3,98
Fluoro-4 BNT	3,39	4,46	4,68	4,73	3,27	4,08	4,40	4,42
Niclosamide	5,14	5,38	5,37	5,37	5,21	5,14	5,07	4,95

**Tableau 4 :** Valeurs des  $pCI_{50}$  obtenues pour les euglènes en fonction de la durée de l'expérience et du pH.

$pCI_{50}$  :  $-\log CI_{50}$  ;  $CI_{50}$  en  $\text{mol.l}^{-1}$

Produits	pH 3,5				pH 7,2			
	Temps d'exposition (en h)				Temps d'exposition (en h)			
	24	48	72	96	24	48	72	96
BNT	5,63	5,62	5,60	5,59	5,98	5,85	5,58	5,62
Dichloro-3,4 BNT	6,81	6,72	6,62	6,35	6,81	6,68	6,51	6,43
Dichloro-3,5 BNT	6,48	6,76	7,11	6,76	5,86	5,87	5,85	5,82
Fluoro-2 BNT	6,09	5,24	5,16	4,94	*	*	5,15	4,99
Fluoro-4 BNT	6,05	6,04	5,74	5,67	5,85	5,98	5,68	5,38
Niclosamide	6,12	6,04	6,11	6,04	6,66	6,55	6,71	6,01

**Tableau 5 :** Valeurs des  $pCA_{\max}$  obtenues pour les euglènes en fonction de la durée de l'expérience et du pH.

$pCA_{\max}$  :  $-\log CA_{\max}$  ;  $CA_{\max}$  en  $\text{mol.l}^{-1}$

\* : absence d'activation.

- les  $pCA_{max}$  du dichloro-3,4 BNT et du fluoro-2 BNT diminuent au cours du temps quel que soit le pH. Cette diminution s'observe à l'un des pH pour le BNT (pH 3,5), le dichloro-3,5 BNT (pH 7,2) et le fluoro-4 BNT (pH 3,5) ;
- les  $pCA_{max}$  du dichloro-3,4 BNT sont les seules à être supérieures à celle du Niclosamide pour les deux pH. A pH 3,5 il faut ajouter en plus celle du dichloro-3,5 BNT ;
- les  $pCA_{max}$  de tous les produits sont supérieures à celles du BNT aux deux pH.

## 2. INFLUENCE DU TEMPS

Les valeurs de  $pCL_{50}$  et  $pCI_{50}$  ont été traitées par régression polynomiale. Pour chaque produit, nous avons effectué la régression sur 16 valeurs.

Les équations des courbes sont les suivantes :

$$\begin{aligned}
 pCL_{50} &= A + B \log(t) + C [\log(t)]^2 & pCL_{50} &= -\log CL_{50} ; CL_{50} \text{ en mol.l}^{-1} \\
 pCI_{50} &= A + B \log(t) + C [\log(t)]^2 & pCI_{50} &= -\log CI_{50} ; CI_{50} \text{ en mol.l}^{-1} \\
 & & t &: \text{ temps d'exposition en heures} \\
 & & A, B \text{ et } C &: \text{ coefficients de régression.}
 \end{aligned}$$

### a. INHIBITION DE LA CROISSANCE

Les valeurs des paramètres A, B et C sont présentées dans le tableau 6. Ce tableau contient également le coefficient de corrélation r, l'écart-type résiduel s, les valeurs du rapport  $F^1$  de Snédécour et le niveau de signification de l'ajustement pour chaque produit étudié.

D'après les résultats obtenus, il est possible de constater que le paramètre C est toujours inférieur à 1 %.

Pour le dichloro-3,5 BNT, le fluoro-2 BNT et le fluoro-4 BNT, le paramètre A est toujours négatif quel que soit le pH.

---

<sup>1</sup>.  $F$  : rapport de la variance expliquée à la variance résiduelle

	A	B	C	r	s	F	Signification
pH 3,5							
BNT	3,78	1,43	-0,14	1	0,01	759,45	< 1 %
Dichloro-3,4 BNT	2,63	4,68	-1,89	0,85	0,23	13,98	< 1 %
Dichloro-3,5 BNT	-3,16	9,13	-2,32	0,98	0,08	128,99	< 1 %
Fluoro-2 BNT	-1,76	7,65	-2,45	0,97	0,03	60,55	< 1 %
Fluoro-4 BNT	-14,60	20,54	-5,46	1	0,06	642,45	< 1 %
Niclosamide	2,07	3,55	-0,95	0,99	0,04	358,31	< 1 %
pH 7,2							
BNT	2,23	3,16	-1,00	0,99	0,03	273,63	< 1 %
Dichloro-3,4 BNT	0,95	5,30	-1,55	0,98	0,07	165,83	< 1 %
Dichloro-3,5 BNT	-4,94	9,85	-2,49	1	0,04	1682,60	< 1 %
Fluoro-2 BNT	-6,74	13,39	-4,06	0,97	0,21	102,47	< 1 %
Fluoro-4 BNT	-2,29	5,29	-0,92	0,99	0,15	275,04	< 1 %
Niclosamide	5,08	0,45	-0,25	0,98	0,02	174,98	< 1 %

**Tableau 6 :** Caractéristiques de la courbe d'équation  $pCI_{50} = A + B \log t + C (\log t)^2$  calculée par régression polynômiale.

Le coefficient de corrélation est toujours voisin ou égal à 1.

#### b. MORTALITE DES CELLULES

Le tableau 7 regroupe les valeurs des paramètres A, B et C, ainsi que les valeurs de r, s, et F.

Comme précédemment, il est possible de remarquer que le paramètre C est toujours négatif et le niveau de signification toujours inférieur à 1 %.

A pH 3,5, les valeurs des paramètres A, B et C pour le BNT et le Niclosamide sont pratiquement identiques.

A pH 7,2, le paramètre A est négatif pour tous les produits sauf pour le Niclosamide.

Ces valeurs n'ont pas été calculées pour le fluoro-2 BNT en raison de l'absence de mortalité avec ce produit à pH 7,2.

	A	B	C	r	s	F	Signification
pH 3,5							
BNT	4,59	0,29	-0,08	1	0,00	4835,20	< 1 %
Dichloro-3,4 BNT	1,24	5,15	-1,59	0,97	0,04	69,05	< 1 %
Dichloro-3,5 BNT	1,67	4,54	-1,19	0,98	0,02	152,48	< 1 %
Fluoro-2 BNT	1,27	5,21	-2,10	0,98	0,04	44,71	< 1 %
Fluoro-4 BNT	-5,86	10,07	-2,57	1	0,04	1504,50	< 1 %
Niclosamide	5,00	0,34	-0,09	1	0,00	1638,08	< 1 %
pH 7,2							
BNT	-1,38	8,26	-2,80	0,99	0,05	347,83	< 1 %
Dichloro-3,4 BNT	-23,46	41,09	-14,34	0,96	0,48	64,47	< 1 %
Dichloro-3,5 BNT	-1,44	2,73	0	0,99	0,10	752,62	< 1 %
Fluoro-2 BNT*	-	-	-	-	-	-	-
Fluoro-4 BNT	-7,44	12,68	-3,36	0,99	0,03	355,73	< 1 %
Niclosamide	3,03	3,47	-1,39	0,99	0,04	297,28	< 1 %

\*. Les valeurs n'ont pas été calculées en raison de l'absence de mortalité avec ce produit.

**Tableau 7** : Caractéristiques de la courbe d'équation  $pCL_{50} = A + B \log t + C (\log t)^2$  calculée par régression polynômiale.

CHAPITRE IV  
DISCUSSION

## A. CONDITIONS D'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ

### 1. INCONVENIENTS DE LA MÉTHODE UTILISÉE

Pour évaluer la toxicité des dérivés du BNT sur *E. gracilis*, nous avons employé une technique facilement réalisable.

Néanmoins, à l'usage, cette méthode a présenté certains inconvénients :

- le comptage des cellules se fait par microscope optique sur cellules de Malassez. Il aurait pu être rendu plus facile par l'utilisation de compteur de cellules (Coulter Counter®) mais cela aurait nécessité des quantités de solutions plus importantes. Et le comptage des cellules mortes aurait nécessité quoi qu'il en soit une numération sur cellule de Malassez et une coloration au bleu Trypan ;
- le milieu de culture utilisé (milieu de Schiff) respecte les exigences normales des euglènes. Mais la croissance est limitée par l'épuisement simultané des trois constituants principaux (carbone, azote, phosphore) (ROUX, 1984) jusqu'à la limite moyenne de  $7,5 \cdot 10^6$  cellules par millilitre de culture ;
- il a été difficile d'obtenir les concentrations désirées en raison du problème de la précipitation du produit dans le milieu. Nous avons constaté que les dérivés du BNT précipitent plus en milieu acide qu'en milieu neutre.

## 2. NECESSITE DE DEUX pH

Nous avons évalué la toxicité des dérivés du BNT à pH 3,5 et à pH 7,2. Nous avons choisi d'effectuer ces deux essais car les dérivés du BNT sont des bases faibles.

La figure 8 montre la protonation de ces produits en fonction du pH.

La délocalisation de la charge positive va augmenter la lipophilie de la molécule chargée. Donc nous allons observer une différence de toxicité en fonction du pH.

A pH 3,5 ces molécules sont légèrement plus toxiques. Or les ions chargés diffusent sélectivement à travers les membranes cellulaires du fait d'une diminution de l'hydrophilie. D'autre part, nous pouvons noter également la formation de paires d'ions entre la forme protonée du BNT et les phosphates chargés négativement des phospholipides membranaires.

Nous avons donc expérimenté ces produits à pH 3,5 car le milieu acide est intéressant pour mettre en évidence l'activité biologique de la forme conjuguée de la molécule (le pH 3,5 est inférieur au  $pK_a$  des produits étudiés). La forme majoritaire est la molécule protonée.

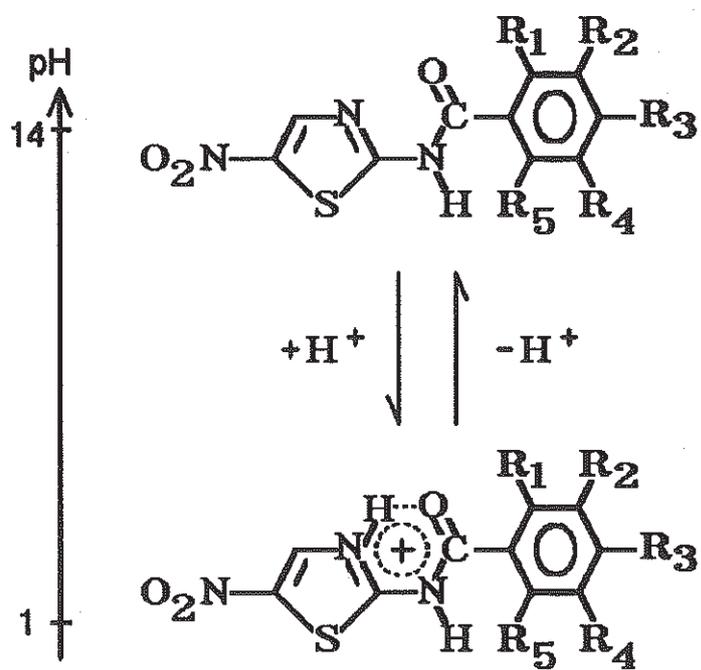
Nous avons également effectué des tests à pH 7,2 car ce pH est proche de celui du milieu biologique. A ce pH, les dérivés du BNT sont sous leur forme neutre.

## 3. INFLUENCE DU SOLVANT

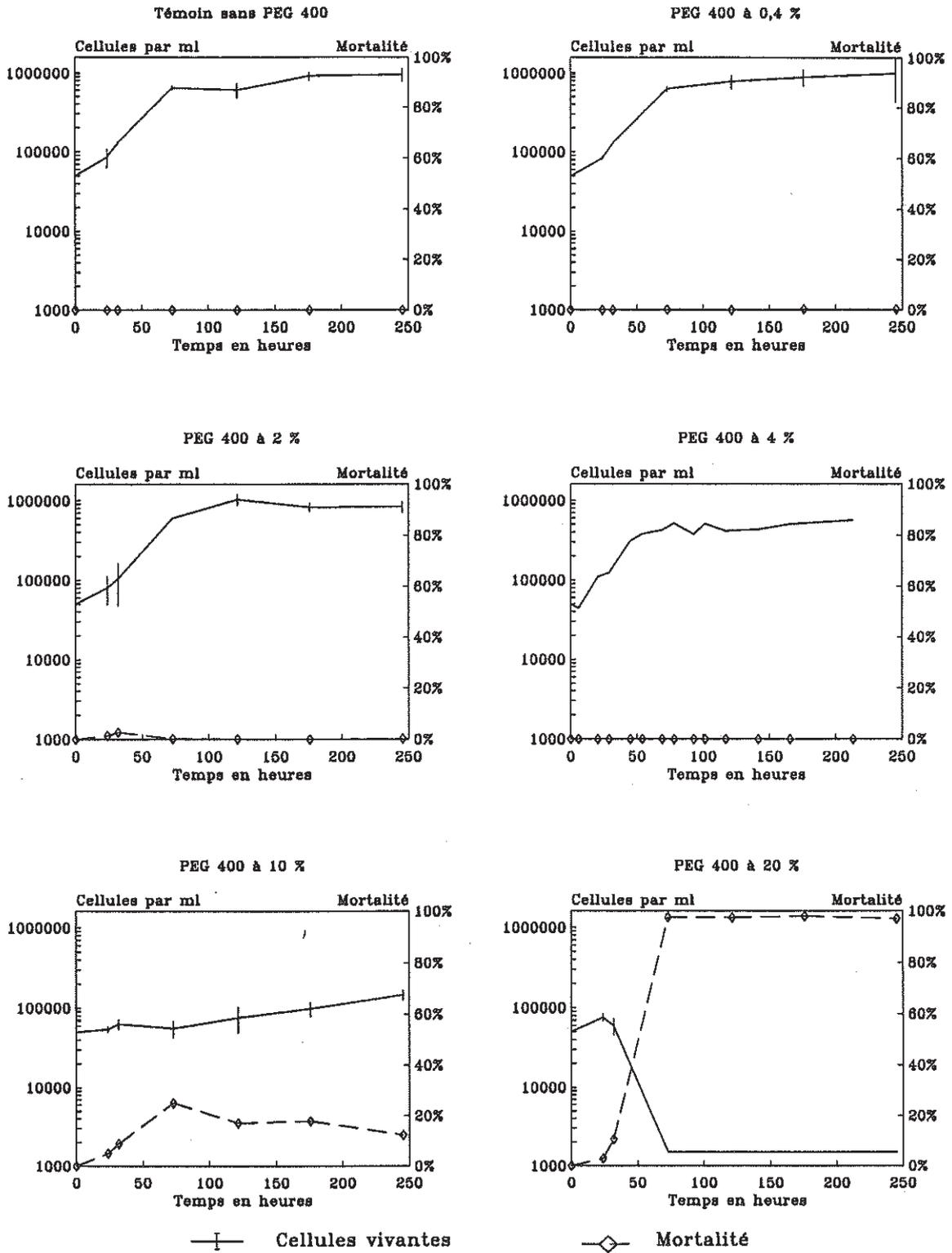
Dans le cadre de notre étude, le milieu de culture utilisé pour la croissance des euglènes contient une certaine concentration de PEG 400. Les dérivés du BNT sont des agents lipophiles qui sont dissous dans ce solvant.

Il est alors intéressant de savoir si ce produit intervient sur le développement des algues. Une expérience réalisée par VIGNOLES nous a permis de vérifier ce fait.

La figure 9 regroupe 6 graphes représentant des courbes de croissance d'euglènes cultivées à pH 7,2. Le premier (graphe a) correspond au développement d'une colonie cultivée sur un milieu sans PEG. Les suivants (graphe b à f) se rapportent à la croissance des algues en présence de dilutions croissantes de PEG 400 (respectivement égales à 0,4 %, 2 %, 4 %, 10 % et 20 %).



**Figure 8** : Protonation des dérivés du BNT en fonction du pH.



**Figure 9** : Evolution de la croissance et de la mortalité chez les euglènes en fonction du temps : sans PEG 400 (graphe a) et avec différentes concentrations de solvant (graphes b à f). Les valeurs moyennes sont indiquées avec les écarts-types correspondants.  
 La croissance est exprimée par le nombre de cellules vivantes par ml.

Nous nous sommes aperçus que les dilutions 0,4 % et 2 % n'ont pas d'influence sur le développement des euglènes : leur croissance est équivalente à celle des témoins (cultures effectuées sans PEG 400) et le nombre de cellules mortes est faible ou nul (graphe b et c).

Nous notons une croissance légèrement ralentie lorsque le milieu de culture contient 4 % de solvant : le nombre maximal de cellules vivantes en phase stationnaire est plus faible que dans le cas des algues témoins. De plus, le nombre de cellules mortes est voisin de zéro (graphe d).

Pour des dilutions comprises entre 4 % et 10 %, nous observons un effet cytostatique (inhibition de la croissance cellulaire sans augmentation de la mortalité) et une augmentation de l'effet cytotoxique : il y a diminution de la croissance des euglènes et augmentation du nombre de cellules mortes (graphe d et e).

Lorsque la dilution est supérieure à 10 %, nous notons essentiellement un effet cytotoxique : le pourcentage de mortalité est très élevé (voisin de 100 %) (graphe f).

D'après ces résultats, nous pouvons conclure à une absence d'effet lorsque la proportion de PEG 400 dans le milieu de culture est inférieure à 4 %.

Dans notre étude, nous avons toujours utilisé une dilution de solvant inférieure à cette valeur.

## B. DETERMINATION DU PRODUIT LE PLUS ACTIF

La comparaison des  $pCL_{50}$  des produits étudiés à celles du Niclosamide et du BNT va nous permettre de déterminer le produit le plus actif.

### 1. COMPARAISON AVEC LE NICLOSAMIDE

Les  $pCL_{50}$  du dichloro-3,4 BNT sont supérieures à celles du Niclosamide à pH 3,5 (5,49 pour le dichloro-3,4 BNT et 5,29 pour le Niclosamide à la 24<sup>e</sup> heure d'intoxication). A pH 7,2, les  $pCL_{50}$  du dichloro-3,4 BNT sont plus élevées que celles du Niclosamide à la 24<sup>e</sup> et 48<sup>e</sup> heures.

Pour le dichloro-3,5 BNT, nous remarquons qu'à pH 3,5 le Niclosamide a des  $pCL_{50}$  inférieures (5,29 pour le Niclosamide et 5,71 pour le dichloro-3,5 BNT à la 24<sup>e</sup> heure). Mais à pH 7,2, le dichloro-3,5 BNT est beaucoup moins toxique que le Niclosamide (5,13 pour le Niclosamide et 2,40 pour le dichloro-3,5 BNT à la 24<sup>e</sup> heure).

Aux deux pH, le Niclosamide a des  $pCL_{50}$  supérieures à celles du fluoro-2 BNT ainsi qu'à celles du fluoro-4 BNT.

## 2. COMPARAISON AVEC LE BNT

Aux deux pH, le dichloro-3,4 BNT a des  $pCL_{50}$  plus élevées que celles du BNT.

Le dichloro-3,5 BNT est plus toxique que le BNT à pH 3,5 (5,71 pour le dichloro-3,5 BNT et 4,84 pour le BNT à la 24<sup>e</sup> heure d'intoxication). A pH 7,2, ses  $pCL_{50}$  sont inférieures à celles du BNT (2,40 pour le dichloro-3,5 BNT et 4,70 pour le BNT à la 24<sup>e</sup> heure).

Le fluoro-2 BNT ainsi que le fluoro-4 BNT sont moins toxiques pour les euglènes que le BNT.

## 3. CONCLUSION

D'après ces résultats, nous pouvons dire que les produits les plus toxiques parmi ceux étudiés sont le dichloro-3,4 BNT aux deux pH et le dichloro-3,5 BNT à pH 3,5.

Les formes conjuguées des dérivés bisubstitués du BNT sont plus toxiques que celles du Niclosamide.

Sur une échelle de toxicité, le BNT se situe en une position moyenne: la présence de substituants pouvant augmenter ou diminuer la toxicité de ce produit suivant leur position sur le cycle benzénique.

La substitution du cycle benzénique du BNT par les atomes de chlore augmente les propriétés toxiques de ce dernier (MADULO-LEBLOND *et al.*, 1981).

Enfin, la substitution du cycle benzénique en position meta augmente l'efficacité des produits dans la plupart des cas. C'est, en effet, ce qui se passe pour le dichloro-3,4 BNT et le dichloro-3,5 BNT.

### C. PROBLEME DE LA CONCENTRATION ACTIVATRICE

Les produits étudiés sont des molluscicides pouvant être utilisés pour lutter contre les mollusques vecteurs de parasitoses. Des études effectuées sur les limnées apportent la preuve de cette action (VIGNOLES *et al.*, 1990 a).

Cependant, nous nous sommes aperçus que certains produits provoquaient une activation de la croissance des euglènes : la croissance des algues intoxiquées est plus importante que celles des algues témoins.

Le tableau 8 montre la comparaison entre les valeurs des  $pCL_{50}$  des limnées et des gammarès, et les valeurs des  $pCA_{max}$  obtenues pour les euglènes à pH 7,2.

Pour les euglènes, nous avons obtenu des valeurs de  $pCA_{max}$  inférieures aux  $pCL_{50}$  des limnées et des gammarès.

Aux doses létales utilisées pour les deux espèces animales, ces produits n'inhibent donc pas la croissance et induisent une faible mortalité des euglènes.

Il faut signaler ce fait car l'épandage de ces produits aux doses molluscicides, permettrait de limiter la croissance des limnées et de la faune associée. Mais cela pourrait entraîner une prolifération microbienne et donc une contamination du milieu.

### D. CORRELATION AVEC LES LIMNEES

En tenant compte de l'activité molluscicide sur les euglènes de douze dérivés du BNT et de celle obtenue sur *Lymnaea peregra ovata* Müller avec les mêmes produits (VIGNOLES, 1990), nous avons cherché l'existence d'une corrélation entre les résultats de l'intoxication des euglènes et ceux des limnées.

Nous avons envisagé la relation :

$$pCI_{50} (E) = A + B.pCL_{50} (L)$$

$$pCI_{50} (E) = pCI_{50} \text{ pour les euglènes à pH 7,2.}$$

$$pCL_{50} (L) = pCL_{50} \text{ pour les limnées.}$$

	pCL <sub>50</sub> Limnées				pCL <sub>50</sub> Gammare				pCA <sub>max</sub> Euglènes			
	Temps d'exposition en heures				Temps d'exposition en heures				Temps d'exposition en heures			
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
BNT	< 5	5,69	6,16	6,92	5,68	5,77	5,81	5,86	5,98	5,85	5,58	5,66
Dichloro-3,4 BNT	6,37	6,76	7,10	7,32	6,48	6,53	6,57	6,60	6,81	6,68	6,51	6,43
Dichloro-3,5 BNT	6,27	6,73	7,00	7,34	6,42	6,51	6,54	6,55	5,86	5,87	5,85	5,82
Fluoro-2 BNT	5,05	5,45	5,72	6,02	5,38	5,48	5,54	5,61	*	*	5,15	4,99
Fluoro-4 BNT	5,45	5,57	5,93	6,00	5,64	5,70	5,76	5,79	5,85	5,98	5,68	5,39
Niclosamide	6,60	6,80	6,91	6,99	5,33	5,49	5,69	5,83	6,61	6,55	6,71	6,01

**Tableau 8 :** Comparaison entre les valeurs des pCL<sub>50</sub> des limnées et des gammare, et les valeurs des pCA<sub>max</sub> obtenues pour les euglènes.

\* : absence d'activation.

Le tableau suivant regroupe les valeurs de l'ordonnée à l'origine (A), de la pente (B), du coefficient de corrélation (r), de l'écart-type résiduel (s) et du rapport de variances (F) à la 48<sup>e</sup> heure et à la 72<sup>e</sup> heure.

	A	B	r	s	F	Significativité
48 <sup>e</sup> heure	-1,30 ± 0,50	0,98 ± 0,08	0,97	0,15	136,11	< 1 %
72 <sup>e</sup> heure	-1,61 ± 0,51	0,99 ± 0,08	0,97	0,15	146,87	< 1 %

Ces résultats de la régression montrent que l'on peut ainsi rapprocher l'inhibition de la croissance des euglènes de la toxicité pour les limnées.

Nous pouvons donc envisager la possibilité d'étudier l'intoxication des euglènes in vitro et ensuite d'estimer par extrapolation la toxicité de ces produits sur les limnées.

Ceci est intéressant du fait que le développement des limnées n'est pas toujours évident car il dépend des conditions climatiques donc une étude sur ces mollusques peut être contraignante. Tandis que la culture des euglènes in vitro est aisée.

#### E. LE MOLLUSCICIDE IDEAL : (GAYRAL et CAVIER, 1977 ; LEVEQUE, 1990)

Actuellement, il n'existe pas de molluscicides spécifiques, c'est-à-dire seulement actifs sur une ou plusieurs espèces de mollusques. De plus, tous sont plus ou moins toxiques sur d'autres espèces animales et végétales.

Le molluscicide idéal doit présenter différentes caractéristiques :

- un bon molluscicide doit être actif à faible concentration sur tous les stades de mollusques, sur les différentes espèces d'hôtes intermédiaires de parasites de l'homme et des animaux domestiques ;
- il ne doit pas être dangereux pour l'environnement à savoir pour les poissons, les mammifères et les végétaux, ni donner de résidus toxiques dans les cultures ;

- la stabilité est un problème majeur: un molluscicide devra être stable dans l'eau, ne pas se dégrader à la lumière solaire intense, ne pas avoir une activité différente selon le pH de l'eau, les sels dissous et surtout selon les boues et les matières organiques ;
- les derniers facteurs concernent l'épandage : la formulation retenue du molluscicide devra être facile à épandre, bien se disperser, ne devra pas boucher les pulvérisateurs, ni être irritant ou toxique par inhalation ou manipulation ;
- enfin, il devra être bon marché et le coût de l'épandage devra être limité.

Notre étude sur quelques dérivés du BNT nous conduit à dire que ce sont de bons molluscicides. Ces produits sont toxiques pour les limnées (VIGNOLES, 1990). En outre, ces molécules ne sont pas toxiques sur l'euglène aux doses utilisées pour avoir des effets molluscicides.

Ces produits remplissent donc les conditions nécessaires pour être des molluscicides intéressants :

- ils sont totalement efficaces contre la cible ;
- ils ne sont pas toxiques pour l'homme ;
- ils ne donnent pas de produits de dégradation rémanents ;
- ils n'ont pas d'impact sur les poissons.

## CONCLUSION

Actuellement, peu de molluscicides sont commercialisés. Ils présentent des effets indésirables et, de plus, ne sont pas très économiques à l'emploi. Il est donc important de trouver des produits aussi efficaces, moins toxiques sur la faune et la flore, plus simples d'emploi et d'un faible prix de revient.

Le but de notre travail était de démontrer que les dérivés du BNT, bons molluscicides reconnus (CAVIER *et al.*, 1978), sont peu toxiques sur la faune et la flore associées. En ce qui concerne la faune, des recherches ont été effectuées sur les gammarès, petits crustacés d'eau douce (VIGNOLES, 1990).

Nous avons choisi pour notre étude un modèle végétal : *E. gracilis*, une algue verte unicellulaire qui présente l'avantage d'être sensible aux pesticides en général. Sa culture au laboratoire, ne présentant aucune difficulté, nous a permis d'obtenir des populations homogènes ayant une courbe de croissance reproductible.

Cette étude a porté sur quatre produits :

- dichloro-3,4 BNT ;
- dichloro-3,5 BNT ;
- fluoro-2 BNT ;
- fluoro-4 BNT.

Les résultats obtenus démontrent que ces molécules, aux doses utilisées pour avoir des effets molluscicides, ne sont pas toxiques pour l'euglène.

Ainsi, les meilleurs dérivés du BNT pourraient être proposés dans le contrôle de la transmission des parasitoses ayant les mollusques comme hôtes intermédiaires.

De plus, ces produits sont d'une synthèse simple et donc d'un faible prix de revient.

Notre étude s'intègre dans un travail dont le but est de démontrer que les dérivés du BNT n'ont pas d'impact négatif sur la faune et la flore associées, ce qui écarte tout risque d'un déséquilibre des écosystèmes dans les conditions normales d'application de ces produits. Cela implique que l'abondance des espèces non cibles ne devrait pas subir de modifications majeures et irréversibles.

## BIBLIOGRAPHIE

- BARBOSA F.S., COSTA D.P., 1981  
A long term schistosomiasis control project with molluscicide in a rural area of Brazil.  
*Ann. Trop. Med. Parasitol.* 75 41-52.
- BAYER  
Bayluscide® : molluscicide for the control of freshwater snails, vectors of bilharziosis.  
7 pages.
- BERTAUX O., 1976.  
Etude métabolique et cytologique d'*Euglena gracilis* Z synchrone. Rôle de la vitamine B12 dans le contrôle de la division cellulaire.  
Thèse Doct. Univ. PARIS VI. Sci. Nat. 143 pages.
- BONALY J., BARIAUD A., DELCOURT A., MESTRE J.C., 1978.  
Les effets des ions Cd<sup>2+</sup> sur les cellules d'*Euglena gracilis* L : cytotoxicité et acquisition d'une résistance.  
*Cytophysiol. Veg.* CR Acad. Sc. PARIS. 287 Série D. 463-466.
- BRE M.H., 1982.  
La carence en vitamine B12 chez *Euglena gracilis* Z et le blocage du cycle cellulaire.  
Thèse Doct. Univ. PARIS-SUD Centre d'Orsay. Sci. Nat. 177 Pages.
- CAVIER R., GAYRAL P., GUILLAUMEL J., CLAVEL J.M., DEMERSEMAN P., ROYER R., 1978.  
Recherche sur les dérivés nitrés d'intérêts biologiques. XVI. Relations entre structures et activités protozoocides, anthelminthiques et molluscicides dans la série du benzamido-2 nitro-5 thiazole.  
*Eur. J. Med. Chem.* 13 539-543.
- CLEDAT D., 1989.  
Influence de la structure sur la basicité, la lipophilie et la stabilité de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole.  
Thèse Doct. Univ. LIMOGES. Chimie-Chimie physique. 83 pages.
- CLEDAT D., DEBORD J., PENICAUT B., 1989.  
Basicité et lipophilie de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole.  
*Analisis* 17 398-400.
- DUFOUR I., 1989.  
Impact de l'utilisation de molluscicides sur la croissance d'*Euglena gracilis* in vitro.  
Thèse Doct. Univ LIMOGES, Pharmacie, 86 pages.
- ENCYCLOPEDIA UNIVERSALIS.  
Euglenophycées.  
Encyclopedia universalis, Ed PARIS, 740-742.
- FRAYSSE J.L., 1987.  
Basicité et hydrolyse de quelques dérivés du BNT  
Thèse Doct. Univ. LIMOGES, Pharmacie, 39 pages.

- FREYSSINET G., HEIZMANN P., VERDIER G., 1972.  
Influence des conditions nutritionnelles sur la réponse à l'éclairement chez les euglènes étiolées.  
*Physiol. Veg.* **10** 421-442.
- FREYSSINET G., 1977.  
Etude sur le verdissement d'*Euglena gracilis* étiolées. Le conditionnement général. La mise en place du système photosynthétique. Caractérisation et synthèse des protéines ribosomiques.  
Thèse Doct. Univ. Claude-Bernard LYON I. Sciences. 97 pages.
- GAYRAL P., CAVIER R., 1977.  
Actualité et perspective d'avenir des molluscicides.  
*Soc. Chim. Ther. PARIS*, **5** 177-209.
- GILLES H.M., ZAKI A.A.A., SOUSSA M.A., SOLIMAN S.S., HASSAN A., BARBOSA F., 1973.  
Results of a seven years control project on the endemicity of *Schistosoma haematobium* infection in Egypt.  
*Ann. Trop. Med. Parasitol.* **67** 45-65.
- GOLDBERG A., FRAZIER J., 1989.  
Les nouveaux tests en toxicologie expérimentale.  
*Pour la science* **144** 38-48.
- GREENBLATT G.L., SCHIFF J.A., 1959.  
A pheophytin like pigment in dark adapted *Euglena gracilis*.  
*J. Protozool.* **6** 23-28.
- JELNES J.E., 1977.  
Letter : evidence of possible molluscicide resistance in schistosoma intermediate hosts from Iran.  
*Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **71** 451.
- JOUANY J.M., 1981.  
Les tests d'écotoxicité aigue chez les algues et les macrophytes. Les tests de toxicité aigues en milieu aquatique.  
*INSERM.* **106** 169-181.
- LEVEQUE C., 1990.  
Impact de la lutte antivectorielle sur l'environnement aquatique.  
*Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **65** 119-124.
- MADULO-LEBLOND G., GAYRAL P., GUILLAUMEL J., CLAVEL J.M., DEMERSEMAN P., ROYER R., 1981.  
Recherche sur les dérivés nitrés d'intérêt biologique. XXIII. Nouvelles données relatives aux propriétés molluscicides des dérivés halogénés du BNT.  
*Eur. J. Med. Chem.* **16** 267-270.

- MILLET F., 1984.  
Mise en évidence de rythmes circannuels de croissance chez *Euglena gracilis* et *Chlamydomonas reinhardtii*.  
Thèse Doct. 3<sup>e</sup> cycle. Univ. PARIS XI. Pharmacie. 118 pages.
- MURPHY J.R., FRIEDMANN J.C., 1985.  
Pré-clinique toxicologie of Nitazoxanide. A new antiparasitic compound.  
*J. Appl. Toxicol.* 5 49-52.
- PELLIGRINI M., 1978.  
Variations qualitatives et quantitatives du plastidome et du chondriome d'*Euglena gracilis* Z en cultures synchrones.  
Thèse Doct. Univ. AIX-MARSEILLE II. Sci. Nat., Tome I, 163 pages.
- PIETTE, 1968.  
Cytologie des maladies du sang.  
Editions médicales flammariens, PARIS, 673 pages.
- ROUX P., 1984.  
Influence du CIPC sur la croissance et la morphologie plastidienne d'*Euglena gracilis*.  
Thèse Doct. Univ. LIMOGES. Pharmacie. 86 pages.
- VIGNOLES P., 1990.  
Toxicité du benzamido-2 nitro-5 thiazole et de onze dérivés sur *Lymnaea peregra ovata* Müller, *Gammarus pulex pulex* L. et *Euglena gracilis* Klebs. Relations structure-activité quantitatives.  
Thèse Doct. Univ. LIMOGES. Sci. Nat. 130 pages.
- VIGNOLES P., DREYFUSS G., CLEDAT D., DEBORD J. PENICAUT B., RONDELAUD D., 1990 a.  
Lutte antivectorielle de la distomatose à *Fasciola hepatica* L. I.Relation structure-activité quantitative de composés molluscicides sur *Lymnaea peregra ovata* Muller.  
*Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 8 119-125.
- VIGNOLES P., DREYFUSS G., CLEDAT D., LACOUTURE L., 1990 b.  
QSAR of some organic molluscicidal compounds used in fasciolosis control.  
*Proceedings I.C.O.P.A. VII, Paris, 20-24 août 1990. Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 8 Suppl. 2 1071.

## TABLE DES MATIERES

PLAN	8
INTRODUCTION	9
CHAPITRE I : VALIDITE DU MODELE <i>E. gracilis</i>	13
A. Généralités	14
1. Classification	14
2. Description	14
3. Mobilité	16
4. Nutrition	16
5. Ecologie	17
B. Validité du modèle	17
1. Sensibilité des euglènes	18
2. Reproductibilité	19
3. Fiabilité d'interprétation	19
4. Evaluation de la toxicité	19
CHAPITRE II : EVALUATION DE LA SENSIBILITE D' <i>E. gracilis</i> A QUELQUES DERIVES DU BNT	22
A. Conditions de modélisation	23
1. Entretien de la souche	23
2. Définition des conditions de l'expérimentation	23
B. Méthodologie	26
1. Composition du milieu de culture	26
2. Description du milieu de culture	28

a. Préparation du milieu deux fois concentré	28
b. Préparation du milieu une fois concentré	28
3. Répartition du milieu dans les différents flacons	29
4. Protocole opératoire	30
a. Ensemencement des euglènes	30
b. Méthode et périodicité du comptage	30
c. Matériel utilisé	33
C. Produits étudiés	33
1. Le Niclosamide	33
a. Généralités	33
b. Mécanisme d'action	35
$\alpha$ . Rappel sur la chaîne respiratoire	35
$\beta$ . Mode d'action	35
2. Les dérivés du BNT	37
a. Propriétés physico-chimiques	37
b. Mode d'action	37
c. Solubilisation des produits étudiés	38
d. Dosage des solutions	38
CHAPITRE III : RESULTATS	43
A. Courbes de croissance de l'euglène	44
B. Paramètres étudiés	45
1. Le taux de mortalité	45
2. La concentration létale à 50 %	48

a. Définition	48
b. Calcul mathématique des $CL_{50}$	48
3. Modification de la croissance	50
a. Le pourcentage de modification	50
b. La concentration inhibitrice à 50 %	51
c. La concentration activatrice maximale	51
C. Résultats expérimentaux	51
1. Influence de la dose	51
a. $CL_{50}$	51
b. $CI_{50}$	54
c. $CA_{max}$	54
2. Influence du temps	56
a. Inhibition de la croissance	56
b. Mortalité des cellules	58
CHAPITRE IV : DISCUSSION	60
A. Conditions d'évaluation de la toxicité	61
1. Inconvénients de la méthode utilisée	61
2. Nécessité de deux pH	62
3. Influence du solvant	62
B. Détermination du produit le plus actif	65
1. Comparaison avec le Niclosamide	65
2. Comparaison avec le BNT	66
3. Conclusion	66

C. Problème de la concentration activatrice	67
D. Corrélation avec les limnées	67
E. Le molluscicide idéal	69
CONCLUSION	71
BIBLIOGRAPHIE	74

---

LACOUTURE Laurence - ETUDE DE LA TOXICITE DE QUELQUES DERIVES DU  
BENZAMIDO-2 NITRO-5 THIAZOLE SUR *Euglena gracilis* Klebs - 82 pages  
(Thèse : Pharmacie, Limoges, 1991)

---

### RESUME

Actuellement, de nombreux produits molluscicides sont utilisés. Mais très peu sont entièrement acceptables du fait de leurs effets secondaires sur l'environnement. C'est pourquoi, de nouveaux produits sont à l'étude, et parmi eux, les dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole. Il s'agit de déterminer si ces composés, réputés bons molluscicides, n'ont pas d'effets néfastes sur la faune et la flore associées.

Notre étude a donc porté sur l'impact de quatre dérivés du BNT sur *Euglena gracilis*, algue verte unicellulaire. Nous avons ainsi constaté que ces produits n'ont pas d'action létale, ni d'effets inhibiteurs sur la croissance de ces algues, aux doses utilisées pour avoir un effet molluscicide.

Nous pouvons en déduire que ces dérivés du BNT pourraient être employés comme molluscicides en raison de leur faible toxicité sur la flore associée.

---

### MOTS CLES

*Euglena gracilis*, Molluscicides, Pollution, Toxicité

---

### JURY

Président : Monsieur le Professeur Nicolas  
Juges : M. DREYFUSS  
M<sup>elle</sup> GUIOCHET  
M. VIGNOLES

---