

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

Année 1991

THESE N° 319

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 17 juin 1991

par

Véronique GRENAILLE

Née le 26 octobre 1967

à Brive (Corrèze)

LES EFFETS TOXIQUES 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^{lle} J. FEUILLARD, Pharmacien Juge

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE**

- **DOYEN de la FACULTE : Monsieur le Professeur RABY**
- **ASSESEURS :** **Monsieur le Professeur GHESTEM (1^{er} Assesseur)**
 Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences (2^e Assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEUR DES UNIVERSITES

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

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEFS DES SERVICES ADMINISTRATIFS

CELS René

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 nos
sincères remerciements.**

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

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

**Nous vous remercions pour les conseils
prodigués tout au long de notre étude.**

A Mademoiselle J. FEUILLARD

Pharmacien

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

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

A Monsieur P. VIGNOLES

Nous vous remercions pour la
disponibilité et l'aide précieuse accordées lors
de notre travail.

A Madame L. PEYRICHOU

Nous vous remercions pour votre
gentillesse et votre aide lors de la réalisation de
ce travail.

A mes Parents

A ma Soeur

A mes Amis

qui ont fait preuve d'indulgence tout au
long de mes années d'étude.

Je leur dédie tendrement cette thèse.

PLAN

INTRODUCTION

CHAPITRE I : Matériel biologique : l'euglène

CHAPITRE II : Propriétés et impact des molluscicides

CHAPITRE III : Molluscicides étudiés

CHAPITRE IV : Protocole expérimental

CHAPITRE V : Résultats obtenus

CHAPITRE VI : Discussion

CONCLUSION

INTRODUCTION

Nul ne peut nier que nous assistons à un développement du nombre de cas de parasitoses à travers le monde. L'Organisation Mondiale de la Santé, à l'heure actuelle, estime que 500 millions d'individus, c'est-à-dire un individu sur dix, est atteint de maladies tropicales. Les bilharzioses, par exemple atteindraient 200 millions de personnes. Ces maladies sévissent dans 76 pays, la majorité étant concentrée en zone inter-tropicale. Les parasitoses responsables sont transmises à l'occasion de contact avec l'eau où vivent leurs hôtes intermédiaires : les mollusques.

L'emploi de molluscicides apparaît donc comme un des moyens de luttés possibles contre les parasitoses. Or, actuellement, un molluscicide d'origine organique est utilisé couramment sur le terrain : le niclosamide ou Bayluscide®. Des équipes ont étudié, à moyen et à long terme, les effets de l'application des molluscicides sur le terrain ou dans les conditions du laboratoire. L'étude bibliographique montre une contradiction concernant la résistance des mollusques aux produits utilisés : BARNISH *et al.* (1981) et BARNISH *et al.* (1982) ont mis en évidence une absence de résistance aux toxiques tels que le clonitralide (concentré émulsionnable à 25 % de niclosamide) chez *Biomphalaria glabrata*. Or JELNES (1977) rapporte l'apparition d'une résistance notable chez *Bulinus truncatus* pour le niclosamide.

Par conséquent, il devient important de trouver de nouvelles molécules actives. Dans le cadre de notre étude, nous nous proposons d'analyser l'activité biologique de produits dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole (BNT). L'efficacité de ces produits a déjà été étudiée sur différentes espèces animales telles que des Protozoaires et des Vers, afin d'observer les activités protozoocides, oxyuricides et ténicides. Ces dérivés ont également fait l'objet d'études complémentaires sur trois Mollusques tels que *Biomphalaria glabrata*, *Bulinus globosus* et *Bulinus forskali* en vue de quantifier l'activité molluscicide (CAVIER *et al.*, 1978 ; MADULO-LEBLOND *et al.*, 1981). Ces résultats ont pu ainsi montrer que ces produits laisseraient apparaître une certaine spécificité.

La littérature montre l'existence d'une étude limitée des dérivés du BNT et d'un manque relatif de données concernant leur toxicité sur le terrain, les conséquences à long terme de leur emploi, le coût de leur utilisation à grande échelle.

Ainsi, en décrivant l'action des dérivés du BNT, notre étude permettra de sélectionner, parmi eux, les produits dont l'activité molluscicide pourrait contribuer au contrôle de la transmission des bilharzioses et serait simultanément non toxique pour la flore et la faune associées.

Cette étude ne peut donc être envisagée sans une expérimentation parallèle du devenir des molluscicides à long terme et de leurs produits de dégradation ou résidus dans l'environnement.

Différentes cibles sélectionnées dans le règne animal ou végétal peuvent permettre cette étude d'impact sur l'environnement :

- Les crustacés d'eau douce (les gammarès).
- Les insectes (les larves d'*Aedes*).
- Les algues unicellulaires d'eau douce (les euglènes).

Parmi elles, nous avons choisi *Euglena gracilis*, matériel biologique à partir duquel nous avons pu définir l'effet toxique de certains molluscicides expérimentaux.

Les produits étudiés sont :

- BNT
- Bromo-2 BNT (Br-2 BNT)
- Bromo-3 BNT (Br-3 BNT)
- Dibromo-2,5 BNT (Br₂-2,5 BNT)
- Dichloro-2,4 BNT (Cl₂-2,4 BNT)
- Dichloro-2,5 BNT (Cl₂-2,5 BNT)

Les résultats obtenus concernant la sensibilité de l'euglène à ces dérivés sont comparés à ceux obtenus avec le produit de référence : le niclosamide.

Le plan adopté est le suivant :

CHAPITRE I	: Matériel biologique : l'euglène
CHAPITRE II	: Propriétés et impact des molluscicides
CHAPITRE III	: Molluscicides étudiés
CHAPITRE IV	: Protocole expérimental
CHAPITRE V	: Résultats obtenus
CHAPITRE VI	: Discussion

CHAPITRE I
MATÉRIEL BIOLOGIQUE :
Euglena gracilis

I. CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES ALGUES (GORENFLOT, 1975)

A. Définition

Les algues sont des végétaux chlorophylliens qui sont très abondants dans les milieux aquatiques.

On peut rencontrer parmi elles, des structures et morphologies diverses, plus ou moins compliquées, à savoir :

- un thalle unicellulaire ou pluricellulaire,
- une structure en filaments, en lames, en tubes ou en croûtes massives, de forme très complexe.

Ainsi, plusieurs types de reproduction sexuée et de cycle de développement sont possibles, même dans les conditions écologiques les plus diverses, grâce à des spores et des gamètes formés dans des sporocystes et des gamétocystes.

B. Rôle dans la nature

Les algues en tant que végétaux verts, décomposent le gaz carbonique pour donner des molécules organiques et de l'oxygène, grâce à l'énergie lumineuse.

Ce sont donc des organismes photosynthétiques grâce à la chlorophylle associée à des pigments variés, et localisée dans des plastes différenciés. Cette présence de plastes et de chlorophylle permet de distinguer les algues des champignons qui en sont dépourvus.

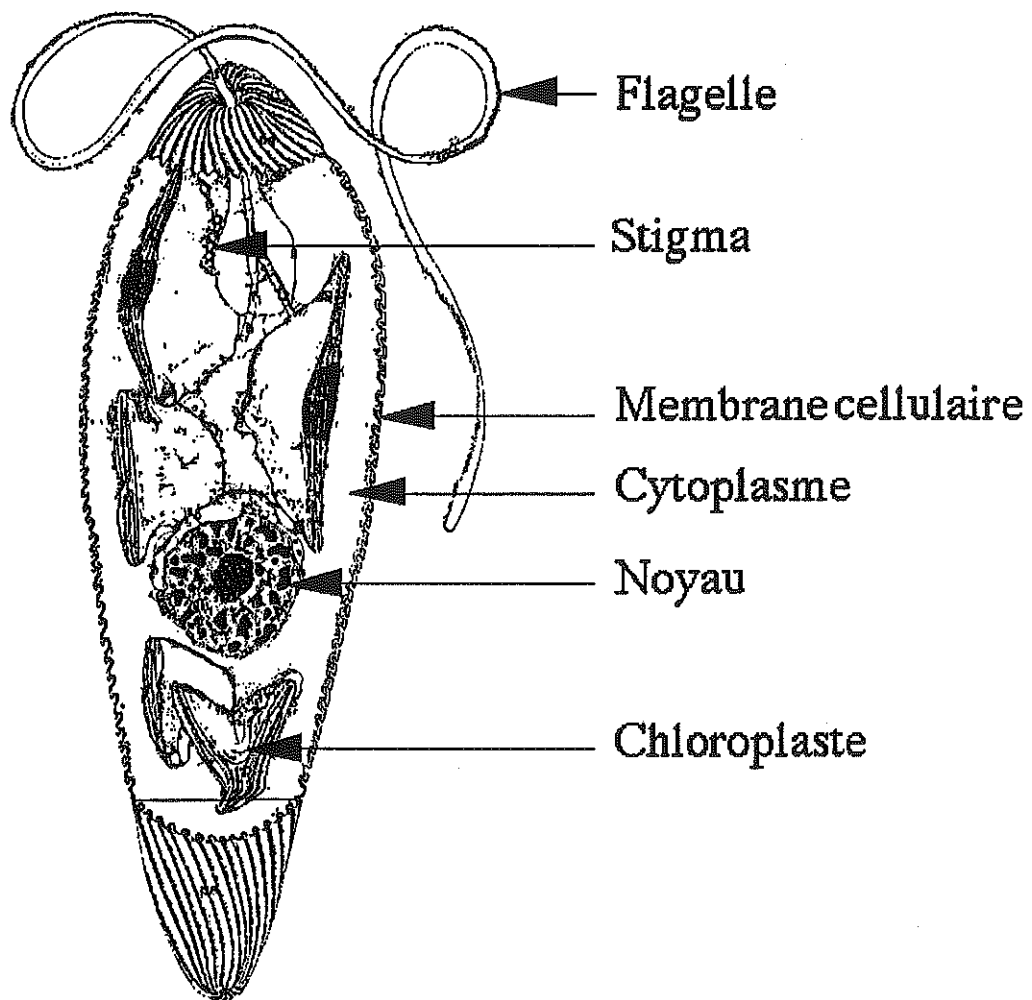


Figure 1 : Schéma de l'euglène montrant les différents constituants cellulaires visibles au microscope optique.

Comme elles sont très abondantes dans toutes les eaux, et que celles-ci couvrent la majeure partie de la terre, leur action est primordiale, notamment en ce qui concerne la constitution du plancton. Elles jouent aussi un rôle épurateur, mis à profit pour la régénération des eaux. Certaines, colmatantes ou constructives, modifient la forme et la qualité des côtes et des fonds.

Elles peuvent servir de nourriture en milieu aquatique et sont donc à la base de la chaîne alimentaire.

C. Caractères généraux des divers embranchements

Considérées, pendant longtemps comme une classe de Thallophytes, les algues constituent en réalité un vaste ensemble hétérogène d'embranchements très distincts les uns des autres et n'ayant entre eux que très peu de caractères communs.

On distingue parmi ces divers embranchements, les algues vertes de la classe des Chlorophycées, qui possèdent des plastes colorés en vert et des caroténoïdes qui ne masquent nullement leur couleur.

Sur le plan cytologique et biochimique, ces algues vertes présentent des caractères communs avec les plantes supérieures ; ces mêmes caractères associés aux différences de structure et de mode de reproduction, permettent de différencier les divers embranchements d'algues.

II. CLASSIFICATION D'*Euglena gracilis* (figure 1)

Les algues vertes unicellulaires telles que les euglènes sont couramment utilisées pour l'étude de mécanismes intimes de la vie cellulaire. Les euglènes sont des eucaryotes, appartenant à la classe des Euglénophycées. Elles présentent un aspect fusiforme, une longueur de 15 à 25 μm , un volume moyen de 1500 μm^3 .

Leur mobilité est assurée par deux flagelles inégaux, dont le plus long a un rôle locomoteur.

Elles possèdent des sporocystes et des gamétocystes, assurant la reproduction, ainsi que des chloroplastes contenant des chlorophylles a et b, des caroténoïdes, permettant, à la lumière, une activité photosynthétique.

Phyllum : Chromophytes

Embranchement : Pyrrophytes

Classe : *Euglenophyceae*
Famille : *Euglenidae*
Genre : *Euglena*
Espèce : *Euglena gracilis*
Variété : Z

III. MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE DES EUGLENOPHYCÉES (ENCYCLOPEDIA UNIVERSALIS, 1988)

Les Euglénophycées sont des organismes unicellulaires de couleur verte, parfois groupés en colonies ; ce sont des végétaux présentant de la chlorophylle typique mais ayant des caractères de Protozoaires.

Beaucoup d'Euglénophycées vivent dans des eaux très riches en matières organiques, donc polluées.

Leurs réserves sont constituées de paramylon, voisin de l'amidon mais ne bleuissant pas par l'iode. Leur paroi est épaisse, rigide chez certains genres. D'une dépression apicale partent deux flagelles qui peuvent se réunir ensuite, en un seul, bien visible.

Il existe un stigma, tache orangée contenant du carotène et sensible à la lumière. Certaines Euglénophycées sont plastidiées, d'autres sont constamment incolores et se nourrissent donc seulement comme les Protozoaires. Certaines se décolorent à l'obscurité et perdent facilement leurs plastes, puis reverdissent à la lumière. Ainsi, on les a longtemps considérées comme un exemple de passage du règne végétal au règne animal.

A. Cytologie (ENCYCLOPEDIA UNIVERSALIS, 1988 ; GORENFLOT, 1975)

1. Paroi

Chez les végétaux, la cellule est généralement limitée par une membrane d'enveloppe, rigide, formée d'un mélange de glucides élaborés par le protoplasme vivant : c'est la paroi squelettique qui impose aux cellules une forme définie. Il y a cependant des exceptions : beaucoup d'algues unicellulaires comme les euglènes sont dépourvues d'une telle paroi et tendent à prendre une forme plus ou moins sphérique ou ovoïde.

Le corps de l'euglène est entouré d'une membrane ou pellicule souple, élastique, essentiellement protéique qui permet à la cellule de se déformer en s'étirant, se contractant ou se distordant.

Cette pellicule présente des ornementations qui dessinent des stries parallèles disposées en hélices longitudinales, appelées encore crêtes. Celles-ci sont orientées vers la région postérieure de la cellule. Elles sont de nature protéique et s'étendent de la partie antérieure de la cellule jusqu'à sa partie caudale.

Au moment de la division cellulaire, une nouvelle crête se développe dans chaque sillon plus ou moins profond compris entre deux crêtes préexistantes.

2. Noyau

Le noyau, volumineux, sphérique ou allongé, situé dans la région centrale de la cellule, est limité par une membrane nucléaire qui persiste au moment de la division nucléaire. Il contient un ou plusieurs endosomes ou nucléoles.

Les chromosomes restent à l'état condensé, et demeurent, avec le nucléole, visibles pendant tout le cycle nucléaire. La période de division débute par la migration du noyau vers la région antérieure de la cellule, puis un faisceau de microtubules apparaît autour de l'endosome près des chromosomes.

La multiplication est un phénomène asexué.

En conclusion, si le noyau de l'euglène possède un certain nombre de caractères communs avec les autres noyaux de métazoaires, il en diffère profondément :

- par la permanence de la membrane nucléaire et du nucléole pendant la division nucléaire ou mitose,
- par l'existence d'un système de microtubules intranucléaires,
- par la permanence plus ou moins complète des chromosomes sous une forme condensée pendant tout le cycle.

3. Appareil cinétique

La région antérieure de la cellule est occupée par une invagination, limitée par une membrane : le réservoir. Il se prolonge, en avant, par un canal : le goulot ; ce dernier s'ouvre par un orifice étroit appelé cytostome, à l'extrémité antérieure de la cellule et situé légèrement sur le côté.

Deux flagelles inégaux prennent chacun naissance sur un blépharoplaste ou mastigosome, localisé dans le cytoplasme, à proximité de la membrane du réservoir et dont la structure est semblable à celle d'un centriole (9 paires de 3 tubules).

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 une file hélicoïdale. Ces mastigonèmes se forment dans des vésicules de l'appareil de Golgi et se fixent ensuite sur le flagelle. Ils ont une structure microtubulaire et se terminent par des microfilaments de 2,5 à 5 µm de diamètre.

Le deuxième flagelle très court demeure à l'intérieur du réservoir et se fixe à l'autre flagelle au niveau d'une granulation : le photorécepteur.

4. Autres constituants cellulaires

L'appareil de Golgi est constitué d'une dizaine de dictyosomes épais, formés par l'empilement de saccules dont certains peuvent être associés à la vacuole pulsatile. Il présente une activité hypersécrétoire au début de la division cellulaire.

Le chondriome, dont la morphologie est encore controversée, est formée d'un réticulum grêle, ramifié, dessinant des mailles irrégulières autour des chloroplastes, du noyau et du réservoir. Il a souvent été décrit comme une multitude de petites mitochondries, sphériques ou en bâtonnets, dispersées dans toute la cellule.

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

5. Les plastes

a. Morphologie

Ce sont des disques lenticulaires de 3 à 10 µm de diamètre et de 1 à 3 µm d'épaisseur ; chez les algues, les aspects des chloroplastes sont très divers et on leur donne souvent le nom de chromatophores. Ils sont volumineux et indépendants les uns des autres : type néoplastidié. Sur ces chloroplastes, on observe souvent des granulations protéiques réfringentes autour desquelles sont élaborés des grains d'amidon, ce sont les pyrénoides.

Les formes mobiles portent en outre, à la surface de leur chromatophore, une zone colorée en rouge par un pigment caroténoïde ; cette zone ou stigma est un organe photorécepteur, responsable du phototactisme.

La membrane plastidiale est double. Le stroma plastidial renferme divers éléments :

- des ribosomes plastidiaux,
- des globules lipidiques,
- des filaments d'ADN plastidial.

Les plastes renferment de plus des faisceaux parallèles de 3 ou 4 thylacoïdes plus ou moins étroitement associés. Ces thylacoïdes sont constitués de sacs membranaires aplatis de nature lipoprotéique, renfermant en particulier les pigments. Ils sont par conséquent les supports des systèmes photosynthétiques.

b. Composition

Suivant les groupes d'algues, les plastes présentent des variations de morphologie mais aussi de pigmentation. La composition moyenne des chloroplastes est la suivante :

- eau : 50 %,
- protéines : 35 à 55 % du poids de matière sèche (protéines contenant du fer, enzymes nombreuses et diverses),
- lipides : 20 à 30 % du poids de matière sèche (lécithines),
- glucides.

Les algues se caractérisent aussi par la présence de pigments :

- chlorophylles : porphyrines contenant un atome de magnésium au centre du noyau tétrapyrolique,
- caroténoïdes : pigments jaunes ou bruns.

Ces pigments jouent un rôle important dans la photosynthèse en modifiant les conditions d'utilisation de l'énergie lumineuse, énergie réduisant le gaz carbonique en glucides. Grâce à la photosynthèse, les euglènes synthétisent des substances ou produits carbonés voisins de l'amidon et localisés dans le cytoplasme, à l'extérieur des plastes. Ces substances constituent des réserves très abondantes, auxquelles on donne le nom de paramylon qui est un β -1,3 glucane caractéristique de la famille des Euglénidées. Ces grains de paramylon extraplastidiaux ont des caractéristiques communes avec l'amidon vrai : ils ont un aspect de croix noire en lumière polarisée, mais différent de l'amidon par leur structure moléculaire et l'absence de coloration en présence d'iode.

Les plastes renferment, contrairement à ceux des végétaux supérieurs, une ou plusieurs inclusions de nature protéique, non pigmentée mais colorable par l'hématoxyline ferrique : ce sont les pyrénoides. Ceux-ci sont toujours dépourvus d'une enveloppe d'amidon intraplastidial. Leur stroma est plus homogène et plus finement granuleux que celui du reste du plaste. Ils restent centraux chez les euglènes et peuvent être traversés par des lamelles en rapport avec celles du plaste. Bien que son rôle physiologique soit mal connu, il semblerait jouer un rôle actif dans la synthèse de polysaccharides à grosses molécules aux dépens des sucres plus simples résultant de la photosynthèse.

Enfin, les cellules flagellées possèdent un organite sensible à la lumière, le stigma, qui est une dépendance du plaste. Chez les euglènes, le stigma est exceptionnellement indépendant du plaste et renferme quelques saccules isolés et surtout de nombreux globules lipidiques chargés d'un pigment caroténoïde rouge et localisés au voisinage de la région cytoplasmique qui donne naissance aux flagelles.

6. Vacuoles et inclusions diverses

a. Vacuoles

On donne le nom de vacuoles à des inclusions aqueuses contenues dans le cytoplasme. L'appareil vacuolaire apparaît réduit chez de nombreuses formes unicellulaires flagellées et peut être observé grâce à des colorants vitaux comme le rouge neutre ou le bleu de crésyle car les vacuoles sont dites à "métachromatine".

Le contenu vacuolaire est très diversifié : il existe des acides, des sels (sels de potassium), des glucides, des matières protéiques.

Chez les euglènes, on observe des vacuoles pulsatiles, limitées par une membrane et formées par la coalescence de très nombreuses petites vacuoles, dans une région déterminée du cytoplasme. Elles déversent rythmiquement leur contenu et se reforment aussitôt. Elles jouent un rôle important dans les échanges entre la cellule et le milieu extérieur puisqu'elles ont à la fois :

- un rôle excréteur de l'eau en excès et des déchets,
- un rôle régulateur de la pression osmotique.

b. Inclusions diverses

La plupart des cellules d'algues renferment des gouttelettes lipidiques plus ou moins volumineuses, constituées par des mélanges de glycérides, d'acides gras, de stérols, etc...

Elles sont fréquentes chez les chromophytes qui n'élaborent pas d'amidon et observées chez les algues vertes surtout dans les formes de résistance, ou dans les cellules soumises à des conditions de développement défavorables.

Elles peuvent contenir aussi des corps mucifères, en périphérie de la cellule, qui peuvent excréter un mucilage à l'extérieur.

B. Biochimie

1. Pigments des plastes : structure et rôle

a. Chlorophylles

On obtient ces pigments à l'état brut par broyage et macération d'algues dans l'alcool ou l'acétone. On distingue chez les Euglénophycées, deux chlorophylles :

- chlorophylle a : de formule brute $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$, transformant l'énergie lumineuse en énergie chimique,
- chlorophylle b : de formule brute $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ qui existe en petite quantité.

b. Caroténoïdes

Les pigments chlorophylliens sont associés chez les algues à des pigments caroténoïdes comprenant :

- du carotène : hydrocarbures tétraterpéniques de formule brute : $C_{40}H_{56}$,
- des substances oxygénées, possédant des fonctions alcools ou cétones : xanthophylles.

On trouve surtout dans les chloroplastes des algues le carotène β , carbure d'hydrogène en C_{40} et des xanthophylles caractéristiques, très riches en oxygène. Ils sont présents dans les cellules mobiles comme les euglènes qui jouissent ainsi de phototactisme.

2. Produits du métabolisme

Les Euglénophycées sont incapables de synthétiser l'amidon et contiennent ainsi du paramylon qui a la forme de bâtonnets ou de grains de morphologie caractéristique dans le cytoplasme.

Les gouttelettes lipidiques peuvent, elles-aussi, constituer des produits du métabolisme non négligeables.

C. Biologie

1. Déplacement et mobilité

Les euglènes se déplacent généralement en nageant selon une trajectoire hélicoïdale.

De plus, durant la période d'accroissement régulier de la cellule, intervient une zone appelée cortex, formée d'une membrane plasmique et se différenciant en une série de motifs répétitifs formés de crêtes et sillons au niveau desquels se trouve localisé un groupe de cinq à sept microtubules allongés.

Sous la membrane plasmique, s'observe une couche fibreuse qui paraît impliquée dans la contractilité du cortex et joue un rôle dans les mouvements d'allongement et de rétraction de la cellule. Ces mouvements et le battement des flagelles concourent, avec les glissements des microtubules sous-corticaux, à la mobilité de la cellule.

Lorsque les conditions de développement sont mauvaises, les euglènes sont capables d'enkystement ; grâce au mucilage libéré à l'extérieur, les cellules s'arrondissent et s'entourent d'une enveloppe kystique.

2. Reproduction

Aucun phénomène de reproduction sexuée n'a été observé. La cellule se divise par scission binaire et longitudinale pendant la nuit. Cette division cellulaire ou mitose débute au niveau du réservoir et s'étend vers l'extrémité caudale de la cellule ; cette dernière possède alors un nombre double de crêtes par rapport à une cellule en interphase.

Quand la mitose est achevée, chaque cellule fille a reçu par moitié une série de crêtes anciennes, un nombre équivalent de crêtes néoformées, un nombre dédoublé d'organites cellulaires et de matériel génétique.

Cette reproduction est dite asexuée.

3. Nutrition (OUTIFRAKH, 1984)

Les Euglénophycées possèdent des caractères des Chlorophycées à savoir la présence de chlorophylles a et b et des Dinoflagellés avec la présence du paramylon.

Elles possèdent de nombreux chloroplastes leur permettant une activité photosynthétique en présence de lumière : ce sont alors des photo-autotrophes utilisant le carbone du CO₂ dissous. Elles requièrent la présence de vitamines B₁ et B₁₂ : ce sont des photo-auxotrophes.

Cependant, à l'obscurité, elles peuvent se développer dans un milieu enrichi en carbone organique : elles sont donc hétérotrophes facultatives. Elles perdent alors leurs chloroplastes au cours des divisions successives et ne possèdent plus que des organites rudimentaires, par perte de la structure lamellaire et des pigments. Ces organites sont des proplastes et les cellules sont dites étiolées.

Remises à la lumière, un bouleversement métabolique et physiologique est observé, provoquant l'élaboration du système plastidien, la régénération des lamelles. La synthèse de chlorophylle se déroule alors de façon linéaire après une phase de latence de 3 à 12 heures. La transformation est donc réversible mais peut être irréversible lorsque les euglènes sont soumises à des traitements particuliers : agents chimiques (antibiotiques), ultra-violet, températures élevées ; ces divers traitements inhibent la reproduction des plastes et rendent incolores les euglènes ; les cellules deviennent alors hétérotrophes strictes aplastidiées.

4. Ecologie

Les euglènes vivent dans les eaux douces contenant des matières organiques : mares, étangs.

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 lumineuse. Si la durée de la photopériode est bien choisie, les mitoses surviennent seulement en période obscure. Dans des conditions expérimentales, le rythme d'éclairement utilisé est de 12 heures diurnes et de 12 heures nocturnes.

La température de culture est de $25 \pm 0,5$ °C. Les euglènes peuvent supporter des écarts de pH importants (3,5 à 9).

Ce sont des matériaux biologiques très importants ainsi que des marqueurs de pollution.

CHAPITRE II
PROPRIÉTÉS ET IMPACT
DES MOLLUSCICIDES

I. GÉNÉRALITÉS

A. Utilisation des molluscicides

Les molluscicides représentent un domaine de la recherche pharmacologique très accessible.

Le marché des molluscicides est en extension parce qu'ils représentent actuellement une étape nécessaire dans la lutte contre les parasitoses transmises par des mollusques, mais leur emploi est encore mal connu et limité. Aucun des molluscicides actuels n'étant utilisable dans toutes les situations épidémiologiques, il est impérieux de rechercher des composés plus sélectifs pour leur cible et moins toxiques pour l'environnement.

B. Principales parasitoses rencontrées

La lutte contre certains mollusques s'impose : en effet, les mollusques sont des hôtes intermédiaires des parasites dont l'homme et les animaux domestiques sont les hôtes définitifs.

1. Les trématodes chez le bétail

Plusieurs espèces sont responsables de distomatoses hépatobiliaires comme par exemple *Fasciola hepatica* L. C'est une maladie prédominante du bétail qui atteindrait dans certaines régions de France (Pas-de-Calais, Massif Central, etc...) 50 à 70 % du cheptel ovin et bovin. Elle doit donc être systématiquement dépistée et traitée pour des raisons économiques.

L'hôte intermédiaire de *F. hepatica* est le mollusque *Lymnaea truncatula*.

2. Les trématodes chez l'homme

Ce sont des vers appartenant au genre *Schistosoma* et qui provoquent des maladies tropicales : les bilharzioses. Celles-ci atteignent 200 à 300 millions d'individus et sont en voie de passer au premier rang des endémies mondiales et supplanteraient ainsi le paludisme.

On distingue quatre espèces de *Schistosoma* reconnues chez l'homme et ayant des hôtes intermédiaires différents :

- *S. haematobium* qui provoque la bilharziose urinaire avec comme hôte intermédiaire, *Bulinus*, mollusque aquatique, répandu surtout en Afrique, Moyen-Orient, Inde.
- *S. mansoni* causant la bilharziose hépatique avec comme hôte intermédiaire un gastéropode pulmoné ou planorbe, *Biomphalaria*, mollusque sans symétrie, plat, répandu dans les eaux d'Afrique intertropicale, des Antilles, de Madagascar, vivant dans les eaux claires ou eaux légèrement polluées.
- *S. japonicum* responsable de la bilharziose artério-veineuse avec comme hôte intermédiaire : *Onchomelania*, petit mollusque amphibie vivant au Moyen-Orient, Sud du Japon, Indochine.
- *S. intercalatum* qui cause la bilharziose rectale avec comme hôte intermédiaire : *Pyrgophysa*.

C. Lutte contre les parasitoses

1. Pullulation des mollusques

La présence et la pullulation des mollusques dépendent :

- des caractères physicochimiques de l'eau où ils se trouvent, de sa teneur en produits organiques,
- de la végétation aquatique dont la présence favorise l'alimentation et sert de support aux pontes,
- de la vitesse du courant car ils préfèrent les eaux calmes.

Les conditions climatiques sont aussi importantes avec incidence de l'éclairement, de la température et des précipitations. Les limites maximales et minimales de température peuvent expliquer la répartition altitudinale des mollusques. L'activité humaine peut favoriser ou limiter leur pullulation.

2. Lutte molluscicide (VIGNOLES *et al.*, 1990 a)

Le contrôle des parasitoses peut s'effectuer au niveau de l'hôte intermédiaire (animal ou mollusque) ou de l'hôte définitif (animal ou homme).

La destruction des mollusques a parfois suffi à assurer la diminution de la prévalence dans des foyers de parasitoses, mais le principal risque est alors le remplacement par une autre population de mollusques plus envahissante et plus difficile à contrôler que la précédente.

Actuellement, la lutte chimique est obtenue par l'association de molluscicides et de mesures physiques visant à modifier le milieu ou à le stériliser pour le rendre inhospitalier aux mollusques : drainage, suppression de la végétation, modification du courant, alternance de remplissage et d'assèchement. Mais la pollution du milieu et le déséquilibre de l'écosystème sont les principaux facteurs à redouter.

Aussi, des travaux réalisés sur le terrain comme ceux de RONDELAUD (1986, 1988 a et b) dévoilent toute leur importance. Par épandage de produit chimique choisi (déversement et pulvérisation de sels de cuivre) et par introduction dans le milieu de prédateurs de l'hôte intermédiaire (*Lymnaea truncatula*), l'auteur a défini l'impact de la lutte chimique et de la lutte biologique afin de mieux contrôler la population de mollusques au cours du temps. Cependant, ce type de travail réalisé sur le terrain pour l'étude de l'efficacité des molluscicides reste encore trop rare.

II. PRINCIPAUX TYPES DE MOLLUSCICIDES

Il existe cinq classes de molluscicides d'origine chimique (GAYRAL et CAVIER, 1977) ; deux de ces classes sont utilisées à l'heure actuelle :

- Les dérivés du salicylanilide dont le représentant le plus connu est le niclosamide. Ce dernier est rarement utilisé à l'état pur : il est souvent employé sous forme de sels d'éthanolamine :
 - en poudre mouillable à 60 % de principe actif ou Mollutox[®],
 - en poudre mouillable à 70 % de principe actif ou Bayluscide[®],
 - en concentré émulsionnable à 25 % de principe actif ou Clonitralide[®].
- Les dérivés du triphényl-méthane parmi lesquels on trouve la N-tritylmorpholine, plus connue sous le nom de Frescon[®]. Comme le niclosamide, c'est l'un des seuls molluscicides organiques à être utilisé sur le terrain. Il est insoluble dans l'eau, c'est pourquoi il est présenté à 16,5 % du principe actif.

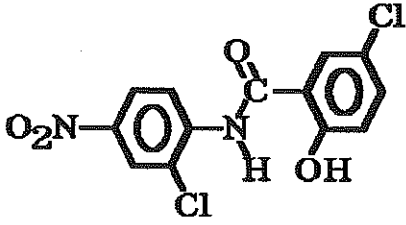
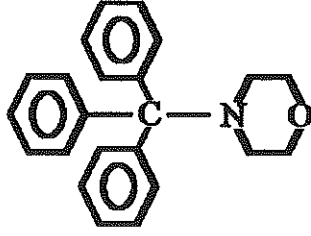
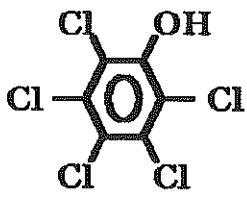
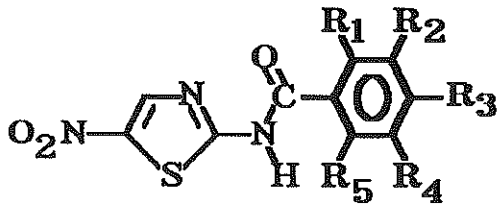
Noms des produits	Formules	Propriétés Mécanisme d'action
Niclosamide		<ul style="list-style-type: none"> - Transfère les protons à travers la membrane interne de la mitochondrie → inhibition de la synthèse d'ATP - Activité antiparasitaire (ténicide)
N-trityl-morpholine (Trifenmorph)		<ul style="list-style-type: none"> - Stimule l'entrée du calcium dans les cellules musculaires → contractures musculaires
Phénols halogénés		<ul style="list-style-type: none"> - Inhibent la synthèse d'ATP (cf niclosamide)
Sels métalliques	Cu^{2+} , Zn^{2+} $(\text{SO}_4^{2-}$, $\text{Cl}^-)$	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibent les enzymes du cycles de Krebs
Dérivés du BNT		<ul style="list-style-type: none"> - Toxicité renforcée par la présence d'atomes d'halogènes sur le cycle benzénique - Activité antiparasitaire

Tableau I : Principaux molluscicides

La liste peut être complétée par :

- Les phénols halogénés qui ont une activité toxique sur les mollusques et un mode d'action comparable à celui du niclosamide. Habituellement, on utilise le pentachlorophénate de sodium en raison de son faible prix de revient et de sa grande solubilité dans l'eau.
- Les sels métalliques possèdent une activité toxique en raison de leur action inhibitrice sur certaines enzymes intervenant dans le cycle de Krebs. Ils sont connus sous forme de sulfates (CuSO_4) et de chlorures (ferrique ou cuivrique). Ils sont d'une manipulation aisée et sont plus ou moins solubles dans l'eau, ce qui rend leur épandage très facile. Ils sont totalement ionisés en solution aqueuse permettant la libération du principe actif, un cation bivalent ou trivalent.
- Les dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole qui ont été synthétisés à la fin des années 1970 afin de fournir une alternative au niclosamide sur le marché des molluscicides. Ils seront traités plus précisément dans un paragraphe ultérieur.

L'ensemble de ces molluscicides figure dans le tableau I.

III. SÉLECTION ET ÉTUDE DES MOLLUSCICIDES

A. Molluscicide idéal (GAYRAL et CAVIER, 1977 ; LEVEQUE, 1990)

Actuellement, il n'existe aucun molluscicide spécifique, c'est-à-dire toxique uniquement sur une ou plusieurs espèces de mollusques cibles. De plus, ce sont des substances chimiques qui ont le plus souvent des effets secondaires regrettables sur l'environnement animal et végétal.

Le molluscicide idéal doit donc présenter différentes caractéristiques :

- être actif à faible concentration sur tous les stades de développement du mollusque (oeuf, juvénile, adulte) pour les différentes espèces ;
- ne pas être dangereux pour l'environnement, à savoir, poissons, mammifères et végétaux ;
- ne pas être toxique pour l'homme ;
- ne pas donner des résidus toxiques dans les cultures ;
- ne doit pas induire à long terme un déséquilibre des écosystèmes dans les conditions normales d'application ;

- être stable dans l'eau, ne pas se dégrader à la lumière solaire intense, ne pas avoir une activité différente selon le pH, les sels dissous, selon les boues et matières organiques ;
- être facile à épandre, bien se disperser ; ne doit pas être irritant ou toxique par inhalation ou manipulation ;
- être d'un coût supportable.

Or, toutes ces caractéristiques idéales ne se retrouvent pas simultanément dans les molluscicides actuels. C'est pourquoi, les chimistes n'hésitent pas à évaluer systématiquement l'activité molluscicide des composés qu'ils synthétisent.

B. Sélection

La sélection en laboratoire permet de retenir de nombreux composés qui doivent leur activité molluscicide à une toxicité soit générale, soit limitée à quelques groupes zoologiques. Cette sélection est destinée :

- à retenir les molécules actives (première sélection) ;
- à confirmer leur toxicité pour les mollusques (sélection définitive) ;
- à étudier leurs propriétés physico-chimiques et leur toxicité générale.

Ensuite, le produit passera au stade des essais sur le terrain.

1. Première sélection

Elle se fait sur des mollusques élevés économiquement en laboratoire ou récoltés dans la nature. Cette sélection est destinée à différencier les molécules potentiellement molluscicides.

2. Sélection définitive et évaluation complète en laboratoire

Les molécules sélectionnées sont utilisées à des concentrations plus précises et plus rapprochées afin de déterminer la concentration active du molluscicide sur tel ou tel mollusque et la courbe de toxicité pour définir la dose létale à 50 %. Cette sélection se fait par détermination de l'activité sur des mollusques aquatiques et mollusques amphibies.

Les études réalisées vont préciser :

- les courbes de toxicité, mortalité en fonction de la concentration ;
- les réactions d'évitement manifesté par le mollusque ;
- la sensibilité selon le stade de développement et la taille.

3. Etude physico-chimique

On étudiera le pouvoir du produit à se dégrader en fonction du pK_a , la stabilité et le maintien du pouvoir molluscicide dans l'eau à différents pH, sous éclaircissement solaire, selon la température, selon les sels minéraux ou les matières organiques présents.

4. Toxicité (VIGNOLES *et al.*, 1990 a)

Enfin, on détermine la toxicité possible des molluscicides ou de leurs métabolites pour l'environnement à savoir les plantes et algues, les invertébrés aquatiques, dans des milieux naturels reconstitués pour évaluer l'impact du produit.

5. Essais sur le terrain

Ils sont effectués sur des petits biotopes de faible surface.

Les essais préliminaires détermineront :

- la combinaison optimale concentration-durée d'exposition pour les eaux courantes ;
- le dosage du molluscicide dans l'eau par des méthodes chimiques ou biologiques permettant ainsi de préciser sa rémanence ;
- le mode d'application en fonction de la formulation (poudre, concentré, dérivés solubles).

On confirme ensuite sur le terrain, l'impact sur l'environnement, l'absence de résidus toxiques et la facilité d'emploi ; il est alors possible d'estimer le coût de son utilisation.

L'évaluation de l'activité molluscicide se fait par décompte de la mortalité immédiate et à des temps plus tardifs, après une ou plusieurs années de traitement par surveillance de l'incidence de la maladie, c'est-à-dire de la proportion d'individus infectés dès les premières tranches d'âges.

IV. IMPACT DES MOLLUSCICIDES SUR L'ENVIRONNEMENT (CABRINDEC, 1977)

A. Modalités de l'étude d'impact

L'écotoxicité d'une substance chimique est très difficile à mettre en évidence et à apprécier : en effet, elle est conditionnée par plusieurs caractéristiques que possèdent les divers molluscicides :

- spectre de toxicité étendu sur la faune et la flore ;
- efficacité de ces substances sur l'espèce cible ;
- quantités utilisées souvent supérieures aux normes nécessaires ;
- persistance à long terme, de résidus toxiques dans le sol ;
- surfaces soumises aux épandages souvent trop importantes.

C'est pourquoi, les conclusions faites sur le terrain doivent être complétées par celles obtenues à partir d'essais de laboratoire. Le but des essais de laboratoire est de déterminer l'activité d'une substance chimique à partir d'une population homogène appelée réactif biologique, dans des conditions de température, de pH, de solvant, de durée d'exposition et de concentrations bien définies. Pour cela on soumet, pendant un temps donné, deux lots d'organismes :

- un lot à des doses ou concentrations croissantes de solutions contenant le produit toxique ;
- un lot placé dans une solution sans toxique.

Ces essais permettent alors de définir par le calcul ou le graphique :

- la concentration ou dose de la substance chimique responsable des effets cytostatiques, ou cytotoxiques ou létaux, chez 50 % de la population soumise à l'essai ;
- le pourcentage de la population ayant réagi à l'effet de la substance chimique.

Ces essais s'avèrent très utiles pour permettre une comparaison entre des composés nouveaux et ceux de référence. Malheureusement, ils ne peuvent pas refléter précisément les phénomènes qui risquent de se produire dans l'environnement du fait :

- de la multiplicité des organismes considérés et techniques utilisées ;
- des conditions opératoires arbitrairement choisies ;
- des possibilités variables d'interprétation.

Toutefois, leur utilisation en laboratoire est un énorme avantage par rapport à leur utilisation sur le terrain, car elle permet de mesurer l'impact sur l'espèce animale ou végétale étudiée. Il s'agit donc d'une étape préliminaire indispensable avant toute application de toxiques à grande échelle.

B. Impact sur les algues

La plupart des pesticides sont systématiquement évalués sur les mollusques qui sont les principales cibles mais il ne faut pas négliger les effets de ces pesticides sur l'environnement et notamment sur les algues.

1. Rôle des algues (GORENFLOT, 1975)

Les algues sont capables, dans les milieux aquatiques, de libérer, par la photosynthèse des quantités d'oxygène très importantes, utilisées par les hétérotrophes aérobies.

Elles constituent un chaînon indispensable dans la chaîne alimentaire.

Notre choix, pour cette étude, s'est porté sur une algue unicellulaire verte : *Euglena gracilis* Klebs, variété Z, appartenant à l'embranchement des Euglénophycophytes.

2. Motivation du choix

E. gracilis se révèle être un modèle intéressant pour l'étude de la toxicité des produits sur les végétaux car son temps de multiplication est court et sa culture *in vitro* facile.

Les algues poussent dans des flacons contenant un milieu nutritif approprié (la description du milieu est indiqué dans le chapitre IV), et peuvent être étudiées à deux pH différents :

- L'un égal à 3,5 où elles adoptent une morphologie fusiforme. A ce pH, leur croissance est importante et le nombre de cellules vivantes par millilitre est de 6.10^6 à 10.10^6 .
- L'autre est de 7,2 ; elles se présentent sous forme de bâtonnets. Leur croissance est moins importante et le nombre de cellules vivantes par millilitre est de $0,6.10^6$ à 10^6 .

3. Evaluation de la toxicité sur les algues (PESSON et RAMADE, 1971)

La toxicité des produits est mise en évidence par des effets d'inhibition qui permettent de définir :

- la valeur d'inhibition de la fixation du CO₂ ;
- la valeur d'inhibition de la croissance ;
- la valeur d'inhibition de dégagement d'oxygène ;
- la valeur d'effets toxiques.

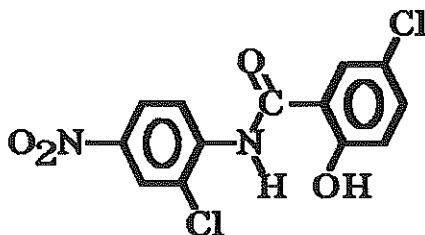
Pour notre étude, nous avons choisi d'étudier l'activité inhibitrice des molluscicides sur la croissance d'*E. gracilis*. L'objectif est de trouver un produit molluscicide d'un coût abordable et dont les résidus de dégradation sont non toxiques afin d'assurer une protection de la flore associée.

Nous nous sommes intéressée au benzamido-2 nitro-5 thiazole et à quelques uns de ses dérivés.

CHAPITRE III
MOLLUSCICIDES ÉTUDIÉS

I. NICLOSAMIDE

A. Structure et propriétés physico-chimiques



Dichloro-2',5 nitro-4
salicylanilide

La masse molaire est égale à 327,1 g.mol⁻¹. Il s'agit d'un acide faible insoluble dans l'eau.

B. Mécanisme d'action (CORBETT, 1974)

Le principal mode d'action du niclosamide s'exerce au niveau de la membrane interne de la mitochondrie.

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 et donc diffuse très bien à travers les membranes et plus particulièrement à travers la membrane interne de la mitochondrie. C'est sur cette membrane que se localise une chaîne respiratoire couplant l'oxydation des transporteurs réduits (NADH, FADH₂) à un transport actif de protons. Il s'accumule alors des protons dans la chambre externe qui détermine un gradient de pH. Le passage des protons vers la matrice mitochondriale, au niveau d'une ATPase permet la synthèse d'ATP.

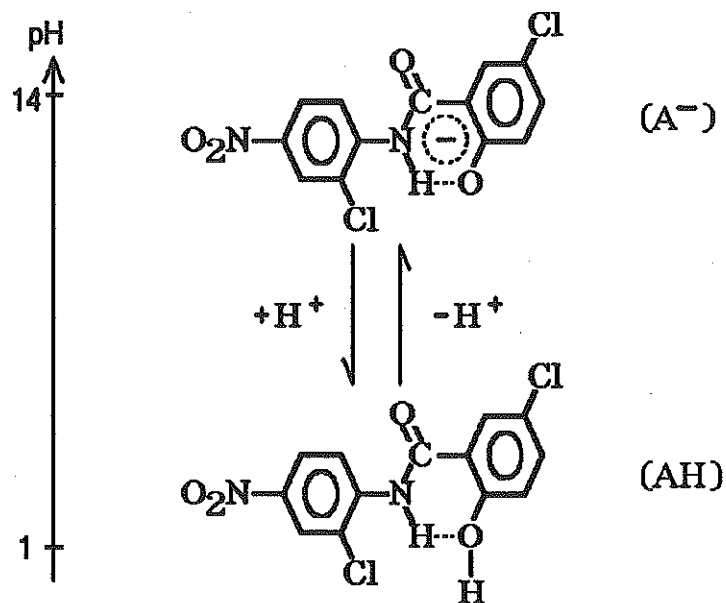
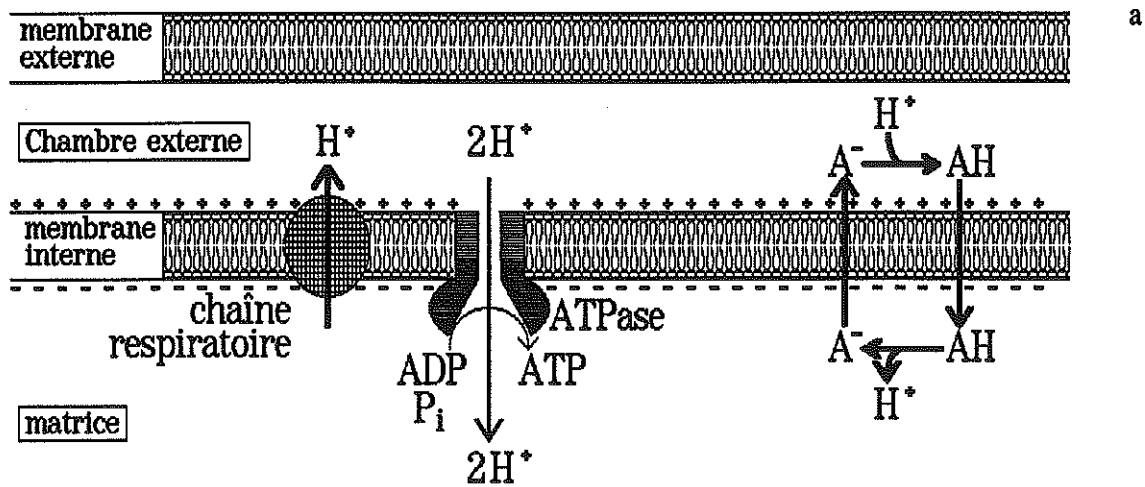


Figure 2

: 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).

Substituants	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Noms					
BNT	H	H	H	H	H
Bromo-2 BNT	Br	H	H	H	H
Bromo-3 BNT	H	Br	H	H	H
Dibromo-2,5 BNT	Br	H	H	Br	H
Dichloro-2,4 BNT	Cl	H	Cl	H	H
Dichloro-2,5 BNT	Cl	H	H	Cl	H

Tableau II : Les dérivés du BNT

Le mode d'action du niclosamide débute par une ionisation qui est fonction du pH. C'est pourquoi, dans la matrice où le pH est proche du pK_a de la molécule, la forme majoritaire est l'ion phénate, alors que, dans la chambre externe où le pH est plus faible, on rencontre la forme neutre. Ces deux formes sont lipophiles et vont permettre un passage des protons à travers la membrane phospholipidique contre le gradient créé par la chaîne respiratoire, empêchant ainsi le couplage nécessaire à la synthèse d'ATP.

Le mécanisme d'action du niclosamide est schématisé dans la figure 2a et la forme de la molécule en fonction du pH est présentée dans la figure 2b.

C. Utilisation du niclosamide (GAYRAL et CAVIER, 1977)

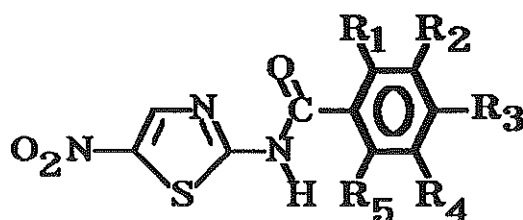
Le niclosamide est un molluscicide de référence ; c'est aussi un ténicide très actif et employé dans le traitement du téniasis de l'homme et de divers animaux.

Il est très toxique pour les Mollusques et leurs oeufs, légèrement rémanent et détruit la faune associée, en particulier les poissons, mais la restauration du milieu est très rapide.

Son insolubilité pose des problèmes de dispersion dans certains types de gîtes. Sa toxicité pour les mammifères est très faible. Il est utilisé avec succès en Rhodésie, Egypte, Brésil et Philippines.

II. DÉRIVÉS DU BNT

A. Structure



Nous avons étudié les différents dérivés cités dans le tableau II.

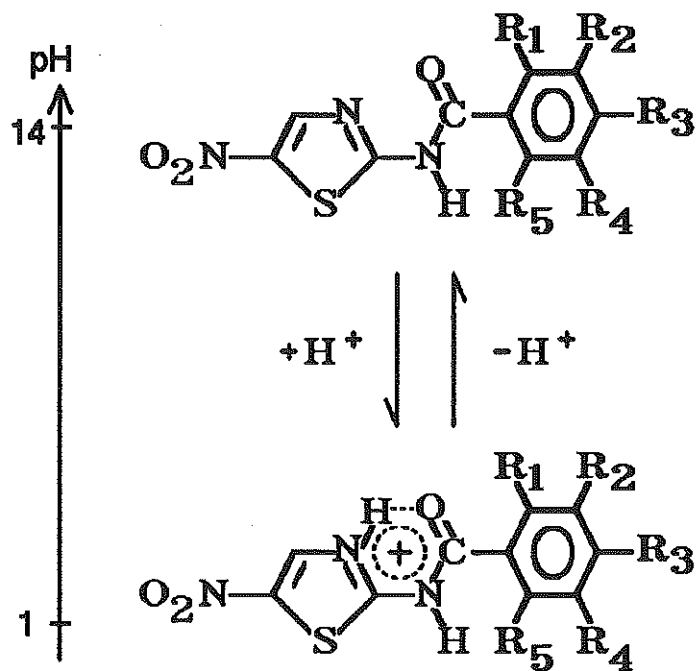


Figure 3 : Equilibre acido-basique pour les dérivés du BNT en solution aqueuse.

Noms	Paramètres	Masse Molaire (g.mol ⁻¹)	pK _a	log P	λ ₁ (nm)	log ε ₁	λ ₂ (nm)	log ε ₂
BNT		249,3	6,58	0,81	350	4,21	422	4,40
Bromo-2 BNT		328,2	6,36	1,00	345	4,17	410	4,31
Bromo-3 BNT		328,2	6,11	1,87	348	4,19	420	4,37
Dibromo-2,5 BNT		407,0	5,77	1,96	344	4,20	408	4,35
Dichloro-2,4 BNT		318,1	6,04	1,66	344	4,24	410	4,37
Dichloro-2,5 BNT		318,1	5,91	1,66	344	4,15	408	4,28

Tableau III : Les paramètres physico-chimiques des dérivés du BNT utilisés pour cette étude (CLEDAT, 1989).

K_a : constante d'acidité dans H₂O + KCl 0,1 M à 20° C ; (pK_a = -log K_a).

P : coefficient de partage octanol/eau calculé par la méthode de LEO (1983).

ε₁ : coefficient d'extinction molaire de la forme protonée en l.mol⁻¹.cm⁻¹.

ε₂ : coefficient d'extinction molaire de la forme neutre en l.mol⁻¹.cm⁻¹.

λ₁ : longueur d'onde du maximum d'absorption de la forme protonée (en nm).

λ₂ : longueur d'onde du maximum d'absorption de la forme neutre (en nm).

Les coefficients d'extinction molaire et les longueurs d'onde correspondantes ont été mesurés dans le tampon suivant : acide citrique (0,01 M)/phosphate disodique (0,02 M) + 10 % CH₃CN + KCl 0,1 M, 20° C.

B. Propriétés physico-chimiques

(FRAYSSE, 1987 ; CLEDAT, 1989 ; CLEDAT *et al.*, 1989)

1. Basicité des dérivés du BNT

Ces dérivés sont des bases faibles en milieu aqueux. Bien que la molécule de BNT contienne plusieurs atomes basiques, seule la protonation au niveau de l'azote endocyclique semble la plus plausible (figure 3).

Leur mécanisme d'action reste toutefois inconnu, mais il apparaît que la toxicité est renforcée par la présence d'atomes d'halogènes sur le cycle benzénique.

2. Lipophilie des dérivés du BNT

CLEDAT a calculé le coefficient de partage P de la molécule entre l'octanol et un tampon aqueux.

Avec des valeurs de log P comprises entre 1,2 et 2,5, les dérivés ne sont que moyennement lipophiles. Ce phénomène est sans doute imputable à la forte hydrophilie du groupement amide.

Le tableau III résume la basicité et la lipophilie des dérivés du BNT.

3. Action des dérivés du BNT (DEBORD, 1988)

Ces composés présentent une forte activité molluscicide et antiparasitaire, souvent plus marquée sur les sujets jeunes que sur les sujets adultes.

Quel que soit le mécanisme d'action exact, il semble que l'on puisse améliorer l'activité molluscicide en synthétisant des composés plus lipophiles.

En fait, ces composés possèdent une action *in vitro* comparable à celle du niclosamide. Celui-ci a été peu étudié au laboratoire.

Une étude récente a été consacrée à l'évaluation de l'activité quantitative *in vitro* des dérivés du BNT sur *Lymnaea peregra ovata* Müller par rapport au composé de référence, le niclosamide.

L'étude expérimentale de la toxicité des produits (VIGNOLES *et al.*, 1990) détermine les CL₅₀, c'est-à-dire la concentration molaire de toxique pour laquelle la probabilité de mortalité est de 50 %, en fonction du temps d'exposition. Pour notre étude, nous nous baserons sur le protocole déjà établi par VIGNOLES (1990).

CHAPITRE IV
PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

I. MILIEU DE CULTURE (GREENBLATT et SCHIFF, 1959)

A. Type de milieu utilisé

Pour cultiver les euglènes, on utilise le milieu de culture de Schiff. Il s'agit d'un milieu de croissance constitué par tous les éléments nécessaires au développement de la cellule. Il comprend deux fractions :

- une fraction organique ;
- une fraction minérale.

B. Composition des fractions

1. Fraction organique

Acide malique	0,80 g
Acide glutamique	2,00 g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,08 g
KH_2PO_4	0,16 g
H_2O qsp	200,00 ml
Vitamine B ₁	6,00 mg
Vitamine B ₁₂	26,00 µg

Cette fraction comprend :

- des sources de carbone :
 - acide D.L malique
 - acide L glutamique
- des sources d'azote :
 - acide L glutamique
 - $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
- des sources de phosphore :
 - $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
 - KH_2PO_4
- des sources de vitamines :
 - B_1
 - B_{12}

2. Fraction minérale

$\text{CaCl}_2, \text{H}_2\text{O}$	0,90 g
EDTA Na_2	0,50 g
$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,40 g
H_2SO_4 1N	10,00 ml
H_3BO_3	0,20 g
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	12,00 g
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	0,10 g
$\text{ZnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	0,30 g
H_2O qsp	1,00 l

Cette fraction concentrée peut être conservée à -20°C . La réalisation du milieu de culture s'effectue en dissolvant 4 ml de fraction minérale dans les 200 ml de fraction organique et en réalisant une dilution de moitié de cette dernière fraction dans de l'eau distillée. Ce milieu de Schiff ainsi constitué obéit aux exigences normales des euglènes. La croissance sera limitée par l'épuisement simultané des trois constituants principaux : carbone, azote, phosphore.

II. PROTOCOLE D'ÉTUDE

Nous réalisons les essais à l'aide de prélèvements provenant de la souche d'euglènes contenant le milieu décrit ci-dessus. Deux séries d'essais sont pratiquées pour chaque produit toxique, l'une à pH 3,5, l'autre à pH 7,2.

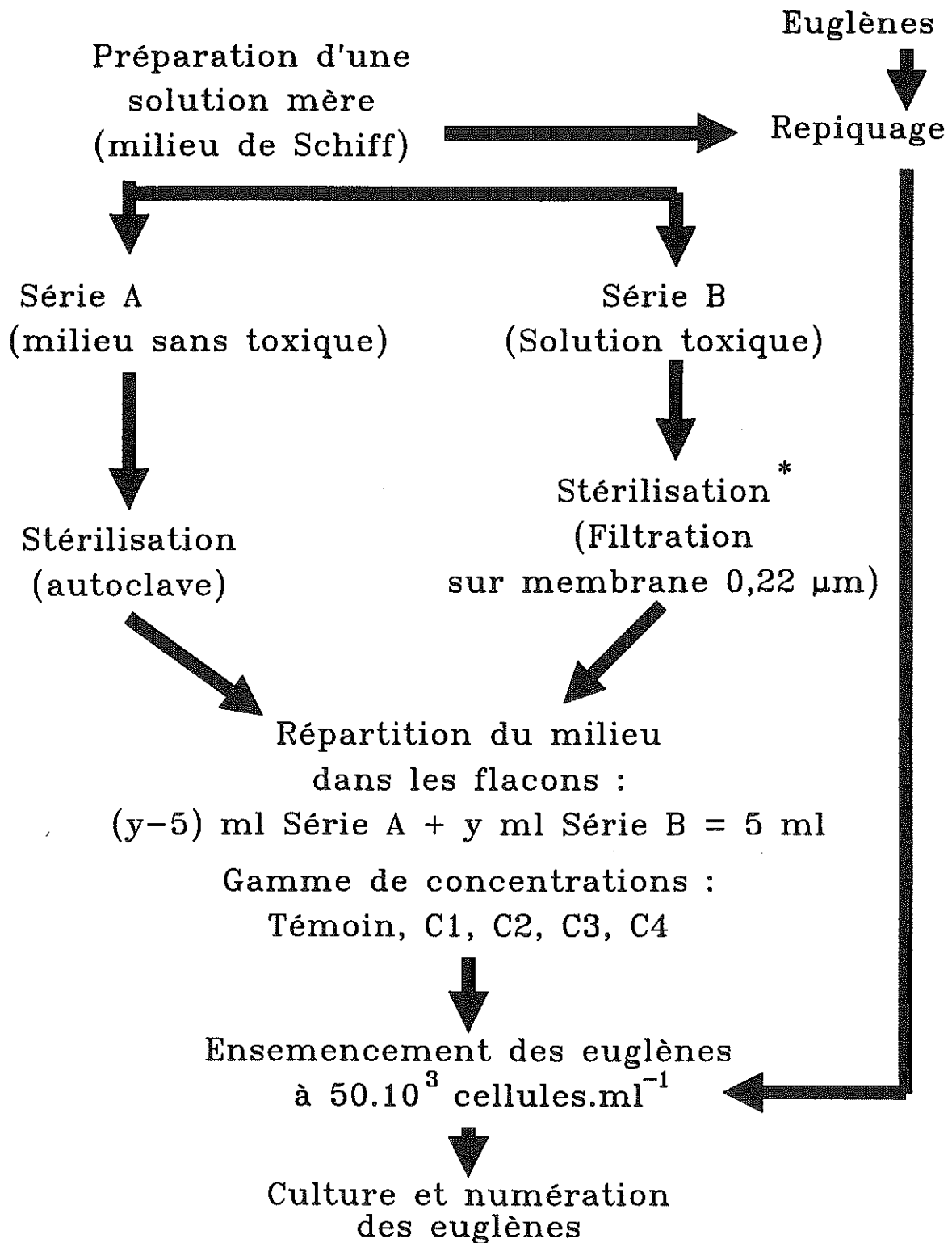


Figure 4 : Schéma du protocole d'étude utilisé pour les euglènes.

* : Dosage spectrophotométrique réalisé après filtration.

Ce type de protocole est utilisé pour :

- Les dérivés du BNT : à pH 3,5, ils sont sous forme protonée et à pH 7,2, on trouve essentiellement la forme neutre de la molécule.
- Le niclosamide : il se présente sous sa forme neutre à pH 3,5 et sous forme ionisée à pH 7,2.

A chaque pH, nous suivons la croissance d'un témoin cultivé dans le milieu contenant du PEG 400 sans toxique et d'un lot cultivé dans le même milieu avec le toxique. Ce protocole d'étude est détaillé dans la figure 4.

III. MODE OPÉRATOIRE

A. Préparation du milieu de maintenance

Nous préparons 200 ml de milieu sans les vitamines avec :

- la fraction organique : les poudres correspondantes sont pesées et dissoutes dans un erlen-meyer contenant 196 ml d'eau distillée préalablement tiédie ;
- la fraction minérale : 4 ml de la solution conservée au congélateur est ajoutée après liquéfaction.

Nous mettons l'ensemble sous agitation pour bien homogénéiser. Le pH du mélange est alors de 3,5, ce qui limite les développements bactériens.

A partir des 200 ml préparés, nous prélevons 25 ml auxquels nous ajoutons 25 ml d'eau distillée et la quantité de vitamines nécessaire. Le milieu obtenu constitue alors le milieu de maintenance permettant le repiquage des euglènes. La souche d'euglènes sera repiquée régulièrement tous les quinze jours et au moins trois jours avant l'expérimentation afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour les essais avec un inoculum de volume le plus faible possible. Ce rythme de repiquage permet aussi un bon renouvellement de la culture avec une diminution du temps de latence.

B. Préparation des milieux aux deux pH

- A pH 3,5, nous préparons un flacon comprenant :
 - 25 ml de milieu
 - x ml de PEG sans toxique

- 50 - (x + 25) ml d'eau distillée.
- A pH 7,2, le deuxième flacon contient :
 - 25 ml de milieu
 - y ml de KOH (utilisée pour ramener le pH à 7,2)
 - x ml de PEG sans toxique
 - 50 - (x + y + 25) ml d'eau distillée.

Ces deux flacons sont ensuite bouchés et enveloppés dans des feuilles d'aluminium pour être soumis à la stérilisation. Celle-ci est réalisée à l'autoclave pendant 20 min à 120 °C.

Les milieux stérilisés sont ensuite conservés, avant ensemencement, dans un réfrigérateur. Ils constituent la série A.

C. Préparation du milieu toxique

1. Préparation des solutions toxiques

Les produits à évaluer sont insolubles en milieu aqueux et il est donc indispensable d'utiliser un solvant organique comme le polyéthylène glycol 400 (PEG 400).

On calcule la quantité de produit à dissoudre dans le PEG 400 en fonction de la dilution, afin d'obtenir des solutions mères à 1 g.l⁻¹.

2. Préparation du milieu toxique

Comme précédemment (paragraphe III, 2), nous préparons deux milieux, l'un à pH 3,5 l'autre à pH 7,2, mais nous remplaçons le volume x ml de PEG 400 sans toxique par le même volume de solution toxique.

Le milieu est ensuite filtré sur une membrane de cellulose stérile de 0,22 µm de porosité. Cette technique a été préférée à l'autoclavage qui dénature les molécules de BNT.

Ce milieu constitue la série B.

3. Répartition du milieu

Nous travaillons avec des flacons en polystyrène, type boîte de Roux car ils offrent beaucoup d'avantages par rapport aux erlens-meyers : le volume de milieu est plus faible (5 ml contre

50 ml) ; l'évaporation est réduite ; l'adhérence des cellules contre les parois est faible ; la manipulation est plus aisée et les risques de contamination sont diminués.

On réalise une gamme de concentrations en répartissant le milieu autoclavé et le milieu filtré en proportions variables de telle sorte que l'on ait un volume final de 5 ml par flacon avec une concentration constante en PEG 400.

On introduit :

- y ml de milieu filtré de la série B ;
- (5 - y) ml de milieu autoclavé de la série A.

Les vitamines B₁ et B₁₂ sont introduites dans des conditions stériles dans chaque flacon. Elles sont conservées à +4 °C au réfrigérateur sous forme de solutions concentrées.

La répartition du milieu se fait sous une hotte à flux laminaire et près de la flamme pour éviter une prolifération bactérienne qui nuirait à la croissance des algues.

4. Ensemencement des euglènes

L'ensemencement s'effectue à partir d'une souche-mère cultivée dans le milieu de maintenance. On inocule alors les euglènes avec un volume tel que l'on ait, en début d'expérience, 50.10^3 cellules.ml⁻¹ par flacon.

Pour la manipulation de petits volumes, nous utilisons des micropipettes automatiques Gilson® munies de cônes stériles.

5. Culture et numération des euglènes (MILLET, 1984)

a. Culture

Les milieux sont homogénéisés puis placés dans une enceinte climatique, à la température de 25 °C ± 1 °C. Les cultures sont alors soumises à une période d'éclairement nyctéméral (12 heures diurnes et 12 heures nocturnes) pendant une durée de 12 jours. Les euglènes entament leur cycle de croissance grâce à une division cellulaire intense.

La cinétique de la croissance d'une culture d'euglènes sur le milieu de Schiff se décompose en trois phases principales :

- la phase de latence, courte, est la période d'adaptation de l'algue à son nouveau milieu ;

Nombre de cellules vivantes/ml

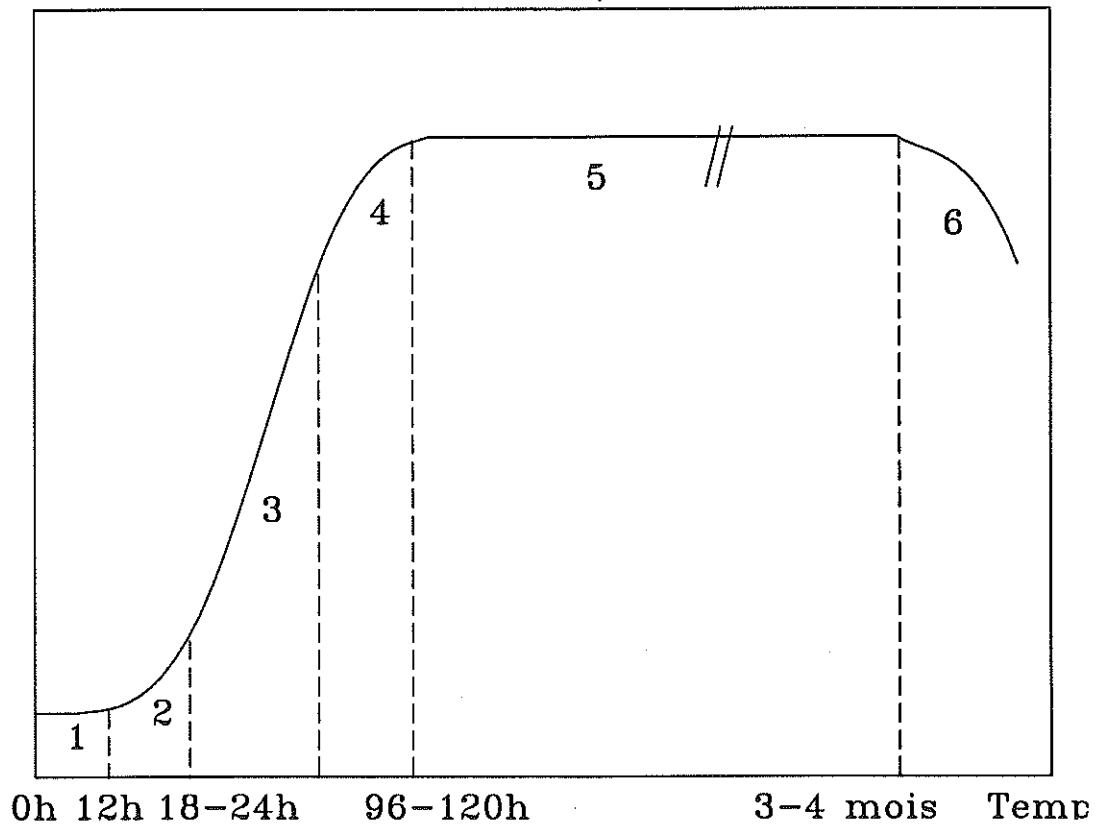


Figure 5: Courbe de croissance théorique des euglènes.

- 1 : Phase de latence.
- 2-4 : Phase de croissance (3 : phase de croissance exponentielle).
- 5 : Phase stationnaire ou plateau.
- 6 : Phase de décroissance.

- la phase de croissance exponentielle est la période où la vitesse de multiplication des algues est maximale ;
- la phase stationnaire indique un arrêt de la croissance de la population en raison de l'épuisement du milieu. Cette période est la plus longue du cycle et se termine par une augmentation importante de la mortalité des cellules.

Ces trois phases se retrouvent dans les cultures à l'obscurité et à la lumière. Nous pouvons représenter ces phases sur une courbe théorique (figure 5).

b. Numération des euglènes

Le rythme des numérations a été établi en fonction de la courbe de croissance des cellules :

Nombre de jours (J) après le début de l'expérience	Nombre de numérations par jour
J ₀ (ensemencement)	1
J ₁ à J ₃	2
J ₄ à J ₁₂	1

Le comptage est effectué à l'aide d'un microscope et d'une cellule de Malassez. Cette dernière est une épaisse lame de verre au centre de laquelle se trouve une ou deux plates-formes rectangulaires comportant en leur centre un quadrillage gravé. Le quadrillage total est composé de 100 rectangles de 1/4 mm de longueur et de 1/5 mm de largeur. Chaque rectangle correspond à un volume de 1/100 mm³ et l'ensemble des 100 rectangles à 1 mm³ soit 1 µl.

Dans ces conditions, il est possible de déterminer le volume exact de la culture entre lame et lamelle. Les valeurs obtenues sont ramenées au millilitre.

Pour chaque comptage on effectue deux prélèvements sous la hotte, près de la flamme du bec Bunsen : le premier est fixé dans l'acide sulfochromique à 1 % ; la fixation est immédiate et le comptage peut être effectué aussitôt. Cette fixation est indispensable car les euglènes sont flagellées et donc mobiles. Le deuxième prélèvement est coloré par le bleu trypan qui permet de dénombrer les cellules mortes. On en déduit donc :

nombre de cellules vivantes = nombre de cellules fixées diminué du nombre de cellules colorées.

A

Nombre de cellules par ml	Volume prélevé en μ l	Volume d'acide sulfochromique en μ 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 μ l	Volume de bleu trypan en μ l	Volume d'eau distillée en μ 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 IV : Volumes utilisés en fonction du nombre de cellules par ml :
- pour la fixation des euglènes (A).
- pour la coloration des cellules mortes (B).

Pour réaliser les mélanges avec ces solutions respectives, on utilise des proportions variables adaptées à la concentration en cellules dans les flacons de façon à obtenir un nombre d'euglènes environ égal à 100 dans le quadrillage de la cellule de Malassez.

Les volumes de mélanges respectifs sont présentés dans le tableau IV.

Deux essais par concentration sont réalisés. Les résultats obtenus correspondent à la moyenne de ces deux essais.

6. Dosage spectrophotométrique des solutions toxiques

Les dérivés du BNT ont une solubilité très faible en milieu aqueux. Ils sont d'autre part instables dans ce milieu ainsi qu'à la lumière. Aussi, les solutions mères ne sont préparées qu'avec du PEG 400 et conservées ensuite à l'abri de la lumière.

La précipitation des toxiques est parfois importante lorsqu'on les dissout dans le milieu de culture et la filtration entraîne souvent un pourcentage de perte très élevé. Ceci nous a donc conduit à doser le produit par spectrophotométrie, après filtration, en utilisant le protocole suivant :

	Forme acide	\rightleftharpoons	Forme basique
	BH^+		$B + H^+$
Coefficient d'extinction	ϵ_1		ϵ_2
Longueur d'onde d'absorbance	λ_1		λ_2
Concentration à l'équilibre	C_1		C_2

Ecrivons la constante d'acidité :

$$K_a = \frac{[H^+] C_2}{C_1}$$

posons :

$$x = \frac{C_2}{C_1} = \frac{K_a}{[H^+]} = 10^{pH - pK_a}$$

Soit C la concentration totale en base faible :

$$C = C_1 + C_2 = C_1 (1 + x) = C_2 \left(1 + \frac{1}{x}\right)$$

on en déduit :

$$C_1 = C \frac{1}{1 + x} \quad \text{et} \quad C_2 = C \frac{x}{1 + x}$$

L'absorbance A de la solution à une longueur d'onde donnée, dans une cuve de trajet optique L , est :

$$A = \epsilon_1 LC_1 + \epsilon_2 LC_2 = LC \frac{\epsilon_1 + \epsilon_2 x}{1 + x}$$

donc :

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

Lorsque le pH du milieu est égal à 3,5, nous mesurons l'absorbance de la solution à λ_1 nm (pic de la forme protonée). A cette longueur d'onde, la forme neutre n'absorbe pas ($\epsilon_2 = 0$) et donc l'équation (1) se résume à :

$$C = \frac{A}{L} \frac{1 + x}{\epsilon_1}$$

Lorsque le milieu a un pH égal à 7,2, l'absorbance est mesurée à λ_2 nm (pic de la forme neutre). A cette longueur d'onde, la forme protonée n'absorbe pas ($\epsilon_1 = 0$) et donc l'équation (1) devient :

$$C = \frac{A}{L} \frac{1 + x}{\epsilon_2 x}$$

CHAPITRE V
RÉSULTATS OBTENUS

I. OBSERVATIONS QUALITATIVES

A. Cellules vivantes sur cellules de Malassez

1. Organites visibles

Les euglènes possèdent deux flagelles dans la région antérieure de la cellule. Un seul dépasse du goulot et est visible au microscope optique par différence de contraste.

Les plastes sont colorés en vert et sont localisés en bordure de la cellule. Le stigma est de couleur rouge ; il est quelquefois visible selon l'incidence de la cellule.

On devine la présence du noyau dans la région centrale de la cellule en raison de l'absence de plastes à ce niveau.

Les autres constituants ne sont pas visibles au grossissement utilisé pour la numération.

2. Mobilité

Les euglènes se déplacent en faisant un mouvement hélicoïdal consécutif aux battements du flagelle. Parfois, elles présentent de nombreuses déformations (étirement, contraction).

La mobilité dépend du pH :

- A pH 3,5, les cellules ont une mobilité réduite pendant les trois premiers jours de l'expérience. Elles présentent cependant une alternance de contractions et de distorsions.

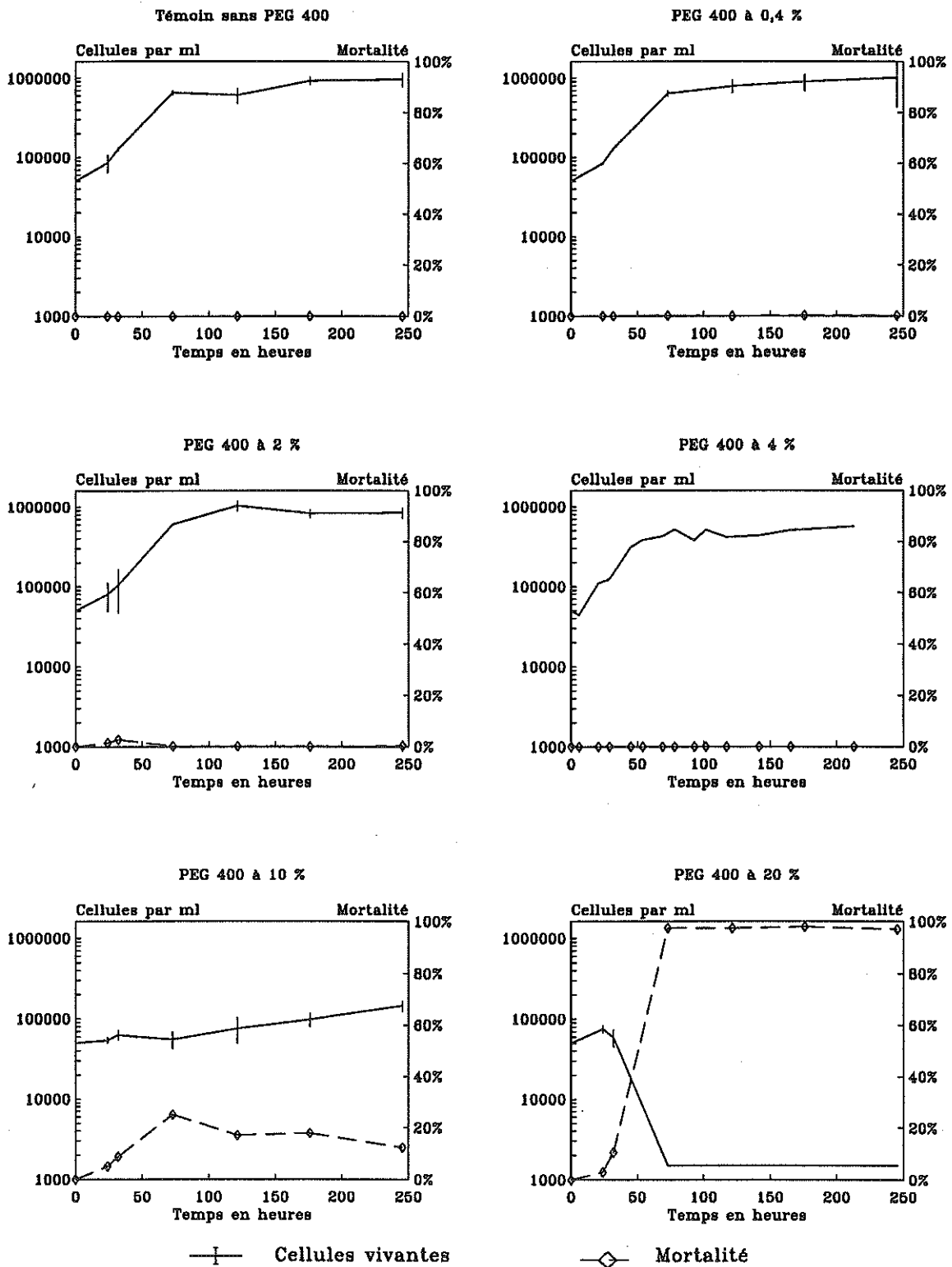


Figure 6 : Evolution de la croissance et de la mortalité chez les euglènes en fonction du temps : sans PEG 400 (graphe a) et avec différentes concentrations de solvant (graphes b à f). Les valeurs moyennes sont indiquées avec les écarts-types correspondants. La croissance est exprimée par le nombre de cellules vivantes par ml.

- A pH 7,2, elles sont immédiatement mobiles.

B. Cellules mortes sur cellule de Malassez

Elles se présentent généralement sous forme globulaire régulière de 5 à 10 μm de diamètre. Dans certains cas, nous avons pu observer des cellules mortes allongées, de même longueur que les cellules vivantes, mais plus étroites que celles-ci.

Nous n'avons pas noté de modification morphologique en fonction du pH.

II. OBSERVATIONS QUANTITATIVES

A. Action du PEG 400

Le milieu de culture utilisé pour la croissance des euglènes contient une certaine concentration de PEG 400 destiné à solubiliser les produits toxiques. On a pu constater que ce solvant influe sur le développement des algues.

En soumettant une colonie d'euglènes à des dilutions croissantes de PEG 400, respectivement égales à 0,4 %, 2 %, 4 %, 10 % et 20 %, nous avons dégagé les constatations suivantes :

- Aux dilutions 0,4 % et 2 %, la croissance des euglènes est équivalente à celle des témoins (sans PEG 400). Le nombre de cellules mortes est alors négligeable.
- La dilution à 4 % entraîne une croissance légèrement ralentie. En effet, le nombre de cellules en phase stationnaire est sensiblement plus faible que chez les témoins ; le nombre de cellules mortes est également négligeable.
- Pour les dilutions supérieures à 4 %, nous notons un effet cytotatique, c'est-à-dire une diminution de la croissance, et un effet cytotoxique se traduisant par une augmentation du nombre de cellules mortes.

Ces constatations sont résumées sur la figure 6.

Le pH n'a qu'un effet minime sur l'action du solvant car les constatations sont semblables quel que soit le pH.

Nous avons donc utilisé, dans notre étude, une dilution de solvant inférieure à 4 % pour obtenir une croissance correcte.

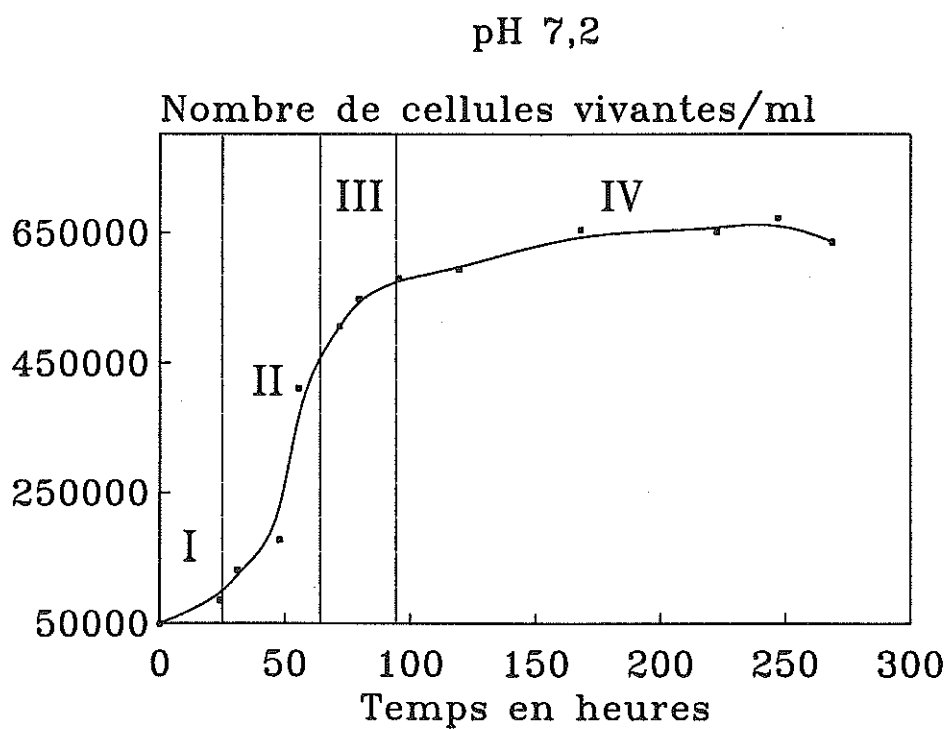
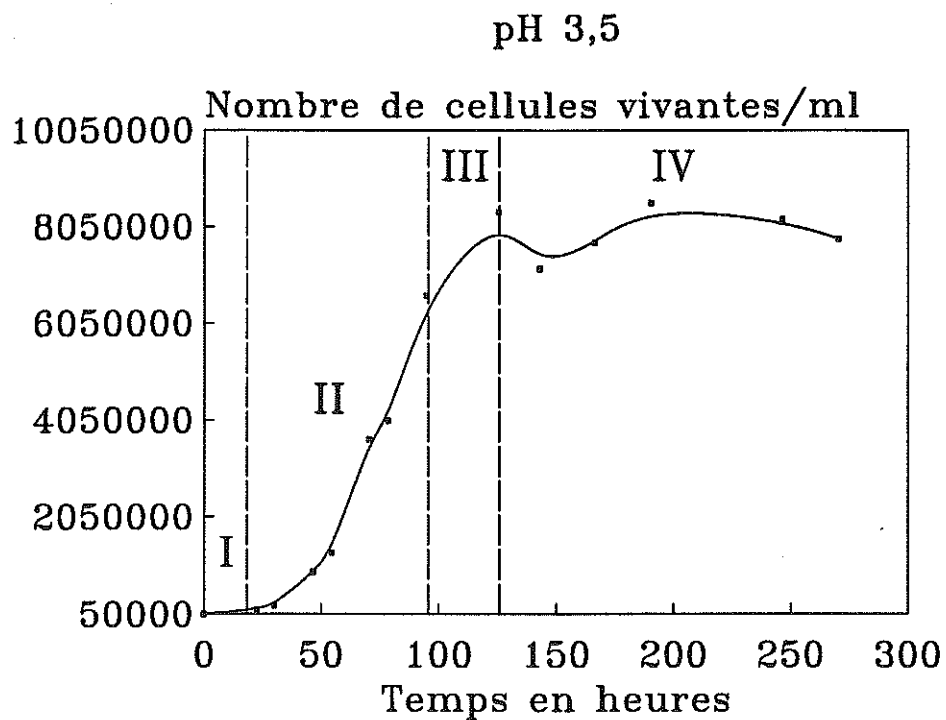


Figure 7 : Croissance des euglènes témoins cultivées à pH 3,5 (graphe a) et à pH 7,2 (graphe b) en présence de PEG 400 (concentration inférieure à 4 %), sans produit toxique.

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

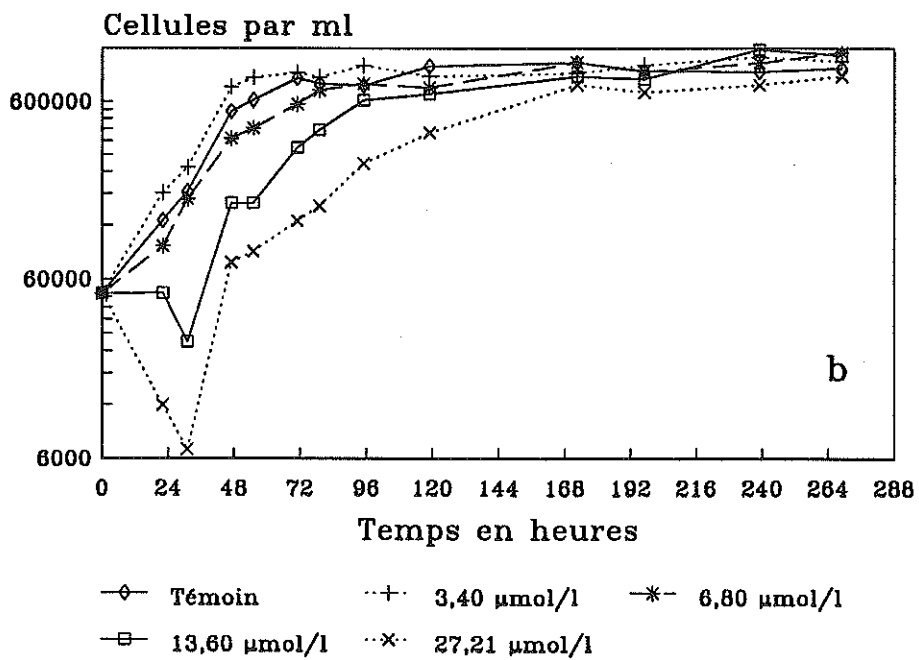
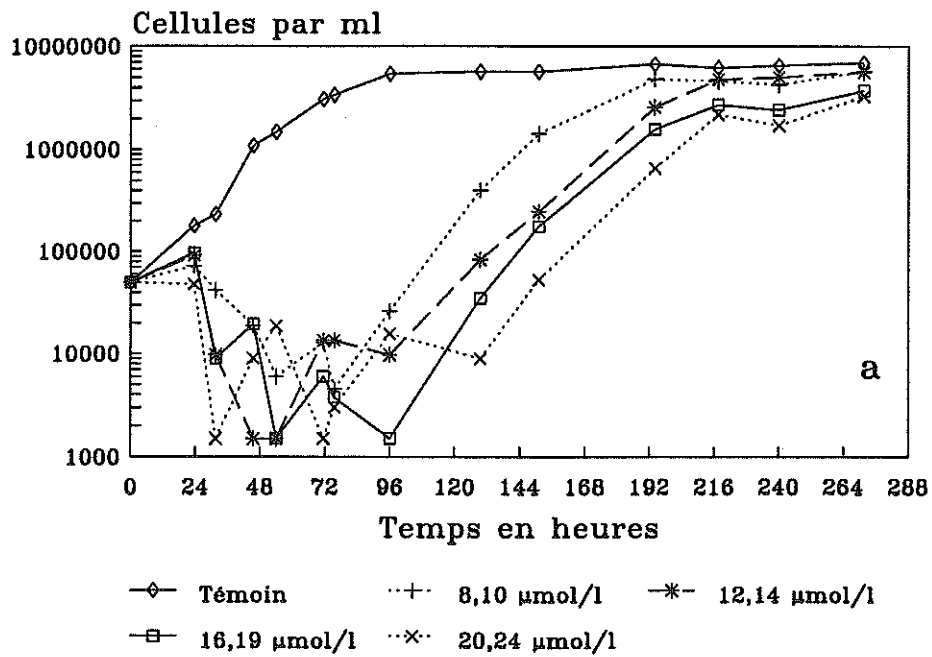


Figure 8 : Croissance des euglènes avec différentes concentrations en dichloro-2,5 BNT à pH 3,5 (graphe a) et à pH 7,2 (graphe b). Chaque graphe montre une série de courbes de croissance.

B. Croissance des euglènes témoins

Le pH a une influence sur la croissance des algues :

- à pH 3,5, le nombre maximal de cellules vivantes par millilitre est compris entre 6.10^6 et 10.10^6 ;
- à pH 7,2, le même paramètre est compris entre $0,6.10^6$ et 10^6 cellules vivantes.ml⁻¹.

Les différentes phases de la courbe théorique de croissance sont retrouvées, sur les courbes de croissance des témoins à pH 3,5 et pH 7,2 représentées sur la figure 7.

On observe quelques variations :

- Les premières numérations débutent 20 heures après l'ensemencement, ainsi, la phase de latence se confond avec la phase de démarrage.
- A pH 7,2, la phase exponentielle a une durée plus brève qu'en milieu acide ; ce phénomène peut s'expliquer par la différence de mobilité des euglènes existant entre les deux pH.

C. Croissance des euglènes soumises au toxique

1. Euglènes vivantes

La figure 8 montre, à titre d'exemple, la croissance des euglènes à pH 3,5 et pH 7,2 pour le dichloro-2,5 BNT.

On peut constater que :

- La durée de la phase exponentielle est plus courte à pH 7,2 qu'à pH 3,5. De plus, le nombre maximum de cellules en phase stationnaire est plus faible à pH neutre qu'en milieu acide.
- La croissance est de plus en plus retardée quand la concentration en produit augmente ; ceci se traduit par une apparition plus tardive de la phase exponentielle.

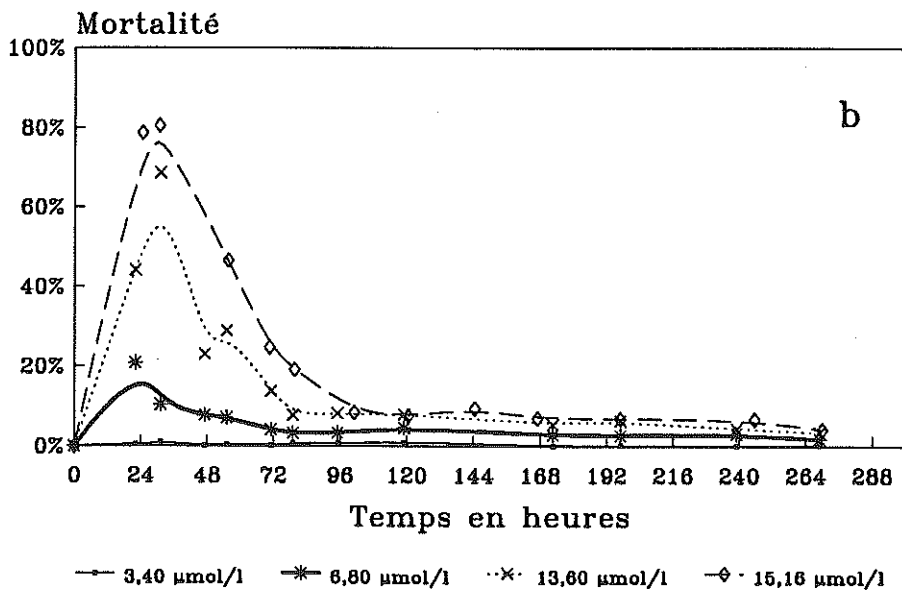
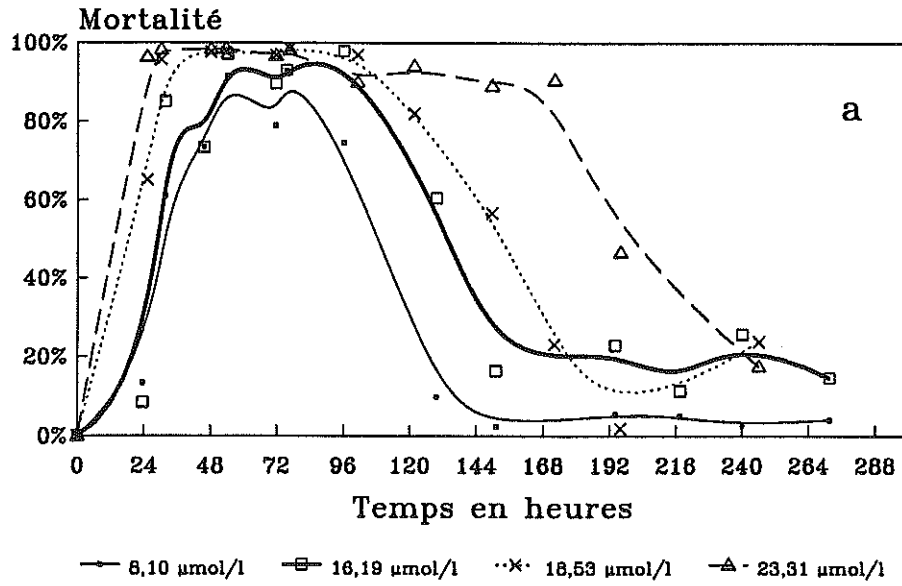


Figure 9 : Evolution du taux de mortalité des euglènes au cours du temps en fonction de la concentration en dichloro-2,5 BNT à pH 3,5 (graphe a) et à pH 7,2 (graphe b).

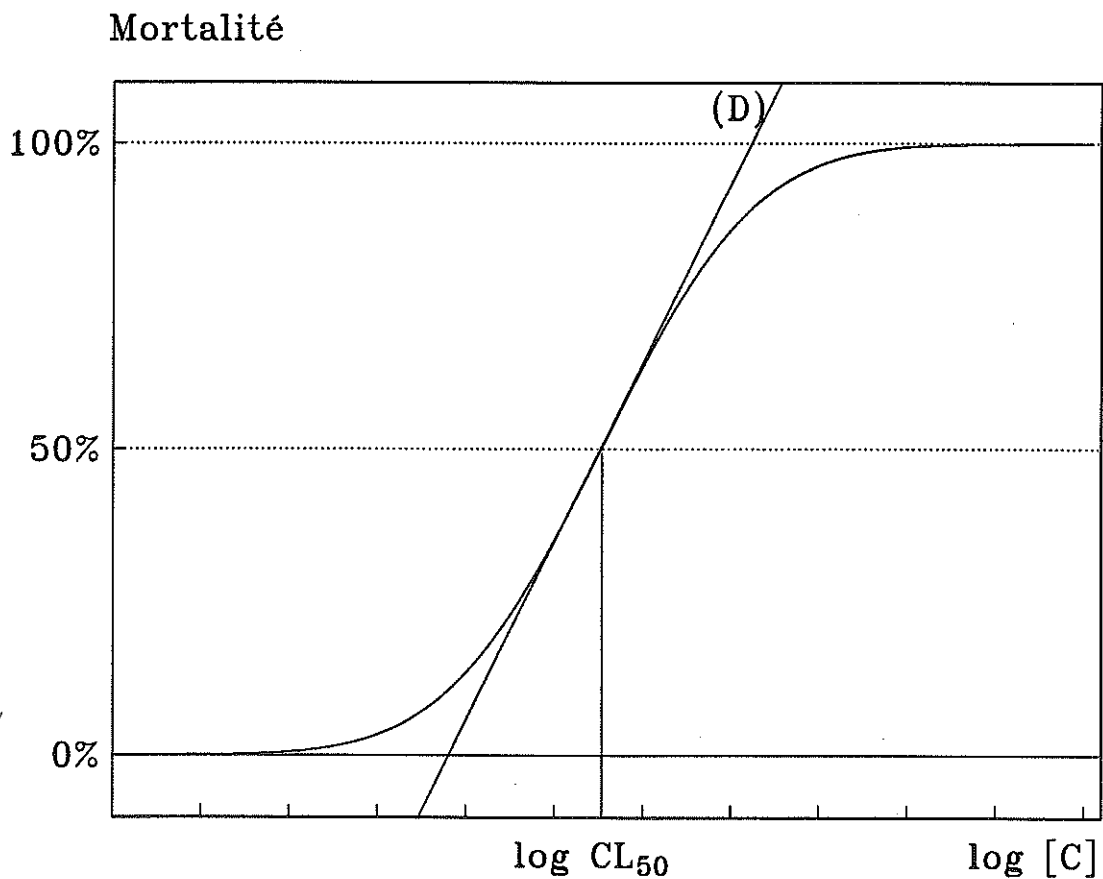


Figure 10 : Schématisation de la détermination de la CL₅₀ pour les limnées et les gammares.

$pCL_{50} = -\log CL_{50}$. La CL₅₀ est la concentration pour laquelle on observe une mortalité égale à 50 %. Ce paramètre est déterminé à partir des résultats expérimentaux par régression non linéaire pour les limnées et les gammares, et par régression linéaire sur les valeurs comprises entre 5 % et 95 % de mortalité pour les euglènes.

(D) : Représentation de la droite de régression.

2. Euglènes mortes (VIGNOLES, 1990)

Si l'on considère l'exemple du dichloro-2,5 BNT aux mêmes pH, nous pouvons constater que la mortalité augmente, d'une part, en fonction de la concentration en produit, et, d'autre part, pendant les premières 24 heures de l'expérience pour une concentration donnée.

La figure 9 illustre ces remarques.

III. PARAMÈTRES ÉTUDIÉS (VIGNOLES *et al.*, 1990 b)

A. Taux de mortalité

Ce taux est calculé en réalisant le rapport entre le nombre de morts par millilitre dans l'essai à l'instant t , et l'effectif total des cellules par millilitre dans cet essai au même instant. Le nombre de cellules mortes est égal au nombre de cellules colorées par le bleu trypan.

On multiplie par 100 le rapport pour définir le pourcentage de mortalité.

La figure 9 représente, à titre d'exemple, l'évolution de ce pourcentage au cours du temps pour le dichloro-2,5 BNT aux deux pH.

B. Concentration létale à 50 % : CL_{50}

La concentration létale à 50 % est la concentration de toxique pour laquelle le taux de mortalité des cellules est de 50 %. On la calcule en fonction du logarithme de la concentration. En pratique, on utilise pCL_{50} ($-\log CL_{50}$; CL_{50} en mol.l^{-1}).

La figure 10 schématise le calcul de la CL_{50} .

La partie médiane de la courbe de mortalité, c'est-à-dire les points expérimentaux compris entre 5 % et 95 % de mortalité, est assimilable à une droite d'équation :

$$p = ax + b$$

$x = \log [C]$; $[C]$ est la concentration de produit en mol.l^{-1} ;
a et b : coefficients de régression.

a et b sont estimés par la régression linéaire des pourcentages de mortalité observés, $y(i)$, sur les logarithmes des concentrations, $x(i)$:

$$a = \frac{\sum(x(t)y(t)) - \frac{\sum x(t)\sum y(t)}{N'}}{\sum x(t)^2 - \frac{(\sum x(t))^2}{N'}} \quad \text{et} \quad b = \frac{1}{N'}(\sum y(t) - a \sum x(t))$$

où N' désigne le nombre de points situés dans la partie moyenne de la courbe. On a alors :

$$am + b = 0,5 \text{ donc } m = -pCL_{50}$$

C. Pourcentage de modification de croissance

Ce pourcentage de modification est calculé de la façon suivante :

$$x(t) = 100 \frac{\mu_E}{\mu_T}$$

μ_E : taux de croissance maximum de l'essai ;

μ_T : taux de croissance maximum du témoin.

$$\text{Or } \mu_E = \frac{\log N_1(E) - \log N_{\min}}{t_1 - t_0} \quad \text{et} \quad \mu_T = \frac{\log N_1(T) - \log N_{\min}}{t_1 - t_0}$$

$$\text{d'où } \frac{\mu_E}{\mu_T} = \frac{\log N_1(E) - \log N_{\min}}{\log N_1(T) - \log N_{\min}}$$

$$\text{Conclusion } x(t) = 100 \frac{\log N_1(E) - \log N_{\min}}{\log N_1(T) - \log N_{\min}}$$

avec :

$N_1(E)$ = Nombre de cellules par ml dans l'essai à l'instant t ;

$N_1(T)$ = Nombre de cellules par ml dans le témoin au même instant ;

N_{\min} = Nombre minimal de cellules par ml.

En pratique, nous calculons ce pourcentage pour des valeurs de t égales à 24, 48, 72 et 96 h.

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
Bromo-2 BNT	1,57	4,14	< 4	< 4	4,22	4,29	4,17	4,02
Bromo-3 BNT	4,17	4,28	4,38	4,43	5,37	5,20	5,09	5,03
Dibromo-2,5 BNT	5,26	5,21	5,02	4,91	5,03	4,86	4,73	4,62
Dichloro-2,4 BNT	5,45	5,41	5,25	5,13	< 4	4,86	5,04	5,03
Dichloro-2,5 BNT	5,08	5,04	4,97	4,86	4,94	4,73	4,48	4,34
Niclosamide	5,29	5,31	5,31	5,31	5,13	4,97	4,71	4,37

Tableau V : Résultats de la mortalité d'*E. gracilis* pour chaque produit étudié en fonction du temps de l'expérience et du pH.

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

Modification

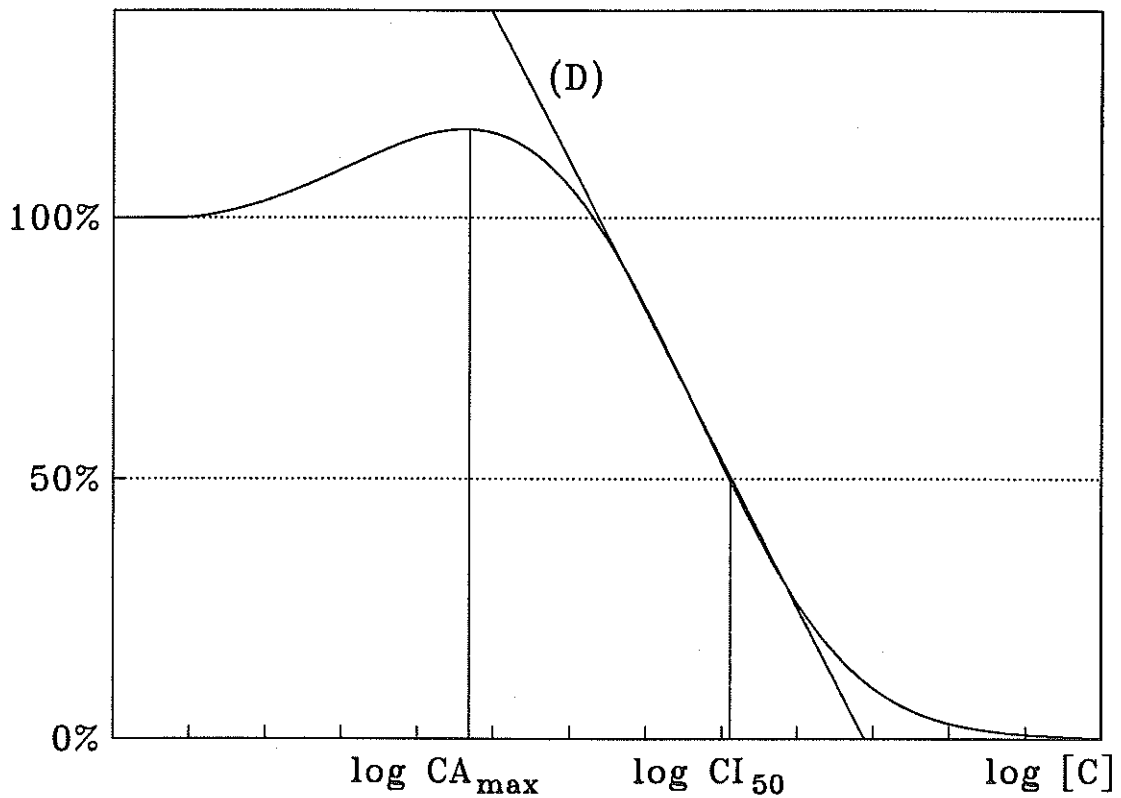


Figure 11 : Détermination des CA_{max} et CI_{50} pour les euglènes.

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.

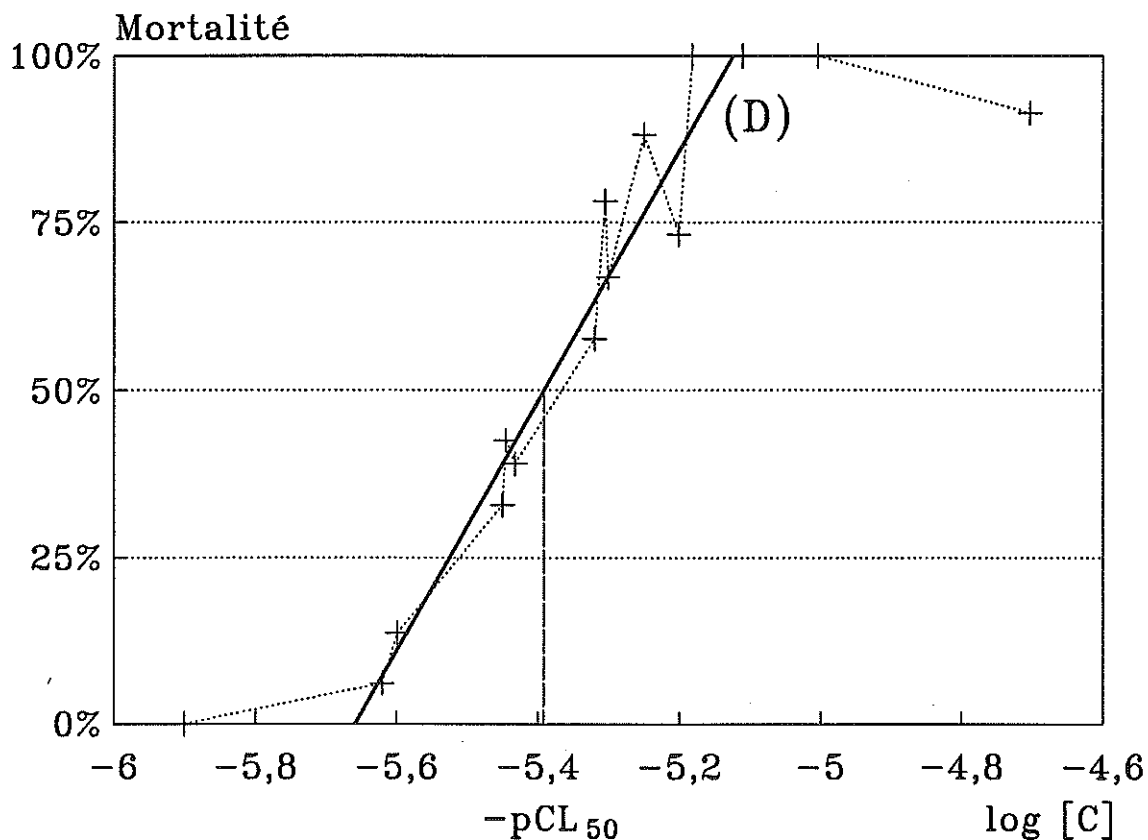


Figure 12 : Schématisation de la détermination de la CL_{50} pour les euglènes à partir des valeurs expérimentales obtenues avec le dichloro-2,4 BNT à pH 3,5 et à la 48^e heure.

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

(D) : Représentation de la droite de régression.

D. Concentration inhibitrice : CI_{50}

Il s'agit de la concentration de toxique réduisant de 50 % la croissance des algues. En pratique, on définit pCI_{50} ($-\log CI_{50}$; CI_{50} en mol.l^{-1}).

En traçant les courbes $x(t) = f(\log [C])$ à un instant t , on peut calculer la CI_{50} par régression linéaire.

E. Concentration activatrice maximale : CA_{\max}

Nous avons constaté que pour certaines concentrations en produits et à certains temps d'exposition, la croissance de la population d'algues soumises au toxique pouvait être plus rapide que celle des euglènes témoins ; CA_{\max} représente donc l'activation maximale de la croissance. Ce paramètre correspond à l'abscisse du maximum de la courbe $x(t) = f(\log [C])$ à l'instant t .

La figure 11 représente la détermination de CA_{\max} et CI_{50} avec une régression de type linéaire.

IV. RÉSULTATS

Le but de notre étude est d'apprécier la sensibilité des euglènes aux différents produits à partir des CL_{50} et des CI_{50} calculées.

A. Mortalité des euglènes

Le calcul de la CL_{50} , dans le cas de l'intoxication des algues par le dichloro-2,4 BNT à pH 3,5 et à la 48^e h, est représenté dans la figure 12.

Nous avons regroupé, dans le tableau V, les valeurs de pCL_{50} obtenues pour les produits étudiés en fonction du temps d'exposition et du pH de culture.

La lecture de ce tableau montre que la toxicité globale de certains dérivés du BNT diminue au cours du temps : c'est le cas du dibromo-2,5 BNT et du dichloro-2,5 BNT. De plus, elle permet de dégager les points suivants :

- A pH 3,5, le produit le plus toxique est le dichloro-2,4 BNT (la pCL_{50} de ce produit passe de 5,45 à 5,13 de la 24^e à la 96^e h).
A pH 7,2, le bromo-3 BNT apparaît comme le produit le plus efficace.

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
Bromo-2 BNT	3,96	4,08	3,99	3,82	4,39	4,44	4,39	4,30
Bromo-3 BNT	4,65	4,67	4,67	4,58	4,89	4,94	5,02	4,99
Dibromo-2,5 BNT	5,12	5,11	5,01	< 5	4,84	4,77	4,69	4,60
Dichloro-2,4 BNT	4,96	5,00	5,06	4,95	4,06	4,62	4,75	4,78
Dichloro-2,5 BNT	5,07	4,97	4,85	4,75	4,80	4,65	4,49	4,35
Niclosamide	5,14	5,38	5,37	5,37	5,21	5,14	5,07	4,95

Tableau VI : Valeurs des pCl_{50} obtenues pour les euglènes en fonction de la durée de l'expérience et du pH.

pCl_{50} : $-\log Cl_{50}$; Cl_{50} en $mol.l^{-1}$

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
Bromo-2 BNT	5,35	5,70	5,28	5,24	*	*	5,08	5,04
Bromo-3 BNT	5,29	5,29	5,32	5,33	*	*	5,71	5,66
Dibromo-2,5 BNT	5,96	5,87	5,85	5,85	6,02	5,99	5,22	5,18
Dichloro-2,4 BNT	6,79	6,40	6,14	6,06	*	*	6,22	5,73
Dichloro-2,5 BNT	5,84	6,16	5,70	5,60	5,58	5,67	5,42	5,30
Niclosamide	6,12	6,04	6,11	6,04	6,66	6,55	6,71	6,01

Tableau VII : 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 mol.l^{-1}

* : absence d'activation.

- Quel que soit le pH, le dérivé le moins toxique est le bromo-2 BNT : il possède les valeurs de pCL_{50} les plus faibles sur l'ensemble de l'expérience.
- Si on compare les valeurs du niclosamide à celles obtenues avec les dérivés du BNT, on constate que le dichloro-2,4 BNT a une toxicité supérieure à celle du produit de référence jusqu'à la 48^e h d'exposition et à pH 3,5.
A pH 7,2, le bromo-3 BNT est plus toxique que le niclosamide quelle que soit la durée de l'expérience.

B. Effets sur la croissance

1. Inhibition de la croissance

Les valeurs de pCI_{50} sont indiquées pour chaque pH et chaque produit dans le tableau VI.

Ce dernier nous indique que :

- Les dérivés inhibant le plus la croissance des euglènes sont le dibromo-2,5 BNT et le dichloro-2,4 BNT à pH 3,5, et le bromo-3 BNT à pH 7,2.
- Pour d'autres produits, la variation de l'effet inhibiteur au cours du temps est plus complexe : l'accroissement de l'inhibition est constaté pour le dichloro-2,4 BNT à pH 7,2 ; l'effet inverse s'observe pour le dichloro-2,5 BNT aux deux pH. L'inhibition obtenue avec certains produits passe par un maximum dans le temps ; cet optimum est atteint à la 48^e h pour le bromo-2 BNT quel que soit le pH.
- Le niclosamide possède aussi un effet inhibiteur marqué car les valeurs de pCI_{50} sont supérieures à 5. En effet, il s'agit du produit qui inhibe le plus la croissance des algues pour les deux pH quelle que soit la durée de l'expérience.

2. Activation de la croissance

Les résultats sont présentés dans le tableau VII. L'examen de ce dernier permet de formuler les remarques suivantes :

- Les pCA_{max} du dibromo-2,5 BNT et du dichloro-2,4 BNT diminuent au cours du temps, quel que soit le pH. Cette diminution s'observe à pH 7,2 pour le bromo-2 BNT et de manière moins évidente pour le bromo-3 BNT et le dichloro-2,4 BNT.

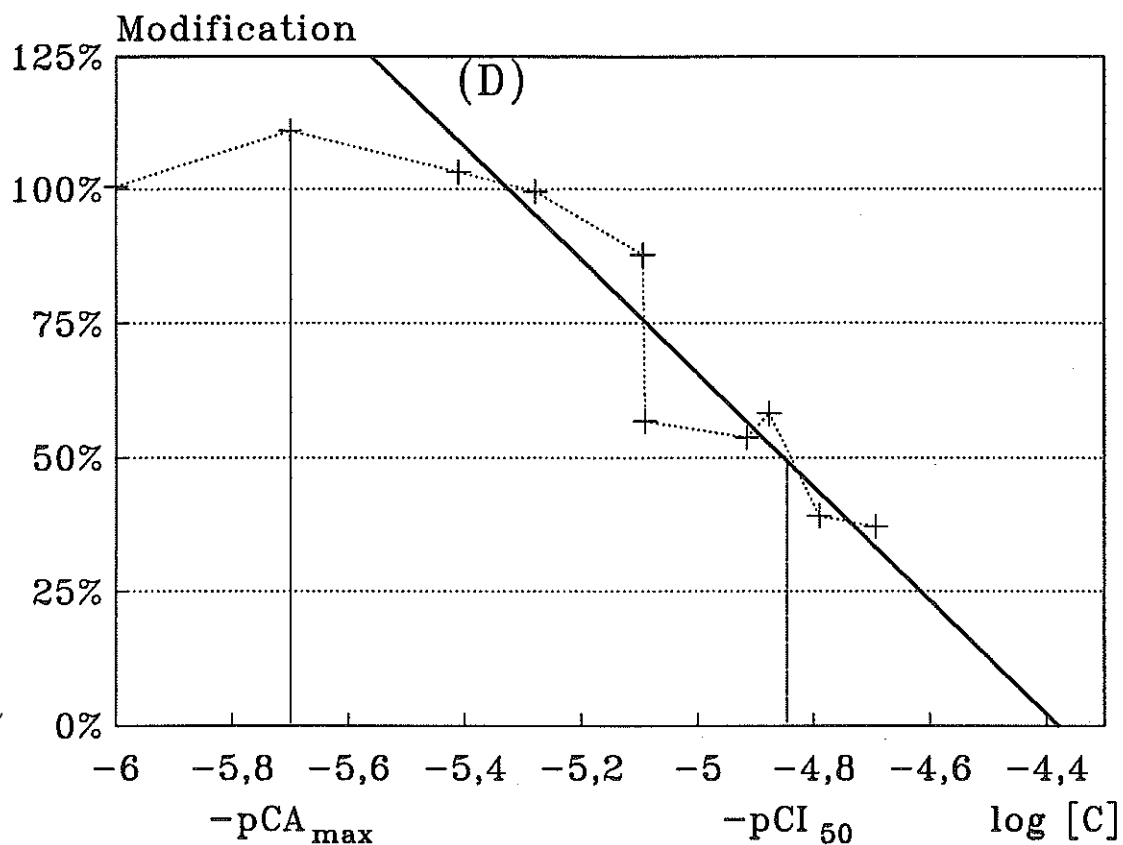


Figure 13 : Schématisation de la détermination des CA_{\max} et CI_{50} pour les euglènes à partir des valeurs expérimentales obtenues avec le dichloro-2,5 BNT à pH 3,5 et à la 72^e heure.

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

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 %. Ce paramètre est déterminé par régression linéaire sur les valeurs expérimentales comprises entre 15 % et 95 % d'inhibition.

(D) : Représentation de la droite de régression.

- Les valeurs de pCA_{max} passent par un maximum pour certains produits : c'est le cas du bromo-2 BNT à la 48^e h et à pH 3,5.
- Des résultats variables ont été observés pour certains produits : les pCA_{max} pour le bromo-3 BNT à pH 3,5 augmentent légèrement au cours du temps ; celles du niclosamide oscillent. A pH 7,2, les valeurs du BNT diminuent puis augmentent.
- Les pCA_{max} du dichloro-2,4 BNT sont les seules à être supérieures à celles du niclosamide à pH 3,5.

A pH 7,2, c'est le niclosamide qui a les valeurs les plus élevées.

La figure 13 montre, à titre d'exemple, la détermination de pCA_{max} et de pCI_{50} à partir des valeurs expérimentales obtenues avec le dichloro-2,5 BNT à pH 3,5 et à la 72^e h.

CHAPITRE VI
DISCUSSION

I. VALIDITÉ DE L'ÉTUDE

A. Fiabilité du modèle choisi

Pour permettre l'utilisation des molluscicides, il est impératif de connaître les principaux groupes de composés intéressants, actifs sur les différentes espèces de mollusques, avec leurs qualités et leurs défauts, en particulier leurs dangers sur l'environnement. Nous avons choisi, pour cette étude d'impact sur l'environnement, une algue *Euglena gracilis*, considérée comme une espèce sensible de la flore associée, susceptible d'être atteinte avec les mollusques par les pesticides.

L'euglène présente des avantages :

- Son maintien en laboratoire est relativement facile. La souche provient de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry et est entretenue sur un milieu nutritif approprié (cf chapitre IV).
- Le temps de multiplication est relativement court : la croissance de l'euglène est rapide.
- Sa morphologie et sa dimension sont suffisantes pour permettre de compter rapidement les individus au microscope.
- Les euglènes présentent une sensibilité aux pesticides donc aux molluscicides, car suivant les milieux toxiques et les doses de produits, on observe une inhibition ou une activation de la croissance.

Ainsi, *E. gracilis* se révèle être un matériel biologique de choix intéressant pour définir la toxicité des molluscicides dans le milieu environnant.

B. Fiabilité de la méthode

La difficulté porte aussi sur le choix du protocole de maintenance assurant une reproductibilité des cultures. Notre protocole, soigneusement respecté, semble répondre à ce critère même s'il présente quelques inconvénients d'ordre pratique :

- Le comptage des euglènes est effectué au microscope optique sur cellule Malassez. Il ne permet donc pas de donner des résultats à grande échelle. Seule l'utilisation d'un compteur de cellules, Coulter Counter[®] faciliterait le travail dans le cas de cultures importantes.
- Les dérivés du BNT sont des produits qui précipitent et qui nécessitent une filtration avant expérimentation. Nous travaillons donc à partir des concentrations réelles puisque les concentrations théoriques ne sont pas équivalentes.
- Deux essais sont nécessaires pour les mêmes produits afin d'obtenir des résultats reproductibles.

II. ACTION DES DÉRIVÉS DU BNT SUR LES ESPÈCES ANIMALES ET VÉGÉTALES

L'action des dérivés du BNT mise en évidence sur *E. gracilis* peut être comparée à celle obtenue sur les espèces animales, limnées et gammares (VIGNOLES *et al.*, 1990 a) et sur *E. gracilis* (DUFOUR, 1989 ; LACOUTURE, 1991).

A. Efficacité des produits

1. Toxicité

Quel que soit le pH, les valeurs des pCL_{50} et les pCI_{50} des euglènes sont inférieures à celles obtenues chez les deux autres espèces, limnées et gammares (pCL_{50} et pCI_{50} comprises entre 3,5 et 5 pour les euglènes ; pCL_{50} comprises entre 5,5 et 7 pour les limnées et les gammares).

Espèces et famille	Dérivés du BNT - Efficacité et doses	Produit de référence	Observations
<i>Trichomonas vaginalis</i> (Protozoaires)	Me-3 BNT ; dichloro-2,4 BNT ; bromo-4 BNT	CMI ⁽¹⁾ < 0,5	Métronidazole CMI ≤ 0,5 mg.l ⁻¹ Action protozoocide.
	Chloro-3 BNT ; chloro-4 BNT ; dichloro-2,5 BNT ; bromo-2 BNT	0,5	
	BNT ; chloro-2 BNT ; dichloro-3,4 BNT ; bromo-3 BNT ; fluoro-4 BNT	≤ 10	
<i>Entamoeba histolytica</i> (Protozoaires)	Me-3 BNT ; bromo-2 BNT	≤ 2,5	Métronidazole 2,5 < CMI ≤ 5 mg.l ⁻¹
	BNT ; dichloro-2,4 BNT ; dichloro-2,5 BNT ; dichloro-3,4 BNT ; bromo-3 BNT ; fluoro-4 BNT	≤ 5	
	Bromo-2 BNT ; chloro-2 BNT ; chloro-3 BNT	≤ 10	
<i>Syphacia obvelata</i> (Nématelminthes)	diméthoxy-3,4 BNT ; triméthoxy-3,4,5 BNT	Pas de produit de référence	* Forte activité oxyuricide.
<i>Hymenolepis nana</i> (Plathelminthes)	acétoxy-2 BNT	Niclosamide	* Activité ténicide notable.
	Chloro-3 BNT ; chloro-4 BNT ; bromo-3 BNT		* Le Nitazoxanide (acétoxy-2 BNT) a une activité ténicide supérieure ou égale à celle du Niclosamide.
<i>Biomphalaria glabrata</i> (Mollusques)	Dichloro-3,4 BNT	C ₁₀₀ ⁽²⁾ 0,1	Forte activité molluscicide.
	Chloro-3 BNT ; dichloro-2,4 BNT ; dichloro-2,5 BNT ; bromo-3 BNT ; bromo-4 BNT ; fluoro-4 BNT	1	
	Acétoxy-2 BNT ; chloro-2 BNT	10	

(1) CMI : concentration minimale inhibitrice, en mg.l⁻¹ ; (2) C₁₀₀ : concentration minimale pour laquelle on observe 100 % de mortalité, en mg.l⁻¹.

Tableau VIII : Toxicité de quelques dérivés du BNT sur différentes espèces animales (CAVIER *et al.*, 1978).

Produits	CL > 90 % en mg.l ⁻¹				Observations
	Mollusques	<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Bulinus globosus</i>	<i>Bulinus forskali</i>	
Dichloro-3,4 BNT	Jeunes	0,1	0,05	0,05	* le dichloro-3,4 BNT est le produit le plus efficace sur l'ensemble des trois espèces. * La substitution en <i>méta</i> augmente la toxicité. * Tous les produits ont des efficacités supérieures ou égales à celle du Niclosamide.
	Adultes	0,05	0,1	0,05	
Dichloro-3,5 BNT	Jeunes	1	0,1	0,1	
	Adultes	0,1	0,1	0,1	
Dichloro-2,4 BNT	Jeunes	1	0,05	0,05	
	Adultes	1	1	0,1	
Dichloro-2,5 BNT	Jeunes	1	0,05	0,1	
	Adultes	1	1	0,05	
Bromo-3 BNT	Jeunes	1	0,05	0,05	
	Adultes	1	0,1	0,05	
Chloro-3 BNT	Jeunes	1	0,1	0,1	
	Adultes	1	10	0,05	
Fluoro-4 BNT	Jeunes	1	1	1	
	Adultes	10	1	0,1	
Niclosamide	Jeunes	1	1	1	* Produit de référence.
	Adultes	0,1	10	10	* Toxicité faible chez les adultes.

Tableau IX : Toxicité de quelques dérivés du BNT sur différentes espèces de Mollusques (MADULO-LEBLOND *et al.*, 1981).

2. Activation de la croissance

Chez les euglènes, quel que soit le pH, nous avons obtenu de valeurs de pCA_{max} proches des pCL_{50} des limnées et des gammares : la différence observée entre ces deux paramètres est moins nette que lors de l'étude de la toxicité.

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

Dans le cas d'une application sur le terrain visant à limiter la croissance d'une population de limnées, le produit, utilisé aux doses molluscicides, permettrait de limiter aussi la croissance de la faune associée mais risquerait de provoquer une prolifération des algues voire une contamination du milieu.

B. Classification des produits

Pour les produits étudiés, nous pouvons indiquer les constatations suivantes :

- Les produits les plus efficaces sont pour la plupart bisubstitués.
- La substitution du cycle benzénique en position *méta* augmente l'efficacité des produits. C'est ainsi que le bromo-3 BNT à pH 7,2 et le dibromo-2,5 BNT à pH 3,5 apparaissent comme les produits les plus actifs.
- La substitution du cycle benzénique en position *ortho* défavorise souvent l'activité toxique. A pH 3,5 et pH 7,2, le bromo-2 BNT apparaît comme le moins actif.
- La toxicité du niclosamide est supérieure à celle du BNT et souvent inférieure à celle d'un produit substitué en position *méta*.

Pour les limnées et les gammares, il est possible de formuler les mêmes constatations excepté pour le niclosamide dans le cas des gammares : sa toxicité est plus faible que celle du BNT.

Nos résultats sont en accord a) avec les observations effectuées par CAVIER *et al.* (1978), chez *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* et *Biomphalaria glabrata* (tableau VIII) ; b) avec les observations de MADULO-LEBLOND *et al.* (1981) chez *Biomphalaria glabrata*, *Bulinus globosus* et *Bulinus forskali* (tableau IX).

D'après les observations du tableau VIII, il pourrait exister une relation entre l'efficacité de certains produits et l'embranchement auquel appartiennent les espèces :

- Le dichloro-3,4 BNT possède une forte activité molluscicide et une faible toxicité sur les Helminthes.
- L'activité de l'acétoxy-2 BNT est inverse avec une efficacité sur *Hymenolepis nana* (Plathelminthes) supérieure à celle du niclosamide et une faible toxicité vis à vis des Protozoaires étudiés.

Le tableau IX montre l'utilisation des faibles concentrations de molluscicides, aussi bien chez les jeunes mollusques que chez les adultes.

Cette utilisation à faibles concentrations va dans les sens de critères de sélection d'un bon molluscicide (LEVEQUE, 1990). Le risque de rémanence serait diminué en raison de l'instabilité de nos produits à la lumière et leur accumulation plus faible dans le milieu naturel. Les produits de dégradation ne sont pas encore isolés à l'heure actuelle, mais nos expériences suggèrent que les résidus seraient peu toxiques, voire inoffensifs : en effet, les euglènes reprennent leur croissance après une plus ou moins longue période d'inhibition.

III. ÉTUDE COMPARATIVE : DÉRIVÉS DU BNT - NICLOSAMIDE

Nous avons obtenus des résultats à deux pH différents. En effet, on distingue :

- A pH 3,5 : forme neutre (acide) du niclosamide et formes protonées (chargées) des dérivés du BNT.
- A pH 7,2 : forme chargée du niclosamide (ion phénate) et formes neutres (bases) des dérivés du BNT.

Ainsi, la toxicité des molécules a pu être évaluée à ces deux pH :

- A pH 3,5, l'effet inhibiteur du niclosamide est supérieur à celui du dibromo-2,5 BNT et du dichloro-2,4 BNT. Nous observons une diminution de l'inhibition au cours de l'expérience pour le dichloro-2,5 BNT et le dibromo-2,5 BNT alors que l'effet inhibiteur du niclosamide augmente et se stabilise au cours du temps.

Le dichloro-2,4 BNT apparaît comme étant le plus toxique. Les CL₅₀ des autres produits tels que le dichloro-2,5 BNT et le dibromo-2,5 BNT sont inférieures aux CL₅₀ du niclosamide donc les dérivés du BNT sont moins toxiques pour les

euglènes que le niclosamide. De plus, leur effet toxique diminue au cours du temps.

- A pH 7,2, l'effet inhibiteur du niclosamide est le plus marqué et diminue au cours du temps. Pour les dérivés du BNT, l'inhibition la plus significative est obtenue avec le bromo-3 BNT, mais on constate un accroissement de l'inhibition pour le dichloro-2,4 BNT et le bromo-3 BNT.

Le bromo-3 BNT est plus toxique que le niclosamide et que tous les autres dérivés du BNT, le moins toxique étant le BNT. On observe, de plus, une diminution de la toxicité au cours du temps pour le niclosamide et dérivés du BNT.

Conclusion :

A pH 3,5 et pH 7,2, le niclosamide reste un bon inhibiteur. Cependant, le niclosamide est plus toxique que les dérivés du BNT à pH 3,5. Les dérivés du BNT sont plus toxiques que le niclosamide à pH 7,2.

IV. PERSPECTIVES D'AVENIR DES DÉRIVÉS DU BNT

Depuis dix ans, se dessine une évolution vers une prise en considération de la protection du biotope et de la faune associée.

L'idéal serait donc d'obtenir des molécules molluscicides plus spécifiques et non toxiques pour l'euglène.

Le niclosamide, molluscicide commercialisé, répond déjà à certains de ces critères et nous a servi de molécule de référence.

Mais nos résultats obtenus à partir du BNT et de ses dérivés confirment que ces molécules sont non-toxiques sur les euglènes, et n'ont pas d'effet inhibiteur sur leur croissance à des concentrations utilisables pour être molluscicides. Il s'avère même que les concentrations molluscicides du BNT et de ses dérivés sont plus faibles que celles du niclosamide et que leur impact sur la flore associée est moins important.

La recherche des molluscicides étant active, on peut donc espérer utiliser, dans l'avenir, cette gamme de produits qui se révèle être du plus grand intérêt.

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons voulu connaître, à partir d'un modèle approprié, *Euglena gracilis*, la sensibilité de l'environnement végétal à diverses molécules, les dérivés du BNT. Ces produits se révèlent être des molécules lipophiles, ce qui fait d'eux de bons molluscicides. Leur instabilité en milieu aqueux, évite aussi leur accumulation. Leur impact sur l'environnement est d'autant plus intéressant que la toxicité de ces produits sur la nature s'exerce souvent à des concentrations faibles mais à des concentrations supérieures aux doses molluscicides.

Bien dosé, ce type de produit serait alors idéal pour traiter des foyers à grande échelle puisqu'on obtiendrait une réduction des indices de transmission des parasites et des indices de toxicité.

Ces molluscicides pourraient s'affirmer, à moyen terme, comme les produits d'avenir, à plus forte raison s'ils sont moins coûteux ; en effet, les molluscicides actuellement commercialisés, du fait de leur coût élevé, ne sont pas toujours utilisables surtout dans les pays d'endémies, souvent pauvres.

Ainsi, notre étude s'intègre dans un programme de recherche sur l'utilisation de nouveaux molluscicides. De plus, de nombreuses recherches ont montré l'existence de molluscicides d'origine végétale : ils répondraient au désir de protection des biotopes, assureraient une rémanence de plusieurs années à un coût vraisemblablement accessible. D'autres travaux ont mis en évidence : les appâts molluscicides qui augmentent l'efficacité du contrôle par les molluscicides grâce à une économie du principe actif et une concentration élevée au niveau du mollusque cible.

Ainsi, la recherche tente de progresser, tout en considérant la protection du biotope à traiter et la faune associée, afin d'éviter tout désastre écologique.

Si la lutte contre les endémies parasitaires a des résultats pour le moins difficiles, si la remise en question de l'emploi d'insecticides, de molluscicides est régulièrement évoquée, et si l'émergence de souches résistantes est une inquiétude fréquente, la recherche sur les molluscicides reste d'un intérêt incontestable.

Le développement de nouvelles techniques laisse entrevoir des espoirs et les progrès se font en accord avec la spécificité, la sécurité d'utilisation et la protection de l'environnement.

BIBLIOGRAPHIE

BARNISH G., 1982.

Evaluation of chemotherapy in the control of *Schistosoma mansoni* in Marquis Valley, Saint Lucia.

II. Biological results.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 31 111-115.

BARNISH G., JORDAN p., BARTHOLOMEW R.K., GRIST E., 1982.

Routine focal mollusciciding after chemotherapy to control *Schistosoma mansoni* in Cul de Sac Valley, Saint Lucia.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76 602-609.

BARNISH G., PRENTICE M.A., 1981.

Lack of resistance of the snail *Biomphalaria glabrata* after nine years of exposure to Bayluscide.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75 106-107.

CABRINDEC R., 1977.

Tests biologiques d'évaluation d'effets toxiques de substances chimiques de l'environnement.

Coll. Rech. Environ. tome 5.

CAVIER R., GAYRAL P., GUILLAUMEL J., CLAVEL J.M., DEMERSEMAN P., ROYER R., 1978.

Recherches sur les dérivés nitrés d'intérêt biologique. 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 p.

CLEDAT D., DEBORD J., PENICAUT B., 1989.

Basicité et lipophilie de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole.

Analusis 17 398-400.

CORBETT J.R., 1974.

The biochemical mode of action of pesticides.

Academic Press. Londres/New-York, 330 p.

DEBORD J., 1988.

Relation structure-activité biologique pour quelques phosphoramides et benzamides.

Thèse Doct. Univ. Poitiers, Chimie Organique, 123 p.

DUFOUR I., 1989.

Impact de l'utilisation de molluscicides sur la croissance d'*Euglena gracilis in vitro*.

Thèse Doct. Univ. Limoges, Pharmacie, 86 p.

ENCYCLOPEDIA UNIVERSALIS, 1988.

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 p.

FREYSSINET G., HETZMANN P., VERDIER G., 1972.

Influence des conditions nutritionnelles sur la réponse à l'éclairement chez les euglènes étiolées.

Physiol. Veg. 10 421-442.

GAYRAL P., CAVIER R., 1977.

Actualités et perspectives d'avenir des molluscicides.

In : "Actualité en chimie thérapeutique", 5^{ème} série, Société de Chimie thérapeutique, Ed. Paris, 177-209.

GORENFLOT R., 1975.

Précis de Botanique. Tome 1, 184 p.

GREENBLATT G.L., SCHIFF J.A., 1959.

A pheophytine like pigment in dark adapted *Euglena gracilis*.

J. Protozool., 6, 23-28.

JELNES J.E., 1977.

Letter : Evidence of possible molluscicide resistance in schistosome intermediate hosts from Iran.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 71 451.

LACOUTURE L., 1991.

Etude de la toxicité de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole sur *Euglena gracilis* Klebs.

Thèse Doct. Univ. Limoges, Pharmacie, 82 p.

LEVEQUE C., 1990.

Impact de la lutte antivectorielle sur l'environnement aquatique.

Proceedings I.C.O.P.A. VII, Paris, 20-24 août 1990. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 65 Suppl. 1 119-124.

MADULO-LEBLOND G., GAYRAL P., GUILLAUMEL J., CLAVEL J.M., DEMERSEMAN P., ROYER R., 1981.

Recherches sur les dérivés nitrés d'intérêt biologique. XXIII. Nouvelles données relatives aux propriétés molluscicides des dérivés halogénés du benzamido-2 nitro-5 thiazole.

Eur. J. Med. Chem. 16 267-270.

MILLET F., 1984.

Mise en évidence des rythmes circannuels de croissance chez *Euglena gracilis* et *Chlamydomonas reinhardtii*.

Thèse Doct. 3^{ème} cycle, Sci. Pharm., Paris XI, 118 p.

OUTIFRAKH A., 1984.

Etude de l'influence de la lumière sur les euglènes étiolées. Analyses préliminaires du GADPH avec NADP.

Rapport du stage DEA de Biologie cellulaire et moléculaire, Univ. de Limoges, 25 p.

PESSON P., RAMADE F., 1971.

La pollution par les pesticides et ses implications biologiques.

Bull. Tech. Information du ministère de la culture.

RONDELAUD D., 1986.

Le contrôle mixte et alterné de *Lymnaea truncatula* Müller par voie chimique et biologique. Premiers essais sur le terrain.

Ann. Rech. Vet. 17 15-20.

RONDELAUD D., 1988a.

Les effets d'une concentration sublétales de molluscicide (CuCl_2) sur l'activité reproductrice et les déplacements du mollusque hôte *Lymnaea truncatula* Müller.

Ann. Rech. Vet. 19 273-278.

RONDELAUD D., 1988b.

Le contrôle mixte et alterné de *Lymnaea truncatula* Müller : étude comparative de trois techniques pour l'épandage du molluscicide.

Ann. Rech. Vet. 19 279-282.

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 p.

VIGNOLES P., DREYFUSS G., CLEDAT D., DEBORD J., PENICAUT B., RONDELAUD D., 1990a.

Lutte antivectorielle dans la distomatose à *Fasciola hepatica* L.

I. Relation structure-activité quantitative de composés molluscicides sur *Lymnaea peregra ovata* Müller.

Bull. Soc. Fr. Parasitol. 8 119-125.

VIGNOLES P., DREYFUSS G., LAJUGIE J.P., GRENAILLE V., 1990b.

Environmental toxicology of some molluscicidal compounds in fasciolasis control.

Proceedings I.C.O.P.A. VII, Paris, 20-24 août 1990. Bull. Soc. Fr. Parasitol. 8 Suppl. 2 S9-A93 1071.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	8
CHAPITRE I : MATÉRIEL BIOLOGIQUE : <i>Euglena gracilis</i>	11
I. CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES ALGUES	12
A. Définition	12
B. Rôle dans la nature	12
C. Caractères généraux des divers embranchements	14
II. CLASSIFICATION D' <i>Euglena gracilis</i>	14
III. MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE DES EUGLENOPHYCÉES	15
A. Cytologie	15
1. Paroi	15
2. Noyau	16
3. Appareil cinétique	16
4. Autres constituants cellulaires	17
5. Les plastes	17
a. Morphologie	17
b. Composition	18
6. Vacuoles et inclusions diverses	19
a. Vacuoles	19
b. Inclusions diverses	19
B. Biochimie	20
1. Pigments des plastes : structure et rôle	20
a. Chlorophylles	20
b. Caroténoïdes	20
2. Produits du métabolisme	20
C. Biologie	21
1. Déplacement et mobilité	21
2. Reproduction	21
3. Nutrition	22
4. Ecologie	22
CHAPITRE II : PROPRIÉTÉS ET IMPACT DES MOLLUSCICIDES	23
I. GÉNÉRALITÉS	24

A. Utilisation des molluscicides	24
B. Principales parasitoses rencontrées	24
1. Les trématodes chez le bétail	24
2. Les trématodes chez l'homme	25
C. Lutte contre les parasitoses	25
1. Pullulation des mollusques	25
2. Lutte molluscicide	26
II. PRINCIPAUX TYPES DE MOLLUSCICIDES	26
III. SÉLECTION ET ÉTUDE DES MOLLUSCICIDES	28
A. Molluscicide idéal	28
B. Sélection	29
1. Première sélection	29
2. Sélection définitive et évaluation complète en laboratoire	29
3. Etude physico-chimique	30
4. Toxicité	30
5. Essais sur le terrain	30
IV. IMPACT DES MOLLUSCICIDES SUR L'ENVIRONNEMENT	31
A. Modalités de l'étude d'impact	31
B. Impact sur les algues	32
1. Rôle des algues	32
2. Motivation du choix	32
3. Evaluation de la toxicité sur les algues	33
CHAPITRE III : MOLLUSCICIDES ÉTUDIÉS	34
I. NICLOSAMIDE	35
A. Structure et propriétés physico-chimiques	35
B. Mécanisme d'action	35
C. Utilisation du niclosamide	38
II. DÉRIVÉS DU BNT	38
A. Structure	38
B. Propriétés physico-chimiques	41
1. Basicité des dérivés du BNT	41
2. Lipophilie des dérivés du BNT	41
3. Action des dérivés du BNT	41

CHAPITRE IV : PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	42
I. MILIEU DE CULTURE	43
A. Type de milieu utilisé	43
B. Composition des fractions	43
1. Fraction organique	43
2. Fraction minérale	44
II. PROTOCOLE D'ÉTUDE	44
III. MODE OPÉRATOIRE	46
A. Préparation du milieu de maintenance	46
B. Préparation des milieux aux deux pH	46
C. Préparation du milieu toxique	47
1. Préparation des solutions toxiques	47
2. Préparation du milieu toxique	47
3. Répartition du milieu	47
4. Ensemencement des euglènes	48
5. Culture et numération des euglènes	48
a. Culture	48
b. Numération des euglènes	50
6. Dosage spectrophotométrique des solutions toxiques	52
CHAPITRE V : RÉSULTATS OBTENUS	54
I. OBSERVATIONS QUALITATIVES	55
A. Cellules vivantes sur cellules de Malassez	55
2. Mobilité	55
B. Cellules mortes sur cellule de Malassez	57
II. OBSERVATIONS QUANTITATIVES	57
A. Action du PEG 400	57
B. Croissance des euglènes témoins	60
C. Croissance des euglènes soumises au toxique	60
1. Euglènes vivantes	60
2. Euglènes mortes	63
III. PARAMÈTRES ÉTUDIÉS	63
A. Taux de mortalité	63
B. Concentration létale à 50 % : CL ₅₀	63
C. Pourcentage de modification de croissance	64
D. Concentration inhibitrice : CI ₅₀	68

E. Concentration activatrice maximale : CA_{max}	68
IV. RÉSULTATS	68
A. Mortalité des euglènes	68
B. Effets sur la croissance	71
1. Inhibition de la croissance	71
2. Activation de la croissance	71
CHAPITRE VI : DISCUSSION	74
I. VALIDITÉ DE L'ÉTUDE	75
A. Fiabilité du modèle choisi	75
B. Fiabilité de la méthode	76
II. ACTION DES DÉRIVÉS DU BNT SUR LES ESPÈCES ANIMALES ET VÉGÉTALES	76
A. Efficacité des produits	76
1. Toxicité	76
2. Activation de la croissance	79
B. Classification des produits	79
III. ÉTUDE COMPARATIVE : DÉRIVÉS DU BNT - NICLOSAMIDE	80
IV. PERSPECTIVES D'AVENIR DES DÉRIVÉS DU BNT	81
CONCLUSION	82
BIBLIOGRAPHIE	84

GRENAILLE Véronique

LES EFFETS TOXIQUES DE QUELQUES DERIVES DU BENZAMIDO-2 NITRO-5 THIAZOLE SUR *Euglena gracilis* Klebs.

Thèse : Pharmacie, Limoges, 1991, 93 pages.

L'emploi de molluscicides reste un des moyens de lutte contre certaines helminthoses. Or, il s'avère aujourd'hui que les molluscicides employés ne sont pas totalement fiables en raison de leurs effets toxiques sur la faune et la flore associées. La recherche s'est donc intéressée à des nouveaux produits réputés molluscicides, tels que les dérivés du BNT, et particulièrement au devenir de ces molécules dans l'environnement.

Dans notre étude, nous décrivons l'impact de 6 dérivés du BNT, sur une algue unicellulaire verte : *Euglena gracilis*. Nous avons pu constater que la toxicité de ces produits sur l'algue s'exerce souvent à des concentrations faibles, mais toujours supérieures aux doses molluscicides.

Les dérivés du BNT pourraient donc servir d'alternative aux molluscicides actuellement utilisés.

MOTS-CLES : Molluscicides
Euglena gracilis
Ecotoxicologie
Environnement

JURY :
. Président : M. le Professeur NICOLAS
. Juges : Monsieur DREYFUSS, MC
Mademoiselle FEUILLARD, Pharmacien