

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1994

Thèse n° 315

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 6 avril 1994

par

Chantal FRUGNAC

née le 18 novembre 1969 à Brive (Corrèze)

**ÉTUDE COMPARATIVE DU NICLOSAMIDE ET
DU 3,5-DICHLORO-2-BENZAMIDO-5-NITROTHIAZOLE.
ACTIVITÉ MOLLUSCICIDE ET CONSÉQUENCES HISTOPATHOLOGIQUES.**

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Monsieur NICOLAS, Professeur Président
Madame VAREILLE-MOREL, Maître de Conférences Juge
Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences Juge
Monsieur RONDELAUD, Maître de Conférences Juge

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTÉ : Monsieur le Professeur **RABY**
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1er Assesseur)
Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences (2ème Assesseur)

Personnel enseignant

* PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
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
LEFORT DES YLOUSES Daniel	Pharmacie galénique
NICOLAS Jean-Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
OUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SÉCRÉTAIRE GÉNÉRAL DE LA FACULTÉ-CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A notre Président de Thèse

Monsieur le Professeur A. NICOLAS,
Service de Bactériologie-Virologie-
Parasitologie,

*Nous sommes très sensible à l'honneur
que vous nous avez fait en acceptant
de présider ce Jury de soutenance.*

*Nous vous prions de trouver ici
l'expression de nos respectueux sentiments.*

A notre Directeur de Thèse

Monsieur le Docteur G. DREYFUSS,
Maître de Conférences,
Service de Bactériologie-Virologie-
Parasitologie,

*Vous nous avez fait l'honneur
d'accepter la direction de cette thèse.*

*Pour nous avoir guidé dans la réalisation
de ce travail, veuillez trouver ici
l'expression de notre sincère reconnaissance
et l'assurance de notre profond respect.*

A notre Juge

Madame le Docteur C. VAREILLE-MOREL
Maître de Conférences,
Service de Biologie Animale,
Faculté des Sciences.

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

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

A notre Juge

Monsieur le Docteur D. RONDELAUD,
Maître de Conférences,
Service d'Histologie,
Faculté de Médecine.

*Vous avez suivi avec vigilance
et patience l'évolution de ce travail.*

*Pour la grande disponibilité dont
vous avez fait preuve et pour
vos précieux conseils et encouragements,
nous vous exprimons tous nos remerciements.*

A Madame le Professeur C. BOSGIRAUD

*Nous vous remercions de nous avoir donné les moyens techniques
et le temps nécessaire à la réalisation de ce travail
au sein de votre laboratoire.*

A Monsieur le Professeur B. PENICAUT

*Nous vous remercions de nous avoir fourni les moyens de réaliser
nos expériences.*

A M. le Dr. C. VIGNOLES, Maître de Conférences

*Nous vous remercions de votre aide dans l'élaboration
du protocole expérimental.*

A mes Parents

à qui je dédie tout particulièrement cette thèse. Que ce travail puisse être un gage de ma reconnaissance et de toute mon affection.

A mon Frère

qui m'a encouragé et soutenu tout au long de mes études.

A Fabien

qui a su m'aider dans la traversée des moments difficiles par sa patience et ses encouragements.

A Sandrine

je te dédie ce travail en souvenir de nos années d'étude communes et des longues heures heureuses passées ensemble au laboratoire.

A toute ma famille,

A mes amis,

A Didier

Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma plus grande affection.

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE PREMIER: Rappels généraux sur les molluscicides	4
I. - Principe de la lutte chimique	4
A. Existe-t-il un molluscicide idéal ?	4
B. Les produits et leur efficacité	8
1. Substances chimiquement définies	8
2. Substances d'origine végétale	10
II. - Niclosamide	12
A. Présentation de la molécule	12
B. Propriétés physico-chimiques du Niclosamide	12
C. Les différentes formulations	13
D. Son efficacité	15
E. Son mode d'action	18
F. Problèmes de résistance	18
III. - 3,5-dichloro-2-benzamido-5-nitrothiazole.	18
A. Présentation de la molécule	20
B. Sa toxicité	20
1. Étude comparative chez diverses espèces	22
2. Comparaison avec les effets du Niclosamide	22

II

	Pages
C. Son mode d'action	22
IV. - Commentaires	23
CHAPITRE DEUXIÈME: Matériel et méthodes	25
I. - Matériel biologique	25
A. Présentation du mollusque	25
B. La population étudiée	27
C. Raisons du choix	27
II. - Produits chimiques	29
III. - Protocole expérimental	29
IV. - Méthodologie	30
A. Élevage de la limnée	30
B. Préparation des solutions	30
C. Exposition des animaux au toxique	30
D. Technique histologique	30
V. - Paramètres utilisés	31
A. Toxicologie	31
1. Taux de mortalité	31
2. Concentration létale à 50 %	31
B. Histologie	34
VI. - Tests statistiques	35
CHAPITRE TROISIÈME: L'activité molluscicide des deux produits	36
I. - Comportement du mollusque en présence du toxique	36
A. Données qualitatives	36
B. Données quantitatives	37
II. - Détermination de la concentration létale à 50 %.	41
III. - L'influence de quelques facteurs sur la toxicité des produits	43
A. Durée de l'acclimatation au laboratoire	43
B. Facteur sédiment	45
C. Concentration de l'eau en ions calcium	45
D. Facteur nourriture	47

III

	Pages
E. Facteur eau courante	47
CHAPITRE QUATRIÈME: Données histopathologiques	48
I. - Étude descriptive des lésions	48
A. Glande digestive	48
B. Gonade	51
C. Rein	51
II. - Fréquence des lésions	51
A. Cas du Niclosamide	51
B. Cas du 3,5-dichloro-BNT	54
CHAPITRE CINQUIÈME: Discussion	55
I. - Rappels des résultats	55
II. - Comparaison par rapport à la bibliographie	56
A. Données éco-toxicologiques	56
1. L'attitude de <i>L. glabra</i> en présence des toxiques	56
2. L'efficacité des deux substances	58
3. Facteur acclimatation	59
4. Facteur dureté calcique	59
5. Impact du sable	60
6. Autres facteurs	60
B. Données histopathologiques	62
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	66
BIBLIOGRAPHIE	68
ANNEXE	74



INTRODUCTION GÉNÉRALE

La distomatose à *Fasciola hepatica* Linné est une maladie parasitaire qui touche les Mammifères sauvages, le bétail domestique et, à un moindre degré, l'homme (EUZEBY, 1984). Cette anthroponose est assez fréquente dans la région du Limousin comme l'attestent les études menées sur les cas humains (RONDELAUD *et al.*, 1982) ou sur les bovins (MAGE, 1988). L'agent responsable est un Trématode de la sous-classe des Digènes avec un cycle évolutif de type dihéteroène. En effet, un mollusque intervient dans la transmission de la maladie en assurant le développement des formes larvaires. L'hôte intermédiaire est un Pulmoné de la famille des *Lymnaeidae*. Dans l'Europe de l'Ouest, il s'agit de *Lymnaea truncatula* Müller appelée plus communément Limnée tronquée.

Les pertes économiques liées à cette parasitose expliquent les tentatives des éleveurs et des vétérinaires pour prévenir ce type d'incident et contrôler les agents responsables de la maladie. L'une de ces méthodes est la lutte intégrée qui associe plusieurs moyens avec le traitement systématique du bétail à l'aide de fasciolicides et l'élimination de l'hôte intermédiaire (MAGE et RONDELAUD, 1983). Cette dernière peut se faire par le simple isolement des gîtes du reste de la pâture, la destruction active des limnées par des produits chimiques ou le contrôle biologique des mêmes mollusques par prédation (XIMENES, 1991). L'emploi de molluscicides chimiquement définis ou d'origine végétale autorise beaucoup d'espoir dans le traitement des gîtes à limnées en raison des nouvelles substances que les auteurs ont proposées depuis plusieurs années.

EUZEBY, dans sa revue de 1971, établit un bilan sur l'efficacité des molluscicides chimiquement définis ou d'origine végétale, leurs avantages et leurs inconvénients. Les premiers produits peuvent être regroupés en cinq grandes familles (VIGNOLES, 1990) mais l'examen de la littérature démontre que seul le Niclosamide est encore utilisé sur le terrain. Quant aux substances naturelles, elles sont répertoriées régulièrement par l'Organisation Mondiale de la Santé qui établit des notes de synthèse avec la liste des plantes disponibles (comme celle de KLOOS et McCULLOUGH, 1981). Les recherches se poursuivent actuellement sur ces deux types de molluscicides comme celles que la Faculté de Pharmacie de Limoges (MM. PÉNICAUT et DREYFUSS) mène depuis plusieurs années sur la famille des 2-benzamido-5-nitrothiazoles (BNT).

Notre travail s'inscrit dans la continuité des études effectuées dans ces deux laboratoires a) sur les propriétés physico-chimiques du BNT et de ses dérivés halogénés (CLÉDAT, 1989; CLÉDAT *et al.*, 1989) et b) sur la toxicité de ces produits sur des espèces cibles (VIGNOLES, 1990; LAJUGIE, 1992). Il était, en effet, utile de répondre à une problématique double:

- déterminer la toxicité du 3,5-dichloro-BNT sur le mollusque *Lymnaea glabra* Müller en fonction des différents facteurs présents dans le milieu.

- analyser l'impact de ce toxique sur les viscères du mollusque.

Les expériences relatives à ces deux points ont toutes été réalisées par rapport à un molluscicide de référence, le Niclosamide.

Les résultats de ces essais sont présentés dans ce mémoire de thèse. Le plan retenu est le suivant:

- Le chapitre premier fait le point sur les molluscicides et leur efficacité. Nous insisterons plus particulièrement sur les caractéristiques du Niclosamide et du 3,5-dichloro-BNT.

- Le chapitre deuxième présente le matériel animal, le protocole d'étude, la méthodologie et les paramètres que nous avons utilisés au cours de ces essais.

- Le chapitre troisième rassemble les résultats fournis par les expériences sur l'influence des facteurs du milieu sur l'activité molluscicide des deux toxiques.

- Le dernier chapitre est consacré aux données histopathologiques que nous avons obtenues avec l'étude de trois viscères chez ces limnées.

Les résultats bruts se rapportant à la toxicité des deux molluscicides sont, de plus, présentés dans une annexe à la fin de ce travail.

RAPPELS GÉNÉRAUX SUR LES MOLLUSCICIDES

Le but de ce chapitre est de dresser un bilan sur les différents types de molluscicides, notamment sur le Niclosamide et le 3,5-dichloro-BNT.

Le premier paragraphe est consacré à un exposé sur le principe de la lutte chimique contre les limnées. Les caractéristiques des deux produits précités sont ensuite détaillées. Un commentaire sur ces substances est présenté en dernier lieu.

I. - PRINCIPE DE LA LUTTE CHIMIQUE.

Le sulfate de cuivre CuSO_4 est certainement le premier molluscicide proposé par les auteurs pour détruire les limnées sur le terrain (CHANDLER, 1920). Depuis cette date, de nombreux sels métalliques et des composés organiques ont été signalés pour leur toxicité (revue d'EUZEBY, 1971). Les études actuelles portent sur deux axes. Le premier est la recherche de nouvelles molécules présentant une toxicité sélective sur quelques groupes d'animaux. Le second se rapporte aux effets létaux de diverses Phanérogames lorsqu'elles sont placées dans les gîtes où vivent les mollusques d'eau douce.

A. EXISTE-T-IL UN MOLLUSCICIDE IDÉAL ?

Les critères d'un bon molluscicide proviennent de plusieurs sources: BORAY, 1969; EUZEBY, 1971; McCULLOUGH *et al.*, 1981; LEVEQUE, 1990.

Numéro d'ordre des critères	Énoncé du critère	Observations
1er	Le molluscicide doit être suffisamment actif à haute dilution	Il doit tuer les mollusques à la dose de 1 mg/l.
2ème	Il doit être toxique pour les mollusques adultes et leurs oeufs	-
3ème	Il doit conserver son activité même dans les milieux riches en boues et matières organiques	-
4ème	Il doit exercer son activité dans de larges limites de pH et de température	de 5 à 8,5, de 15° à 35° C
5ème	Il doit être photostable et ne pas se dégrader sous l'effet des rayons ultra-violets pendant 24 h	-
6ème	Il doit être stable sous tous les climats et de conservation facile	-
7ème	Il doit posséder une activité sélective sur certains groupes	La toxicité doit être faible pour les Poissons
8ème	Il doit être inoffensif ou le moins toxique possible pour l'Homme et les Vertébrés supérieurs	-
9ème	Il ne doit pas léser les récoltes	-
10ème	Il doit être d'utilisation facile	Ceci concerne les modalités de son application comme ses aptitudes à la diffusion dans la masse aqueuse à traiter
11ème	Il doit être peu coûteux	-
12ème	Il doit pouvoir être analysé facilement dans le milieu	Les analyses peuvent être qualitatives ou quantitatives

Tableau I.
Les 12 critères pour un "bon candidat molluscicide"
(d'après EUZEBY, 1971).

Nous avons regroupé dans le tableau I les douze critères qu'EUZEBY (1971) propose dans sa revue pour qu'un produit soit un bon molluscicide. La lecture de ce tableau montre que quatre paramètres sont d'une certaine importance:

- Le produit doit être efficace contre le mollusque cible, même lorsqu'il est dilué.
- Il doit avoir une activité ovicide, en plus de son effet sur les adultes et les jeunes.
- Il doit être inoffensif pour l'homme et les Vertébrés supérieurs.
- Son prix de revient doit être faible.

En plus de ces critères, LEVEQUE (1990) formule deux autres exigences qui sont propres à l'environnement aquatique:

- "ne pas utiliser de pesticides donnant des produits de dégradation toxiques et rémanents s'accumulant dans les chaînes trophiques",
- "ne pas provoquer à long terme un déséquilibre des écosystèmes dans les conditions normales d'application. Ceci implique que l'abondance relative des espèces non cibles¹ ne doit pas subir de modifications majeures et irréversibles, et que (le pesticide) ne provoque pas au niveau régional l'éradication définitive d'espèces aquatiques non cibles".

Si l'on examine la liste des molluscicides en fonction de ces critères, il ressort qu'aucune molécule ne répond à l'ensemble des principes que les deux auteurs précités ont énoncés. Le critère le moins bien considéré se rapporte à la toxicité du produit. Si son activité molluscicide est reconnue, la molécule est souvent nocive pour les Poissons, et parfois pour l'homme et le bétail. A titre d'exemple, c'est le cas du Niclosamide et de la N-triphénylméthyl-morpholine (Frescon®).

De cette revue, il se dégage qu'il n'existe pas de molluscicide "idéal". Ceci a deux conséquences. La première est que le choix du produit doit tenir compte des contraintes propres à l'environnement aquatique et qu'il faut agir en l'absence des Poissons et autres Vertébrés supérieurs. La seconde concerne la date d'application du produit afin de limiter

¹. - Une espèce non cible vit normalement dans le même milieu que le mollusque hôte, concerné par le traitement. En théorie, cette espèce ne doit pas subir les effets du pesticide lors de son application.

Composés	Mode d'application	Principe actif CL ₉₀ en g.l ⁻¹ à 24 h		Toxicité sur d'autres groupes systématiques		
		Mollusques adultes	Juvéniles	Poissons	Mammi- fères	Plantes
Sulfate de cuivre CuSO ₄	Sous forme solide à 3,5 g.mètre carré ⁻¹ . En solution aqueuse pulvérisée à 3 %.	0,8-4,2	0,3	oui	oui	Algues seulement
Chlorure cuivrique CuCl ₂	En solution aqueuse.	0,5-3,1	0,2	oui	oui	non
Cyanamide calciq. en poudre	En solution liquide (125 à 250 l.ha ⁻¹).	2-4	0,5	?	?	oui
	En poudre à 300 kg.ha ⁻¹ .					non
	En granulés avec 500 kg.ha ⁻¹ .					non
Pentachlo- rophénate de sodium	En solution aqueuse à 10 ou 15 %.	1-4	0,2	oui	oui	non
N-trityl- morpholine (Frescon®)	En solution aqueuse pulvérisée à 0,15 % et à la dose de 1 g.mètre carré ⁻¹ .	0,02-0,05	0,03	oui	oui	non
Niclosamide (Bayluscide® WP 70 ¹)	En poudre mouillable, 2,5 à 10 kg.ha ⁻¹ .	0,1-0,3	0,05	oui	oui	variable

¹. Contient 70 % de Niclosamide.

Tableau II.

Les principaux molluscicides, leur mode d'application sur le terrain,
leurs concentrations létales et leur toxicité pour d'autres groupes systématiques
(d'après RONDELAUD et MAGE, 1988).

CL₉₀: concentration létale pour 90 % des mollusques.

Ce tableau a été établi pour les Limnées tronquées.

Il a été complété avec les travaux de PECHEUR (1974),
GAYRAL et CAVIER (1977), McCULLOUGH *et al.* (1981).

les effets toxiques sur les espèces non cibles, ce qui impose de connaître dans le détail l'écologie de ces dernières et celle du mollusque concerné.

B. LES PRODUITS ET LEUR EFFICACITÉ.

1. Substances chimiquement définies.

A l'exception de la cyanamide calcique, les molluscicides répertoriés dans le tableau II font partie des quatre groupes que VIGNOLES (1990) recense parmi ces pesticides. Les BNT n'ont pas été intégrés dans ce tableau car ils n'ont été appliqués qu'une fois sur le terrain (YOUSIF, *in* VIGNOLES, 1990).

L'examen de ce tableau permet les deux observations suivantes:

- Les deux sels de cuivre, la cyanamide calcique et le pentachlorophénate de sodium ont des CL₉₀ plus élevées que celles du Frescon® et du Niclosamide. Les doses létales sont, dans tous les cas, plus élevées pour les mollusques adultes que pour les juvéniles.

- Aucune donnée n'a été rapportée dans la littérature sur la toxicité de la cyanamide calcique vis-à-vis des Poissons et des autres Vertébrés. Par contre, les autres produits sont nocifs à des degrés divers pour ces deux groupes et le sulfate de cuivre inhibe même la croissance des Algues.

Ces produits ont d'autres propriétés:

- une action létale sur les oeufs des mollusques dans le cas du Niclosamide et du pentachlorophénate de sodium. Elle est faible dans le cas des sels de cuivre et nulle dans le cas du Frescon®. A notre connaissance, il n'y a pas de donnée sur ce point pour la cyanamide calcique.

- une action cercaricide pour le pentachlorophénate de sodium, le Niclosamide et les sels de cuivre. Elle est inexistante pour le Frescon®.

L'examen de la littérature montre, en plus, que seul le Niclosamide est utilisé à l'heure actuelle sur le terrain. Le Frescon® est interdit dans certains pays. Les autres produits ne sont plus guère employés pour le contrôle des hôtes intermédiaires de *F. hepatica*.

Espèces	Concentration (temps d'exposition)	Mortalité	Références
<i>Agave americana</i>	? (24 h)	M	SCHOEB <i>et al.</i> , 1984.
<i>A. decipiens</i>	? (24 h)	M	
<i>Balanites maughanii</i>	1 fruit par m ³ d'eau (24 h)	M	WAGNER, 1933.
<i>Croton macrostachys</i>	1 mg.l ⁻¹ (24 h)	90 %	DAFFALLA et AMIN, 1976.
<i>Hedychium coronarium</i>	25 mg.l ⁻¹ (24 h)	Pas de données	MEDINA et WOODBURRY, 1979. WARREN et PETERS, 1969.
<i>Jatropha curcas</i>	1000 mg.l ⁻¹ (24 h)	nulle	MEDINA et WOODBURRY, 1979.
<i>Pauliana pinnata</i>	1000 mg.l ⁻¹ (24 h)	100 %	MEDINA et WOODBURRY, 1979.
<i>Phytolacca dodecandra</i>	18-29 mg.l ⁻¹ (24 h)	90 %-100 %	LEMMA <i>et al.</i> , 1972, 1978. MEDINA et WOODBURRY, 1979.
<i>P. isocandra</i>	8-10 mg.l ⁻¹ (8 h)	M	
<i>P. rivinoides</i>	200 mg.l ⁻¹ (24 h)	M	
<i>Polygonum senegalense</i>	5000 mg.l ⁻¹ (24 h)	M	DOSSAJI <i>et al.</i> , 1977.
<i>Sapindus saponaria</i>	25 mg.l ⁻¹ (6 h)	94 %	TORREALBA <i>et al.</i> , 1953.
<i>Solanum nodiflorum</i>	100 mg.l ⁻¹ (24 h)	M	MEDINA et RITCHIE, 1980.

Tableau III.
L'activité molluscicide de plusieurs espèces végétales
sur les hôtes intermédiaires de *Fasciola* sp.
(d'après KLOOS et McCULLOUGH, 1981).
Abréviation. M: activité molluscicide.

2. Substances d'origine végétale.

D'après WEBBE (1987), l'emploi de Phanérogames s'est développé dans les régions de forte endémie bilharzienne afin de limiter le coût de leurs importations en molluscicide et, par suite, de pratiquer une auto-suffisance. Cet usage permet, également, de limiter les résistances que des bulins iraniens ont développé contre les molluscicides (JELNES, 1977).

Le tableau III récapitule les principales espèces végétales signalées par les auteurs pour leur toxicité sur les limnées. Nous pouvons remarquer les points suivants:

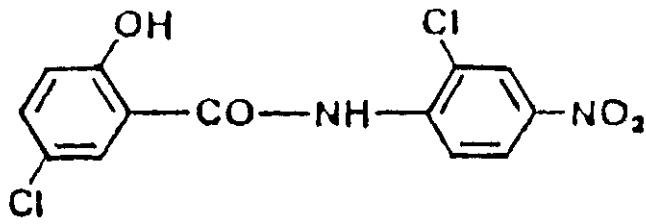
- Plusieurs plantes ont une activité molluscicide: *Agave americana*, *A. decipiens*, *Balanites maughanii*, *Phytolacca isocandra*, *P. rivinoides*, *Polygonum senegalense*, *Solanum nodiflorum*. Les autres espèces signalées dans ce tableau ont cependant une toxicité appréciable sur les limnées.

- Les concentrations de huit espèces végétales doivent être élevées pour qu'elles soient létales. Elles dépassent, en effet, 10 mg et plus par litre d'eau. Les doses efficaces de *Croton macrostachys*, *Hedychium coronarium* et *Phytolacca isocandra* sont plus faibles, ne dépassant pas 30 mg par litre d'eau.

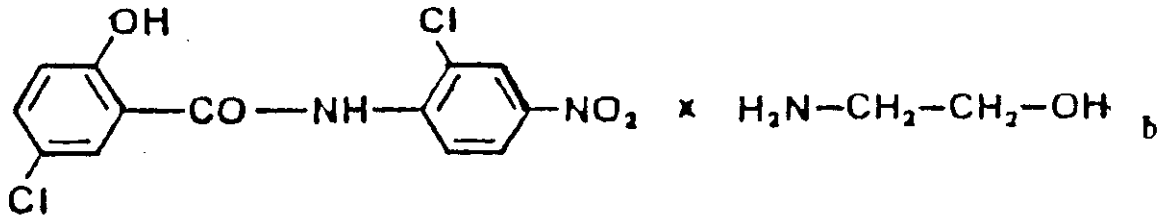
A l'exception de *Phytolacca isocandra* où cette activité n'a pas été recherchée, les autres plantes sont cercaricides. Les fruits de *Balanites maughanii* tuent même les alevins de Poissons et les larves de moustiques.

Un certain nombre de principes actifs ont été isolés à l'heure actuelle. FARNSWORTH *et al.* (1987) donnent une liste récapitulative de toutes les plantes étudiées avec la nature du molluscicide présent et la distribution géographique de ces espèces. A titre d'exemple, les principes actifs de *Polygonum senegalense* sont la 2',4'-dihydroxy-3',6'-diméthoxychalcone et la quercétine-3-(2'-galloylglucoside) tandis que celui de la variété *senegalense* est un glucoside cyanogénique. Celui de *Solanum nodiflorum* est la solanosine. Il serait intéressant de connaître l'action des principes actifs lorsqu'ils seront extraits à grande échelle.

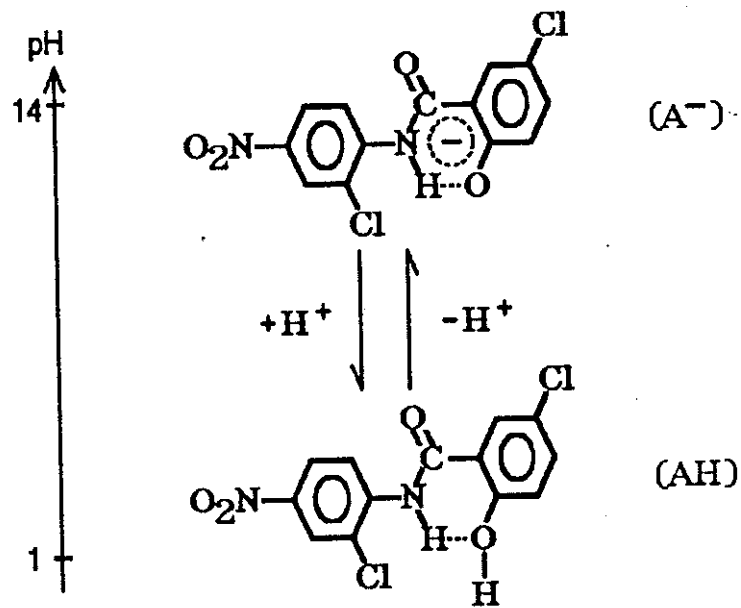
EUZEBY (1971) signale que les "propriétés molluscicides des végétaux sont difficilement utilisables dans les opérations de lutte contre les Gastéropodes aquatiques car, en



a



b



c

Figure 1.

Présentation du Niclosamide.

- Formule détaillée du produit pur (a)
et de son sel d'éthanolamine (b)
(d'après ANDREWS *et al.*, 1987).

- Formes de la molécule en fonction du pH (c).

A⁻, ion phénate en milieu basique.

AH, forme neutre de la molécule en milieu acide
(d'après VIGNOLES, 1990).

effet, elles manquent de sélectivité et les saponines ... sont également ichthyotoxiques". Malgré ces limites, l'auteur estime que ces substances d'origine végétale sont à utiliser en raison de leur faible coût.

II. - NICLOSAMIDE.

La plupart des données présentées dans ce paragraphe proviennent des revues suivantes: EUZEBY, 1971; ANDREWS *et al.*, 1987. Les autres éléments se rapportent à la thèse de VIGNOLES (1990) et à des articles plus récents parus au cours des cinq dernières années.

A. PRÉSENTATION DE LA MOLÉCULE.

Le Niclosamide dérive du salicylanilide. C'est le 2',5'-dichloro-4'-nitrosalicylanilide. On le dénomme aussi de la manière suivante: 5-chloro-N-2-chloro-4-nitrophényl-2-hydrobenzamide. La figure 1a présente cette formule.

Une autre molécule est également détaillée sur la figure 1b. Il s'agit du sel d'éthanolamine du Niclosamide. Ce produit est nettement plus soluble que le principe actif lui-même qui a une solubilité réduite.

Le Niclosamide, comme son sel, peut se présenter sous deux configurations qui dépendent du pH (figure 1c). La première est la forme neutre de la molécule qui se rencontre dans un milieu acide. La seconde est l'ion phénate en milieu basique: la charge négative est délocalisée sur un cycle à six sommets constitué par une liaison hydrogène avec l'amide (VIGNOLES, 1990).

Ces deux formes sont lipophiles, ce qui facilite leur diffusion à travers les membranes biologiques.

B. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DU NICLOSAMIDE.

C'est un produit cristallisé, gris jaunâtre avec une masse molaire de 327,1 g.mol⁻¹. Sa température de fusion se situe entre 222° et 224° C. Deux autres caractéristiques ont été précisées dans la thèse de VIGNOLES (1990) avec:

- le pK_a dont la valeur est de 5,3. Le pK_a correspond au logarithme négatif de la constante d'acidité, mesurée dans $H_2O + KCl$ 0,1 M, à 20° C.

- le log P. Sa valeur est de 4,2. Le log P correspond au logarithme du coefficient de partage octanol/eau calculé par la méthode de LEO (1983).

Les autres propriétés se rapportent:

- à sa solubilité. Celle du produit pur est réduite, avec des valeurs de 5 à 8,1 mg.l⁻¹ dans de l'eau distillée à 20° C, et de 2 à 6,8 mg.l⁻¹ dans l'eau du robinet à la même température (avec une charge en sels de 500 mg.l⁻¹ et un pH de 6,5-6,8). Celle du sel d'éthanolamine est plus importante avec des valeurs respectives de 230 ± 52 mg.l⁻¹ et de 145 ± 33 mg.l⁻¹ sous les mêmes conditions expérimentales.

- à sa stabilité. L'efficacité du produit ne change pas lors d'une élévation thermique. Elle est bonne lorsque l'on garde le Niclosamide dans les conditions habituelles de stockage. Par contre, elle diminue lors d'une exposition prolongée à la lumière solaire en raison d'une dégradation photochimique qui libère de l'acide 5-chlorosalicylique ou de la 2-chloro-4-nitroaniline.

Le Niclosamide se dégrade rapidement dans l'eau des étangs ou des rivières avec libération du 2'-5'-dichloro-4'-aminosalicylanilide ou de la 2-chloro-4-nitroaniline.

C. LES DIFFÉRENTES FORMULATIONS.

Deux formulations ont été proposées sur le marché:

- La première est le Bayluscide® WP 70. Elle contient 83,1 % (w/w) du sel d'éthanolamine, ce qui correspond à une concentration de 70 % en Niclosamide. C'est une poudre jaune orange qui se disperse facilement dans l'eau.

- La seconde est le Bayluscide® EC 250. C'est un concentré émulsionnable qui contient 25 % (w/w et w/v) de Niclosamide. Cette solution, brun clair, a un poids spécifique de 1.

L'emploi de la poudre est conseillé lors d'une application sur le terrain à grande échelle. Ces deux formulations sont actives sur les mollusques de la même façon.

Type de substrat	Résultats	Observations
Incorporation du Niclosamide dans du chlorure de polyvinyle.	Libération du produit pendant 10 semaines.	-
Incorporation dans de la colle de poisson, traitée par du formol et du glutaraldéhyde.	Libération du produit pendant 8 semaines au moins.	Essais de laboratoire seulement.
Incorporation dans des capsules de gélatine.	Action molluscicide pendant 52 jours.	Poudre mouillable avec 23,3 % de Niclosamide.
Incorporation dans des épis de maïs ou dans des fruits de <i>Casuarina equisetifolia</i> , trempés dans une suspension de poudre mouillable à 20 %.	Action molluscicide moyenne.	Les épis ou les fruits tombent ± rapidement sur le fond, limitant l'action molluscicide.
Incorporation dans des granules de polyester.	Bonne activité molluscicide car ils absorbent jusqu'à 3 fois leur poids de Niclosamide.	Peuvent flotter sur de longues périodes.
Incorporation dans des appâts attractifs à base d'agar ou de laitue.	Résultats prometteurs.	Essais récents.

Tableau IV.
Quelques méthodes pour libérer le Niclosamide de manière lente
(d'après ANDREWS *et al.*, 1987).

Mollusque utilisé	Concentration du produit en mg.l ⁻¹ (Temps d'exposition en heures)
<i>Biomphalaria glabrata</i> Say	1,5 mg.l ⁻¹ (2 h) 0,4 mg.l ⁻¹ (24 h)
<i>Bulinus truncatus</i> Audouin	2 mg.l ⁻¹ (2 h) 1 mg.l ⁻¹ (4 h) 0,3 mg.l ⁻¹ (24 h)
<i>Lymnaea peregra</i> Müller	1 mg.l ⁻¹ (24 h) 0,2 mg.l ⁻¹ (24 h)
<i>Lymnaea palustris</i> Müller	0,5 mg.l ⁻¹ (24 h)
<i>Lymnaea stagnalis</i> Linné	1 mg.l ⁻¹ (24 h)
<i>Lymnaea truncatula</i> Müller	0,2 mg.l ⁻¹ (10 h) 0,1 mg.l ⁻¹ (24 h)
<i>Physa acuta</i> Draparnaud	1 mg.l ⁻¹ (5 h)

Tableau V.
Les effets du Niclosamide sur quelques espèces de mollusques
(d'après ANDREWS *et al.*, 1987).

D'autres formulations ont été proposées par les chercheurs. ANDREWS *et al.* (1987) passent en revue les différentes concentrations. Aucune d'entre elles n'est commercialisée à l'heure actuelle.

La poudre mouillable et le concentré émulsionnable peuvent être distribués sur le terrain à l'aide d'appareils classiques d'épandage ou par avion. Des études ont cependant été menées depuis une vingtaine d'années pour trouver des formulations permettant une libération lente du produit actif sur une longue période. Le tableau IV présente les principales méthodes.

D. SON EFFICACITÉ.

1. Sur les mollusques.

Nous avons regroupé sur le tableau V les concentrations de Niclosamide et les temps d'exposition que les chercheurs ont rapportés pour des mollusques d'importance économique (*Biomphalaria glabrata*, *Bulinus truncatus*) ou pour des espèces qui vivent dans les pays tempérés de l'Europe de l'Ouest.

En pratique, les concentrations recommandées par le fabricant sont comprises entre 0,6 et 1 mg.l⁻¹ dans le cas de la poudre mouillable, entre 0,4 et 0,6 mg.l⁻¹ pour le concentré émulsionnable. Les temps d'exposition sont ceux de BARNISH et PRENTICE (1981) avec une durée de 8 heures pour la poudre mouillable, de 24 heures pour l'autre formulation.

Les deux préparations ont été largement utilisées sur le terrain. BARBOSA et COSTA (1981) ont appliqué, par exemple, l'une de ces formes (non précisée) pendant 12 ans au Brésil à raison de 2 mg.l⁻¹ dans les eaux stagnantes, et de 4 mg.l⁻¹ pendant 6 heures dans les eaux courantes: ils ont constaté que la prévalence de l'infestation humaine (par *Schistosoma mansoni*) a diminué de 58,2 % sur cette période. Les essais de BARNISH et PRENTICE (1981) et de BARNISH *et al.* (1982) sur une dizaine d'années dans l'île de Sainte-Lucie (Antilles) se sont traduits par la disparition totale de *B. glabrata* dans les habitats traités et par une chute de 92 % dans la prévalence de l'infection humaine au niveau des zones où la bilharziose est importante.

L'efficacité du Niclosamide est différente en fonction des stades de développement du mollusque. Une étude récente de TCHOUNWOU *et al.* (1991) montre que les oeufs des

Pulmonés sont plus sensibles au Niclosamide que les jeunes mollusques, lesquels sont à leur tour plus sensibles que les adultes.

Il faut noter également que le produit a une activité létale sur les miracidiums et les cercaires de plusieurs Trématodes.

2. Sur la faune et la flore associées.

Nous avons déjà présenté sur le tableau II (page 7) la toxicité du Niclosamide sur les Poissons, les Mammifères et les plantes qui vivent dans le milieu soumis au traitement.

Nous complétons ces premières données en rapportant des résultats sur d'autres organismes tels que les Invertébrés, les Amphibiens et les plantes terrestres ou aquatiques.

ANDREWS *et al.* (1987), dans leur revue, indiquent que l'action du Niclosamide est plus importante sur les animaux à tissus mous (comme la plupart des larves d'Invertébrés aquatiques) que chez les espèces possédant un exosquelette (comme les Écrevisses). Chez ces dernières, par exemple, la CL_{50} (concentration létale pour 50 % des individus) dépasse 50 mg.l^{-1} (à la 24^e heure de contact) alors qu'elle est comprise entre 1,5 et 3 mg.l^{-1} pour le même temps d'exposition chez les larves de Trichoptères (Insectes) possédant un fourreau.

Le gammare est souvent l'espèce cible pour les essais de molluscicides (LAJUGIE, 1992). Bien qu'il soit utile de tenir compte de la variabilité des résultats qui est liée aux différentes espèces utilisées par les auteurs, ANDREWS *et al.* notent que certaines d'entre elles peuvent avoir une CL_{50} de $2,6 \text{ mg.l}^{-1}$ à la 24^e heure ou de $2,4 \text{ mg.l}^{-1}$ à la 96^e heure (pour des animaux adultes) tandis que d'autres références font état d'une absence de mortalité chez des animaux exposés à $0,04\text{-}0,16 \text{ mg.l}^{-1}$ pendant 24 heures ou à 2 mg.l^{-1} pendant 48 heures. La souche locale de gammares (*Gammarus pulex pulex* Linné) utilisée par l'école de Limoges est, par contre, sensible au Niclosamide avec une CL_{50} de $1,53 \text{ mg.l}^{-1}$ à la 24^e heure d'exposition et de $0,48 \text{ mg.l}^{-1}$ à la 96^e heure (VIGNOLES, 1990; LAJUGIE, 1992).

Les Amphibiens sont sensibles au Niclosamide. Les têtards de plusieurs espèces meurent dans l'eau pour des concentrations de $0,1\text{-}0,2 \text{ mg.l}^{-1}$.

La plupart des algues testées présentent une réduction de leur croissance en présence de faibles concentrations de Niclosamide et une destruction pour des doses supérieures. II

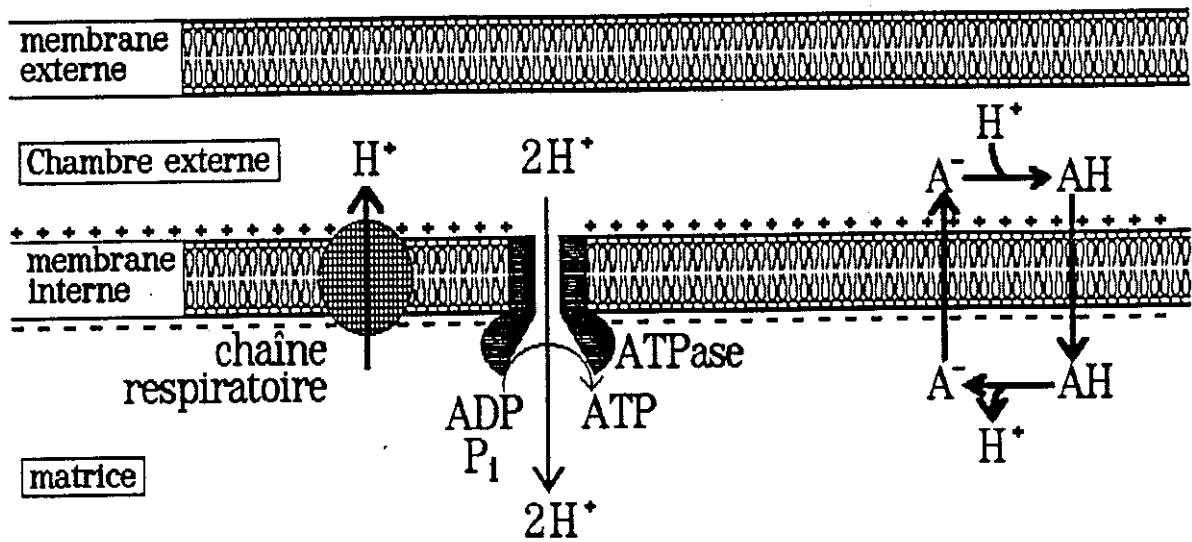


Figure 2.
Mode d'action du Niclosamide dans la mitochondrie
(d'après VIGNOLES, 1990).

Abréviations. AH: forme neutre de la molécule en milieu acide.
 A^- : ion phénate en milieu basique.

en est de même pour le sel d'éthanolamine. Les plantes aquatiques sont, dans l'ensemble, plus sensibles à ces toxiques que les plantes terrestres.

E. SON MODE D'ACTION.

Nous avons emprunté à VIGNOLES (1990) le schéma sur le principal mode d'action de ce toxique au niveau de la membrane interne de la mitochondrie.

Le pH agit sur l'état d'ionisation de la molécule. Dans la matrice où le pH est proche du pK_a de la molécule, la forme majoritaire du Niclosamide est l'ion phénate. Par contre, dans la chambre externe où le pH est plus faible, on trouve essentiellement la forme neutre.

Ces deux formes permettent un transport de protons à travers la membrane interne contre le gradient créé par la chaîne respiratoire, ce qui inhibe la synthèse d'ATP.

F. PROBLÈMES DE RÉSISTANCE.

Aucune résistance au Niclosamide n'a été signalée dans la littérature lors des essais réalisés sur le terrain.

La seule mention concerne l'étude que JELNES (1977) a réalisée sur deux souches de bulins (*B. truncatus*) provenant de la même localité (Iran) à dix ans d'intervalle. La zone de récolte avait été traitée chaque année par la poudre mouillable à la concentration de 1 mg.l^{-1} . Lorsque les deux souches ont été comparées au laboratoire, cet auteur a trouvé que la souche prélevée lors de la 10^e année était plus réfractaire au Niclosamide que celle qui avait été maintenue au laboratoire pendant les 10 années précédentes.

III. - 3,5-DICHLORO-2-BENZAMIDO-5-NITROTHIAZOLE.

Les données de ce paragraphe sont nettement plus réduites en nombre que celles du Niclosamide. A l'inverse de ce dernier où les premières études remontent aux années 1950, les premiers dérivés halogénés du BNT ont été synthétisés à partir de 1970 et les essais de toxicité sur les Invertébrés ont été réalisés vers les années 1980.

La plupart des éléments proviennent de l'analyse de deux thèses soutenues à Limoges: CLÉDAT, 1989; VIGNOLES, 1990. Les autres références utilisées sont indexées dans le texte correspondant.

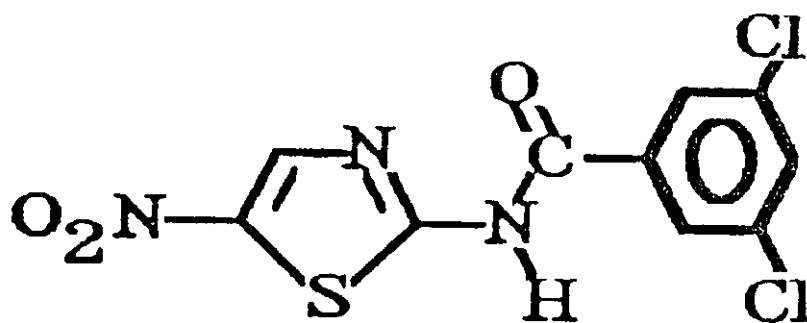


Figure 3.
Formule détaillée du 3,5-dichloro-BNT.

Paramètres	Valeurs	Observations
Masse molaire en g.mol^{-1}	318,25	-
pK_a	5,62	La constante d'acidité K_a a été mesurée dans $\text{H}_2\text{O} + \text{KCl}$ 0,1 M, à 20°C .
$\log P$	1,89	P correspond au coefficient de partage octanol/eau. Il est calculé par la méthode de LEO (1983).
$\log k$	- 1,66	k est la constante de vitesse du 1 ^{er} ordre pour l'hydrolyse alcaline en h^{-1} . Cette valeur a été mesurée dans le tampon glycine/NaOH, pH 10,8 + 10 % de CH_3CN , 40°C .
λ_1 en nm	347	λ_1 est la longueur d'onde du maximum d'absorption de la forme protonée (en nm).
$\log \epsilon_1$	3,97	ϵ_1 est le coefficient d'extinction molaire de la forme protonée en $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.
λ_2 en nm	420	λ_2 est la longueur d'onde du maximum d'absorption de la forme neutre (en nm).
$\log \epsilon_2$	4,15	ϵ_2 est le coefficient d'extinction molaire de la forme neutre en $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Tableau VI.
Les principaux paramètres physico-chimiques du 3,5-dichloro-BNT d'après VIGNOLES (1990) et les données récentes de M^{elle} CLÉDAT.

A. PRÉSENTATION DE LA MOLÉCULE.

Le 3,5-dichloro-BNT est un dérivé halogéné de la molécule de base sur laquelle deux groupements chlore ont été greffés en position 3 et 5 sur le cycle benzénique. Il comprend également une fonction amide, un groupement amine et un cycle thiazolique. La figure 3 montre la formule détaillée de ce produit.

Le tableau VI répertorie quelques propriétés physico-chimiques de ce dérivé en indiquant les méthodes de mesure pour certaines valeurs. Si l'on considère les chiffres les plus importants, il faut noter une masse molaire de 318,2 g.mol⁻¹. Les valeurs de pK_a et de log P nous ont été fournies par M^{lle} CLÉDAT¹. Le pK_a est de 5,62 et log P a une valeur de 1,89.

Ce produit se comporte comme une monobase faible. Il est, en effet, capable de capter un proton au niveau de l'azote endocyclique du groupement thiazole: ce dernier est le site de fixation privilégié pour les ions H⁺. C'est la raison pour laquelle nous indiquons sur le tableau VI les caractéristiques de la forme protonée et de la forme neutre.

Comme les autres dérivés du BNT, le produit présente une grande instabilité dans l'eau. La lipophilie de cette molécule se situe dans les valeurs moyennes (log P = 1,89) ce qui facilite son passage à travers la bicouche lipidique des membranes cellulaires.

La constante d'hydrolyse alcaline K est de 0,022 h⁻¹ à l'obscurité, avec un pH de 10,8 et à 40° C (CLÉDAT, 1989). La température de fusion est voisine de 200°-217° C (CAVIER *et al.*, 1978; MADULO-LEBLOND *et al.*, 1981).

La molécule est plus stable à l'obscurité qu'à la lumière. Dans sa thèse, CLÉDAT (1989) signale que la fraction décomposée au bout de 24 heures est de 80 % à la lumière solaire au lieu de 38 % à l'obscurité.

B. SA TOXICITÉ.

Des essais ont été réalisés chez différents Invertébrés et sur des algues par plusieurs auteurs (CAVIER *et al.*, 1978; MADULO-LEBLOND *et al.*, 1981; VIGNOLES, 1990).

¹. - Nous remercions M^{lle} CLÉDAT qui a bien voulu nous fournir ces deux valeurs.

Références bibliographiques	Espèces biologiques	Valeurs	Observations
CAVIER <i>et al.</i> , 1978.	<i>Biomphalaria glabrata</i> (Mollusques Pulmonés)	100 % de mortalité avec 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (à la 24 ^e h)	-
MADULO-LEBLOND <i>et al.</i> , 1981.	<i>B. glabrata</i>	CL > 90 % (en mg.l^{-1} à la 24 ^e h) 1 (jeunes), 0,1 (adultes), 0,05 (oeufs).	-
VIGNOLES, 1990; LACOUTURE, 1991; LAJUGIE, 1992.	<i>Lymnaea peregra</i> adulte (Mollusques) <i>Gammarus pulex pulex</i> (Crustacés)	CL ₅₀ = 0,53 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ à la 24 ^e h. CL ₅₀ = 0,38 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ à la 24 ^e h.	-
	<i>Euglena gracilis</i> (Algues unicellulaires)	CI ₅₀ = 6,76 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ à la 24 ^e h (à pH 3,5).	Le produit stimule aussi la croissance des algues à faible dose. CA _{max} = 0,33 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, à la 24 ^e h et à pH 3,5.

Tableau VII.
Quelques données sur la toxicité du 3,5-dichloro-BNT sur des Invertébrés et des Algues.

Abréviations. CL₅₀ et CL₉₀: concentrations létales pour 50 % et 90 % des animaux.
CI₅₀: concentration pour laquelle 50 % des algues ont une inhibition de leur croissance.
CA_{max}: concentration permettant une activation maximale de la croissance pour les algues.

1. Étude comparative chez diverses espèces.

Nous avons regroupé sur le tableau VII les résultats que plusieurs auteurs ont rapportés chez trois Invertébrés et une algue.

Les planorbes adultes sont plus sensibles que les jeunes au toxique. Cependant, on note des différences dans les chiffres des premières, avec une mortalité totale pour $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ et 24 h de contact (CAVIER *et al.*, 1978) alors qu'il faut $100 \mu\text{g}$ pour que la concentration soit létale pour 90 % des adultes et plus (MADULO-LEBLOND *et al.*, 1981). La limnée montre des résultats intermédiaires avec une CL_{50} de $168,7 \mu\text{g.l}^{-1}$ chez les adultes à la 24^e heure de contact.

La souche de gammares utilisée par les trois auteurs limousins est plus sensible que la limnée au 3,5-dichloro-BNT car sa CL_{50} est seulement de $120,9 \mu\text{g.l}^{-1}$ à la 24^e heure.

Chez les euglènes, on note deux phénomènes contradictoires. De faibles doses provoquent une activation maximale de la croissance tandis que des doses plus élevées entraînent une inhibition de celle-ci.

2. Comparaison avec les effets du Niclosamide.

L'activité molluscicide du 3,5-dichloro-BNT est légèrement plus faible que celle du Niclosamide jusqu'à la 48^e heure d'exposition mais elle se révèle supérieure si le temps de contact augmente.

Dans le cas des gammares, l'activité du produit est largement supérieure à celle du Niclosamide.

Il en est de même pour les euglènes cultivées à pH acide. Par contre, l'efficacité du BNT est plus faible si le pH est proche de la neutralité.

C. SON MODE D'ACTION.

Le mode d'action de ce dérivé est encore inconnu.

L'étude des relations entre la structure du produit et son activité quantitative permet d'émettre deux hypothèses que nous avons empruntées à VIGNOLES (1990):

- La première est basée sur deux résultats. Le 3,5-dichloro-BNT est une base faible capable de fixer un proton car son pK_a est proche du pH intra-mitochondrial. De plus, cette molécule est lipophile et peut traverser les membranes de la mitochondrie. Ceci permet de supposer que ce produit aurait une action découplante sur la chaîne respiratoire, en inhibant la synthèse de l'ATP.

- La seconde s'appuie sur la conformation relativement plane de la forme protonée ce qui permettrait une interaction avec les bases de l'ADN.

IV. - COMMENTAIRES.

Les résultats présentés dans les paragraphes précédents peuvent s'interpréter de la manière suivante:

- Le Niclosamide est encore commercialisé à l'heure actuelle. Son efficacité, son mode d'action et ses effets à terme sont maintenant bien connus.

- L'activité molluscicide du 3,5-dichloro-BNT est certaine mais les caractéristiques physico-chimiques du produit, son mode d'action et ses conséquences ne sont pas encore précisés.

Cette discordance montre que des recherches complémentaires sont encore nécessaires avant de proposer le dérivé du BNT comme molluscicide sur le marché. L'examen des résultats fournis par les auteurs (précités) révèle que trois points doivent être explorés en priorité:

- Le premier sujet se rapporte aux facteurs qui peuvent avoir une influence sur la toxicité du produit. En effet, il est admis depuis longtemps qu'une charge calcique élevée peut limiter l'activité d'un molluscicide (MARTIN et COUGHTREY, 1975; VINCENT *et al.*, 1986). Dans ces conditions, il semble utile de faire un criblage pour déterminer l'influence de ces facteurs comme la présence ou non d'un sédiment, sa nature, la vitesse de l'eau courante, ...

- Les deux autres points sont partiellement liés. Les voies de transit et d'élimination chez le mollusque ne sont pas encore bien connues pour certaines molécules proposées par les auteurs. C'est le cas du 3,5-dichloro-BNT dont le mode d'action est encore hypothétique. Si l'on soumet des mollusques à une charge sublétales de ce produit, avec une remise des survivants dans une eau normale, il nous paraît possible de connaître ces voies en procédant

à un contrôle histologique des lésions sur trois de leurs organes (glande digestive, gonade, rein).

Nous avons procédé à une expérimentation en nous adressant à un mollusque dulçaquicole, *Lymnaea glabra* Müller et en l'exposant au produit au cours de plusieurs essais. Ces derniers portent sur la détermination de la CL_{50} , ses fluctuations en fonction de différents facteurs et l'impact du toxique sur les viscères du mollusque.

Les résultats relatifs à cette expérimentation sont respectivement présentés dans les chapitres troisième et quatrième.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les deux premiers paragraphes sont consacrés respectivement à la présentation du matériel biologique et des deux produits chimiques. Le protocole des expériences et la méthodologie sont détaillés dans les deux temps suivants. Enfin, les paramètres utilisés et la présentation des données figurent à la fin de ce chapitre.

I. - MATÉRIEL BIOLOGIQUE.

A. PRÉSENTATION DU MOLLUSQUE.

Le mollusque retenu dans le cadre de cette expérimentation est *Lymnaea glabra*. Cette espèce est un Gastéropode Pulmoné aquatique qui appartient à la famille des *Lymnaeidae*.

Cette limnée se reconnaît à sa coquille très allongée, à son diamètre réduit et à sa petite ouverture qui ne dépasse pas le tiers de la hauteur globale (GERMAIN, 1931). De couleur fauve, le test est parfois recouvert d'un enduit grisâtre. La planche A 1 (page suivante) présente des schémas de cette coquille.

La hauteur maximale de cette espèce à l'état adulte ne dépasse pas les 22 mm.

Comme la plupart des Pulmonés dulçaquicoles, la limnée présente deux générations annuelles. La première provient des pontes que les individus transhivernants déposent en avril; elle subit les conditions estivales avec un assèchement éventuel des habitats et pond en

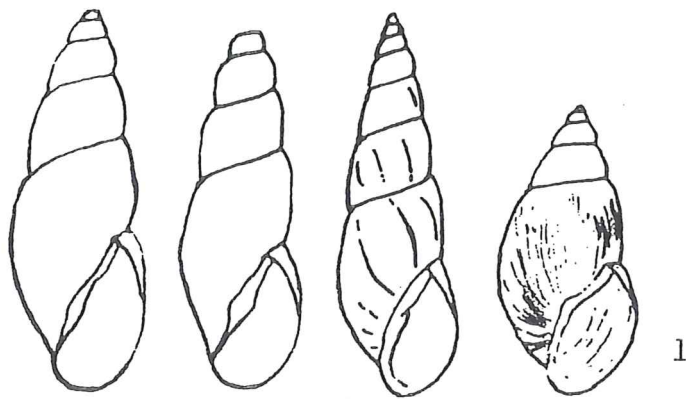


Planche A.
La coquille et l'habitat de *L. glabra*.
- Schémas de la coquille: 1
(d'après HUBENDICK, 1951).
- Photographie du fossé sur la commune
de Migné, département de l'Indre: 2.

septembre-octobre. La deuxième génération naît à partir de ces pontes et fournit les individus transhibernants.

B. LA POPULATION ÉTUDIÉE.

Elles vivent dans des fossés le long de la route D 24 d'une part, et le long de la D 46, à environ 2 km du bourg de Migné. La planche A 2 illustre la première station qui s'étend sur 300 m de longueur.

Des animaux adultes, de hauteur comprise entre 13 et 18 mm, ont été récoltés à intervalles réguliers dans cette station entre octobre 1992 et mars 1993. Ils appartiennent à la première génération annuelle de l'espèce. Ils ont été capturés à l'aide d'un filet troubleau ou d'une époussette (en toile de moustiquaire) par des mouvements réguliers avec aller et retour dans la couche la plus superficielle de l'eau, au milieu de la végétation présente dans les fossés.

Les limnées sont transportées sur des plantes humides jusqu'au laboratoire dans des conditions isothermes. Elles sont triées pour ne conserver que les mollusques adultes. Ces derniers sont maintenus en salle climatisée, dans des bacs d'élevage contenant 30 individus par litre d'eau. Ils sont nourris avec de la salade ou du cresson en suffisance. Les animaux ne sont mis en expérience qu'après une période minimale d'acclimatation de 48 heures aux conditions du laboratoire.

C. RAISONS DU CHOIX.

Elles sont liées à l'abondance des individus récoltés dans cette station (de 600 à 800 adultes en 30 minutes de collecte), à leur facilité de maintenance (stockage en grandes quantités sans pertes appréciables jusqu'à la 3^e semaine) et à leurs dimensions qui permettent un comptage aisé.

Le principal inconvénient est lié au comportement de cette espèce qui s'émerge facilement lorsqu'elle est expérimentée au laboratoire. Pour lutter contre cette tendance, les cristallisoirs d'expérience ont été remplis avec un volume suffisant de solution afin de ne laisser qu'un espace de 0,6-0,8 mm d'épaisseur entre le niveau du liquide et le couvercle qui ferme le récipient.

But de l'expérience		Doses utilisées	Conditions opératoires	Observations
Pour la détermination des CL ₅₀	Expérience type	de 0,1 à 1 mg.l ⁻¹	40 animaux acclimatés pendant 48 heures dans 2 litres de solution stagnante, non renouvelée. Présence de nourriture. Température: 20° C. Relevés quotidiens pendant 96 h.	26 essais pour chaque produit.
Pour l'étude des facteurs écologiques pris isolément.	<ul style="list-style-type: none"> * Durée de l'acclimation des limnées (24 h, 8 et 15 jours). * Nourriture (présence, absence). * Sédiment (sans, sable¹, marne). * Concentration en ions Ca⁺⁺ dissous (20 et 60 mg.l⁻¹). * Eau courante en circuit continu (6,8 l.min⁻¹, 5 cm.sec⁻¹). 	0,21 mg.l ⁻¹ (Niclo.), 0,15 mg.l ⁻¹ (3,5-BNT).	Idem à celles de l'expérience type.	Des témoins, non exposés au toxique, ont été constitués en parallèle.
Pour le contrôle histologique.	Pour la microscopie photonique.	0,21 mg.l ⁻¹ (Niclo.), 0,15 mg.l ⁻¹ (3,5-BNT).	Idem à celles de l'expérience type. Les survivants sont placés dans une eau normale pendant 21 jours.	Des témoins ont été constitués. Prélèvements réalisés aux dates suivantes: 1 ^e , 2 ^e , 3 ^e , 4 ^e , 12 ^e , 19 ^e et 26 ^e jours. 2 limnées par prélèvement.

¹. Sable de Fontainebleau (Prolabo).

Tableau VIII.

Les trois temps de l'expérience et les principales caractéristiques.
Abréviations. Niclo.: Niclosamide. 3,5-BNT: 3,5-dichloro-BNT.

Un autre inconvénient réside dans la rétraction du corps de l'animal lorsqu'il est soumis à certaines concentrations de toxique. Pour remédier à cette difficulté, nous n'avons considéré le mollusque comme mort qu'à la sortie involontaire de son corps à l'extérieur de la coquille sous l'effet de la lyse ou encore à l'apparition de champignons autour de l'ouverture.

II. - PRODUITS CHIMIQUES.

L'origine des produits est la suivante:

Produit	Niclosamide	3,5-dichloro-BNT
Origine	Laboratoire Roger Bellon, Neuilly-sur-Seine (92). Lot n° L 7.2452 avec 1 % d'impuretés.	Service de Chimie Organique, Institut Curie de Paris (Prof. DEMERSEMAN).

III. - PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.¹

La détermination de la CL₅₀ a été pratiquée avec des concentrations de 0,1 à 1 mg.l⁻¹. Les essais ont été doublés pour chaque dose ce qui correspond à 26 essais pour chaque toxique (tableau VIII).

Nous avons étudié l'influence de plusieurs facteurs écologiques pris isolément: la durée d'acclimatation pour les limnées aux conditions du laboratoire (24 h, 8 et 15 jours), la présence ou non de nourriture (salade), la présence ou non d'un sédiment sur le fond des récipients (sable de Fontainebleau, marne), la concentration en ions Ca⁺⁺ dissous dans l'eau d'élevage (20 et 60 mg.l⁻¹) et l'eau courante en circuit continu (avec un débit de 6,8 l.min⁻¹ et une vitesse de 5 cm.sec⁻¹).

Un contrôle histologique a été pratiqué sur des animaux soumis au toxique pendant 4 jours et sur les survivants remis dans une eau naturelle pendant les 21 jours suivants. Les prélèvements sont quotidiens jusqu'au 4^e jour et hebdomadaires par la suite.

¹. - *Le protocole de l'expérience, la méthodologie et les paramètres ont été rédigés en commun avec Mme BEAU.*

IV. - MÉTHODOLOGIE.

A. ÉLEVAGE DE LA LIMNÉE.

Les limnées sont maintenues dans des bacs standards (superficie, 0,66 m²) avec une concentration de 30 animaux par litre d'eau. L'eau est changée deux fois par semaine.

Les récipients sont placés dans une salle climatisée répondant aux conditions suivantes: température de 20° C, éclairage artificiel de 12 heures diurnes avec une intensité de 3.000 lux à la surface de l'eau, humidité relative de 80 %.

B. PRÉPARATION DES SOLUTIONS.

La solution mère est préparée en dissolvant 20 mg de chaque produit dans 20 ml de polyéthylène glycol 400.

La solution à expérimenter est réalisée en ajoutant un volume défini de la solution mère (qui varie selon la concentration finale de produit à obtenir) à de l'eau provenant de la station d'origine pour obtenir un volume de deux litres.

C. EXPOSITION DES ANIMAUX AU TOXIQUE.²

Les expériences ont été effectuées dans la salle climatisée dont les caractéristiques sont rapportées dans le paragraphe A.

Les deux litres de solution sont placés dans un cristalliseur de verre avec les 40 mollusques. Les récipients sont fermés par une plaque de plexiglass pour éviter la fuite des limnées. L'eau est oxygénée en permanence. Les animaux sont nourris avec de la salade en suffisance.

Les relevés biquotidiens portent sur les morts, les mollusques rétractés dans leur coquille et les individus en activité, qu'ils soient immergés ou émergés. Les morts sont éliminés du milieu. Les limnées émergées sont remises au contact du toxique.

². - *Les différentes solutions de BNT ou de Niclosamide perdent une partie de leur activité au cours de l'expérience. Nous n'avons pas étudié cette dégradation dans le cadre de ce travail. Les résultats rapportés dans les chapitres troisième et quatrième se réfèrent donc aux concentrations initiales.*

D. *TECHNIQUE HISTOLOGIQUE.*

Les animaux sont plongés directement dans du liquide de Bouin et leur coquille est enlevée immédiatement sous le stéréomicroscope. Les masses molles sont conservées dans le fixateur pendant 2 à 3 jours. Après une déshydratation classique par l'éthanol et le butanol tertiaire (GABE, 1968), les pièces sont incluses dans la cytoparaffine à 54°-56° C. Elles sont ensuite débitées en coupes sériées de 5 μ m d'épaisseur.

Les coupes sont montées sur lame histologique à raison de 5 coupes successives tous les 150 μ m. Elles sont colorées par l'hématoxyline de Harris associée au trichrome de Gabe modifié.

V. - PARAMÈTRES UTILISÉS.

A. *TOXICOLOGIE.*

Deux paramètres ont été utilisés.

1. Taux de mortalité.

On le détermine en rapportant le nombre de morts relevé à un temps donné t de l'expérience (valeurs cumulatives) à l'effectif initial des individus.

2. Concentration létale à 50 % (CL_{50}).

C'est la quantité de toxique pour laquelle on obtient une mortalité de 50 % des limnées.

Pour déterminer ce paramètre, on admet que les concentrations C de toxique nécessaires pour tuer les individus d'une population suivent une loi log-normale de moyenne m et d'écart type σ . La moyenne m est égale au logarithme décimal de la CL_{50} et l'écart type traduit la dispersion des valeurs de $\log C$ autour de la moyenne.

Les moyennes et les écarts types sont calculés à partir des taux de mortalité en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (MACCARIO, 1978; MACCARIO *et al.*, 1980).

Les deux valeurs m et σ permettent de calculer, pour chaque concentration, la probabilité théorique de la mortalité. En effet, le pourcentage des morts obtenu pour cette

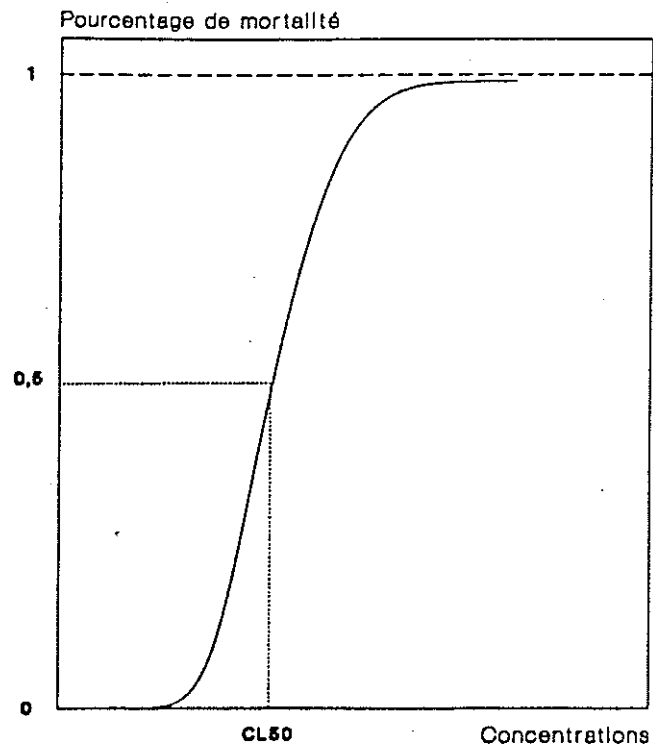


Figure 4.
Courbe de mortalité théorique établie à partir
du logarithme décimal des concentrations en toxique
(d'après LAJUGIE, 1992).

Viscère étudié	Indices pour la nécrose	Définition
Glande digestive	+	La nécrose affecte quelques cellules à calcium dans un secteur déterminé de la glande.
	++	Un quart des tubules digestifs au moins ont des cellules à calcium en lyse.
	+++	Nécrose de la plupart des cellules à calcium.
	++++	Le processus touche les différents types cellulaires.
Gonade	+	Une ou deux cellules folliculaires sont touchées par la lyse.
	++	Le processus s'étend aux spermatoocytes et spermatoïdes. Les cellules mâles sont dissociées.
	+++	Quelques ovocytes sont affectés également par la lyse.
	++++	La nécrose est plurifocale et s'étend à tous les types cellulaires. Elle entraîne souvent une atrophie de l'épithélium.
Rein ¹	+	La nécrose touche une lamelle ou deux dans un secteur défini. Les concrétions expulsées, les noyaux nus et les débris cellulaires sont isolés dans la lumière les uns des autres.
	++	Le nombre de lamelles touchées par la nécrose est plus élevé. Les concrétions et les débris forment de petits amas.
	+++	Un cordon de concrétions et de débris occupe la lumière centrale. Des débris sont présents dans l'uretère.
	++++	Les critères sont les mêmes avec formation d'une nappe homogène de concrétions et de débris.

¹. - Deux vagues de nécrose successives peuvent s'observer au niveau du rein. La première survient sur des lamelles d'aspect normal; la seconde se développe sur un épithélium en cours de reconstitution (avec des néphrocytes de petite taille, hyperplasiés).

Tableau IX.

Les indices utilisés pour codifier l'importance de la nécrose épithéliale dans les trois organes de *L. glabra* et leur définition.

concentration suit une loi binômiale de moyenne p et de variance $p(1-p)/n$, avec n pour désigner le nombre initial d'animaux. Comme on peut assimiler approximativement cette loi binômiale à une loi normale, on peut attribuer à ce pourcentage expérimental un intervalle de confiance à 95 %:

$$(p - 2 \sqrt{p(1-p)/n}, p + 2 \sqrt{p(1-p)/n})$$

Si le pourcentage observé tombe en dehors de cet intervalle, on peut admettre, avec un risque d'erreur de 5 %, que le point correspondant est aberrant. Le programme de calcul utilisé (STAT PHARMA, M. DEBORD) permet alors d'éliminer un tel point et de refaire l'estimation de m et σ sur les points restants. L'emploi d'un tel calcul est nécessaire car le nombre d'animaux utilisés est faible (80): dans ces conditions, la dispersion des valeurs observées autour de la courbe théorique $p = (\log C)$ est importante. Le raisonnement précédent permet ainsi de tester si l'écart constaté est dû aux fluctuations d'échantillonnage ou à l'influence d'une autre cause extérieure non contrôlée.

Ce calcul permet de déterminer une courbe de mortalité théorique qui s'ajuste au plus près des points expérimentaux. La figure 4 montre un exemple que nous avons emprunté à LAJUGIE (1992).

B. HISTOLOGIE.

Les observations ont porté sur trois viscères: glande digestive, gonade et rein. L'état de ces organes a été classé dans les catégories suivantes: développement normal, nécrose de l'épithélium, reconstitution de ce dernier, deuxième vague de nécrose survenant sur un épithélium en restauration pour le rein.

L'appréciation des trois derniers aspects a été réalisée en tenant compte de leur évolution dans le temps. Si une glande digestive présente des cellules en reconstitution alors que le reste de son épithélium est encore en nécrose, nous avons classé ce viscère dans la catégorie "reconstitution". Il en est de même pour les deux autres organes.

Comme la nécrose épithéliale a une intensité et une étendue variables dans les viscères, nous avons codifié l'importance de cette lésion à l'aide d'une gamme d'indices allant de + à + + + +. La définition de ces indices est présentée sur le tableau IX.

VI. - TESTS STATISTIQUES.

La plupart des données d'éco-toxicologie ont été soumises à l'analyse de variance à un seul (ou à deux) facteur(s).

Pour déterminer si les facteurs étudiés ont une influence significative sur la mortalité des limnées et, par suite, sur la toxicité des produits, nous nous sommes servis de deux variables:

- le nombre de morts cumulés pendant les 4 jours de l'étude. L'emploi de cette variable permet d'étudier l'influence d'un facteur sur la mortalité globale des limnées au cours de l'expérimentation.

- le nombre de décès par 24 heures. Cette mortalité quotidienne, non cumulée, permet d'apprécier l'influence d'un facteur sur les individus eux-mêmes.

Les résultats de l'analyse statistique sur le nombre de morts cumulés sont présentés dans le chapitre troisième. Ceux sur la mortalité quotidienne sont fournis dans l'annexe, page 75.

L'ACTIVITÉ MOLLUSCICIDE DES DEUX PRODUITS

Ce chapitre regroupe les observations et les données quantitatives que nous avons obtenues en exposant les *L. glabra* au Niclosamide et au 3,5-BNT.

Le premier paragraphe de cet exposé est consacré au comportement de la limnée en présence de ces molluscicides. Les valeurs des CL_{50} sont détaillées dans une deuxième subdivision. Les deux paragraphes suivants se rapportent à l'influence des facteurs écologiques et au commentaire de nos résultats par rapport à la littérature.

La plupart des données brutes sont répertoriées dans l'annexe, page 75. L'interprétation de ces résultats est présentée sous forme de figures et de tableaux dans les paragraphes ci-dessous.

I. - COMPORTEMENT DU MOLLUSQUE EN PRÉSENCE DU TOXIQUE.

A. DONNÉES QUALITATIVES.

Les *L. glabra* ont présenté plusieurs attitudes lorsqu'elles ont été exposées au toxique. Nous définissons ci-dessous les quatre types:

- Première attitude: la limnée s'émerge du milieu. Le mollusque possède, en effet, un certain degré d'amphibiose. Il est donc capable de sortir du milieu aquatique et de ramper sur la zone émergée des cristallisoirs ou sous le couvercle en raison de l'humidité qui y règne. Pour caractériser cette attitude, nous avons considéré qu'une limnée est émergée lorsque son pied se situe à l'air libre. Dans ces conditions, un mollusque peut avoir son pied hors de l'eau alors que le reste de la coquille se situe encore dans le milieu aquatique.

Pour remédier à cette amphibiose de *L. glabra*, nous avons réduit la zone émergée à une épaisseur de 0,5 cm entre le couvercle et la surface de l'eau.

- Deuxième attitude: la limnée est immergée et possède une activité normale. Le pied du mollusque est donc sorti de la coquille et l'animal se déplace à une vitesse variable dans la couche d'eau. Ce comportement est défini par "immergé" dans la suite de notre exposé¹.

- Troisième attitude: l'animal est rétracté dans le test. On reconnaît facilement cette réaction car le tiers externe du dernier tour de spire est vide et parfaitement visible. La coquille repose donc sur le fond du récipient, avec l'ouverture souvent vers le haut.

- Dernière attitude: le mollusque est mort. Les cadavres sont toujours difficiles à reconnaître pour un observateur non averti car les caractères sont proches de ceux fournis pour la troisième attitude. Le pied de l'animal n'est plus rétracté et apparaît à l'ouverture. La coquille repose sur le fond et présente parfois des filaments mycéliens sur le péristome lorsque le décès remonte à plusieurs heures avant le dénombrement.

B. DONNÉES QUANTITATIVES.

Pour illustrer ces comportements, nous avons présenté sur la figure 5 (page suivante) le pourcentage de *L. glabra* observées en position émergée, immergée ou rétractée dans la coquille pour une concentration subléthale de toxique.

¹. - Cette deuxième attitude est parfois difficile à reconnaître lorsque l'animal effectue son repos quotidien. Le pied remplit complètement le dernier tour de la coquille et ne sort pas à l'extérieur. On peut confondre cet état avec celui d'un animal qui vient juste de mourir (4^e attitude). Pour différencier ces deux réactions, il suffit de retirer la limnée et de toucher le pied avec un objet pointu. L'animal au repos rétracte alors son pied dans la coquille tandis que le cadavre n'a pas de réaction.

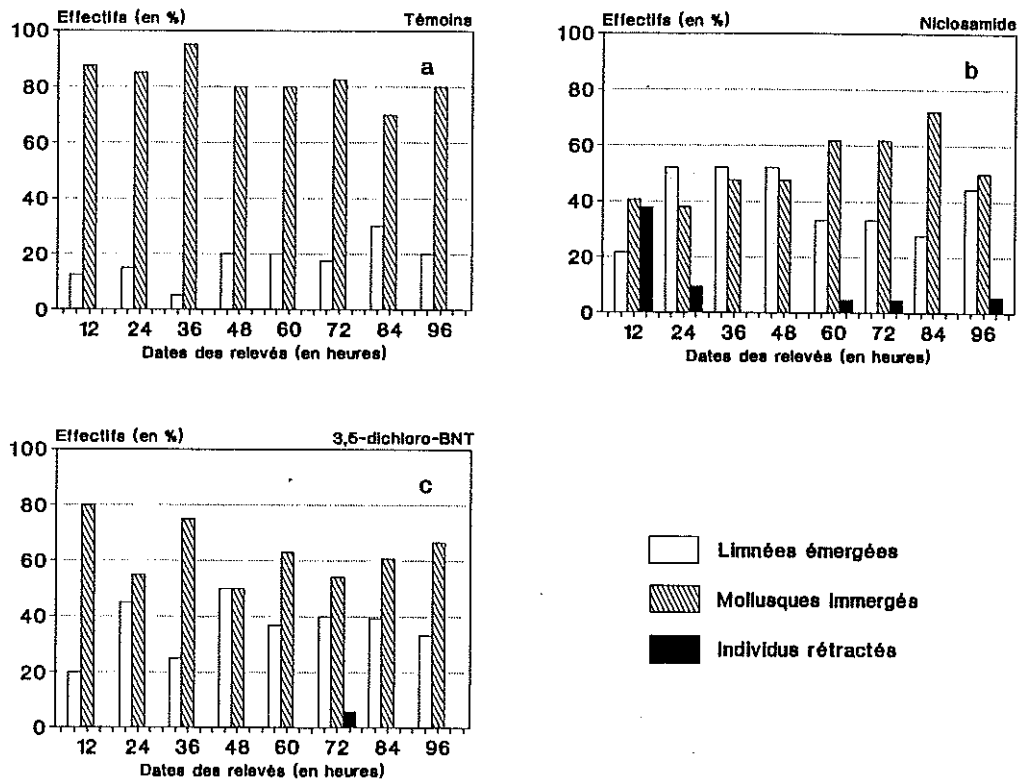


Figure 5.
Répartition des *L. glabra* en fonction de leur attitude pour les témoins et les limnées soumises au Niclosamide ($0,21 \text{ mg.l}^{-1}$) ou au 3,5-dichloro-BNT ($0,15 \text{ mg.l}^{-1}$). Les pourcentages sont établis avec un effectif de 80 mollusques au départ de l'expérience.

L'examen de la figure 5 permet les remarques suivantes²:

- Chez les témoins (graphe a), les pourcentages des limnées émergées sont compris entre 5 à 30 %. Ceux des mollusques immergés varient de 70 à 95 %. Nous n'avons pas observé d'animaux rétractés dans leur coquille.

- L'exposition au Niclosamide (0,21 mg.l⁻¹) se traduit par un accroissement sensible des pourcentages pour les limnées émergées jusqu'à la 48^e heure (à 52 %), suivi par un retour à des fréquences plus faibles lors des relevés ultérieurs (graphe b). Un processus inverse s'observe pour les mollusques immergés. Le pourcentage des individus rétractés est maximal à la 12^e heure (37 %), faible ou nul par la suite.

- Dans le cas du 3,5-dichloro-BNT (graphe c), on note un accroissement numérique des mollusques émergés jusqu'à la 48^e heure (à 50 %), suivi d'un palier à 33-40 % au cours des deux jours suivants. Les individus immergés prédominent en pourcentage tout au long de l'expérience et les animaux rétractés sont rarement observés.

Le traitement de ces données par l'analyse de variance (à un seul facteur) fournit les résultats suivants:

Catégories	Conditions de la comparaison	Valeurs du rapport F	Degrés de liberté	Significativité
Limnées émergées	Témoins/Niclo/BNT	11,3	2/21	< 0,1 %
	Témoins/Niclo	19,4	1/14	< 0,1 %
	Témoins/BNT	18,6	1/14	< 0,1 %
	Niclo/BNT	0,4	1/14	N.S.
Mollusques immergés	Témoins/Niclo/BNT	18,5	2/21	< 0,1 %
	Témoins/Niclo	37,8	1/14	< 0,1 %
	Témoins/BNT	18,7	1/14	< 0,1 %
	Niclo/BNT	3,6	1/14	N.S.

Abréviations. N.S.: non significatif.

Ces résultats montrent que l'addition de toxique dans le milieu provoque une modification du comportement des limnées. On note également que la différence de comportement n'est pas significative lorsque l'on compare les effets des deux produits.

². - Les morts sont comptabilisés dans le calcul des pourcentages mais les valeurs ne sont pas fournies sur ces graphes.

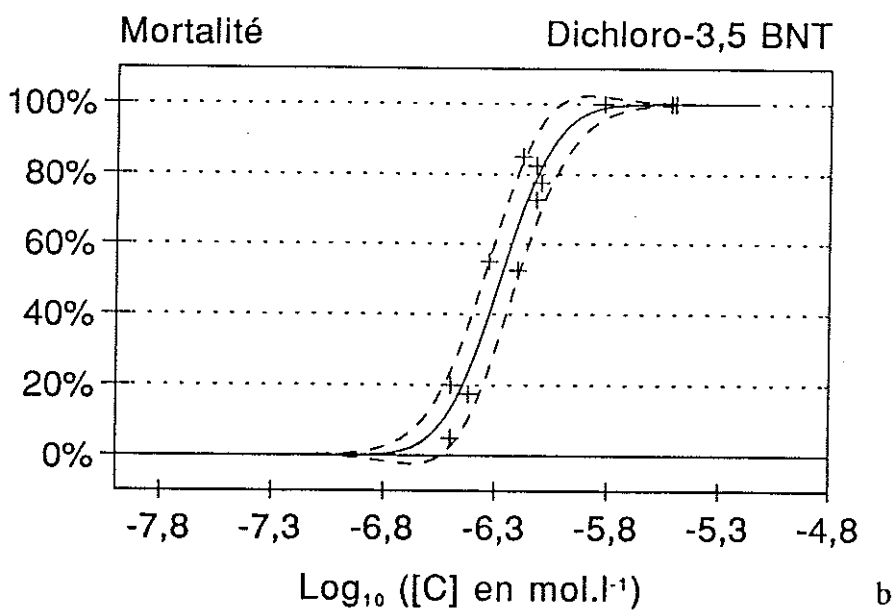
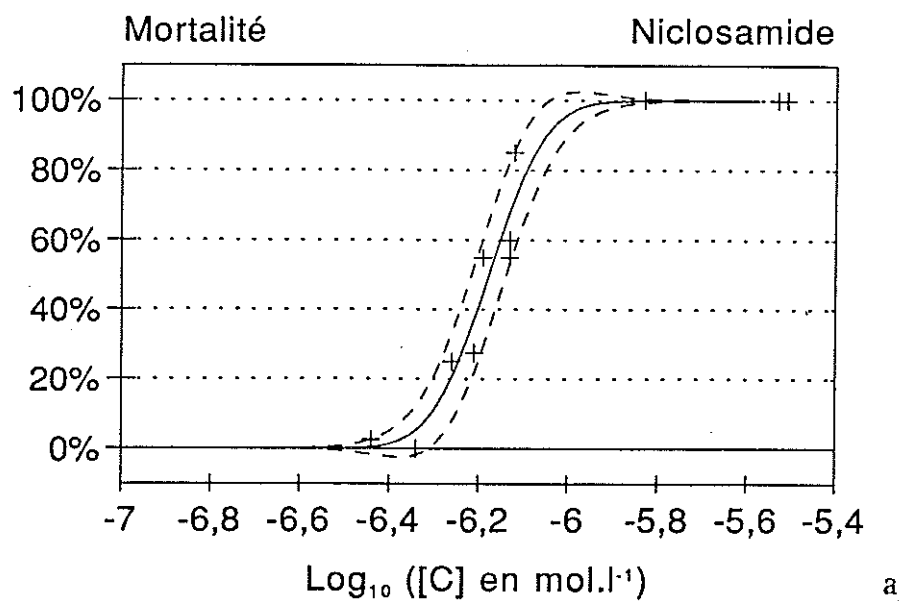


Figure 6.

Répartition des points expérimentaux pour la mortalité de *L. glabra* autour de la courbe calculée en fonction du logarithme décimal de la concentration molaire en toxique.

Cas du Niclosamide (6a) et du 3,5-dichloro-BNT (6b).

La courbe est représentée avec l'intervalle de confiance du pourcentage au risque de 5 %.

II. - DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION LÉTALE À 50 %.

Les valeurs expérimentales³ sur la mortalité de *L. glabra* sont présentées sur la figure 6 par rapport à la courbe théorique pour le Niclosamide (graphe a) comme pour le 3,5-dichloro-BNT (graphe b).

Celles des pCL_{50} ⁴ et des écarts types sont fournies dans le tableau⁵ ci-dessous:

Produit	Durée de l'exposition (en heures)	CL_{50} en mol.l ⁻¹	Écart type σ	pCL_{50}
Niclosamide	48 h	$7,64 \cdot 10^{-7}$	0,12	6,12
	60 h	$7,58 \cdot 10^{-7}$	0,13	6,12
	72 h	$6,85 \cdot 10^{-7}$	0,08	6,16
	84 h	$6,75 \cdot 10^{-7}$	0,09	6,17
	96 h	$6,65 \cdot 10^{-7}$	0,1	6,18
3,5-dichloro-BNT	48 h	$9,87 \cdot 10^{-7}$	0,27	6,01
	60 h	$9,27 \cdot 10^{-7}$	0,25	6,04
	72 h	$6,22 \cdot 10^{-7}$	0,17	6,21
	84 h	$5,75 \cdot 10^{-7}$	0,18	6,24
	96 h	$5,27 \cdot 10^{-7}$	0,2	6,28

La lecture de ce tableau permet les remarques suivantes:

- Les valeurs des pCL_{50} augmentent en fonction du temps. De la 48^e à la 96^e heure, les pCL_{50} du 3,5-dichloro-BNT passent, par exemple, de 6,01 à 6,28 ce qui correspond à une chute de la dose de $9,87 \cdot 10^{-7}$ à $5,27 \cdot 10^{-7}$ mol⁻¹ en deux jours.

- La toxicité du 3,5-dichloro-BNT est plus élevée à la fin de l'expérience que celle du Niclosamide (avec une pCL_{50} de 6,28 à la 96^e heure au lieu de 6,18).

3. - Plusieurs points expérimentaux n'ont pas été retenus pour la confection de ces courbes car ils se situent en dehors de l'intervalle de confiance des pourcentages et sont donc aberrants.

4. - La pCL_{50} correspond à la formule suivante: $pCL_{50} = -\log CL_{50}$ (CL_{50} en mol.l⁻¹). Le $\log CL_{50}$ est la moyenne des logarithmes des doses létales individuelles.

5. - Les valeurs des 36 premières heures n'ont pas été considérées dans ce tableau en raison de leur grande variabilité.

Catégories	Témoins				Niclosamide à 0,21 mg.l ⁻¹				3,5-dichloro-BNT à 0,15 mg.l ⁻¹			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Durée de l'acclimatation												
* 24 heures	0	0	0	0	36	36	38	38	0	0	2	4
* 8 jours	0	2	6	6	62	64	64	64	0	0	2	8
* 15 jours	0	4	4	4	22	26	26	26	8	54	62	66
Présence d'un sédiment												
* Sable de Fontainebleau	0	0	0	2	50	54	54	56	8	19	26	33
* Marne	0	0	0	0	0	14	16	16	0	3	4	5
Teneur en ions calcium												
* 20 mg.l ⁻¹	2	2	2	6	48	50	56	56	18	68	74	74
Absence de nourriture	0	0	0	0	18	20	20	20	18	42	50	58
Eau courante	0	0	0	0	0	80	80	80	9	41	45	47

Tableau X.
 Les effets de quelques facteurs sur la mortalité de *L. glabra*.
 Les chiffres correspondent aux nombres de morts (cumulés).
 L'effectif est de 80 mollusques au départ de chaque expérience.

III. - L'INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS SUR LA TOXICITÉ DES PRODUITS.

Le tableau X fournit l'ensemble des données que nous avons obtenues au cours de nos expériences. Les résultats des expériences type correspondent aux chiffres de la première ligne (acclimatation de 24 heures).

A. DURÉE DE L'ACCLIMATATION AU LABORATOIRE.

La lecture du tableau X montre que le nombre de morts s'accroît chez les témoins et les individus soumis au 3,5-dichloro BNT lorsque la durée de l'acclimatation augmente. Dans la série exposée au Niclosamide, on retrouve ce fait chez les limnées acclimatées depuis 24 heures et 8 jours; par contre, après une durée de 15 jours, le nombre de morts reste inférieur à celui enregistré chez les mollusques de 24 heures.

Le tableau présenté ci-dessous fournit les résultats de l'analyse de variance à deux facteurs. Celle-ci a été réalisée sur le nombre de morts cumulés.

Catégories	Durée d'acclimatation 2/6 ddl		Durée de l'expérience 3/6 ddl	
	F	sgf	F	sgf
	Témoins	5,57	< 5 %	3,43
Niclosamide	1995,86	< 0,1 %	6,14	< 5 %
3,5-dichloro BNT	13	< 0,1 %	1,47	N.S.

Catégories	Durée d'acclimatation 2/4 ddl		Nature du toxique 2/4 ddl	
	F	sgf	F	sgf
	1 ^e jour	0,57	N.S.	8,91
2 ^e jour	0,31	N.S.	2,13	N.S.
3 ^e jour	0,34	N.S.	1,71	N.S.
4 ^e jour	0,38	N.S.	1,75	N.S.

Abréviations. ddl: degrés de liberté. N.S. non significatif. sgf: significativité.

La mortalité globale observée chez les témoins et les limnées soumises au toxique est liée à la durée de l'acclimatation ($p < 5 \%$ ou $< 0,1 \%$). Par contre, on constate que la durée de l'expérience n'a pas d'effets significatifs sur la mortalité à l'exception de la série exposée au Niclosamide ($p < 5 \%$).

Catégories	Nature du sédiment 2/6 ddl		Durée de l'expérience 3/6 ddl	
	F	sgf	F	sgf
Témoins	1	N.S.	1	N.S.
Niclosamide	33,39	< 0,1 %	2,93	N.S.
3,5-dichloro BNT	19,17	< 1 %	2,71	N.S.
Catégories	Nature du sédiment 2/4 ddl		Nature du toxique 2/4 ddl	
	F	sgf	F	sgf
1 ^{er} jour	2	N.S.	22,45	< 0,1 %
2 ^e jour	3,93	N.S.	42,2	< 0,1 %
3 ^e jour	3,63	N.S.	32,77	< 0,1 %
4 ^e jour	3,47	N.S.	24,86	< 0,1 %

Tableau XI.

Résultats de l'analyse de variance (à deux facteurs) sur la nature du sédiment d'une part, et sur la durée de l'expérience ou la nature du toxique d'autre part.

Abréviations. ddl: degrés de liberté. N.S. non significatif. sgf: significativité.

Nombre de morts cumulés.

Catégories	Teneur en ions Ca ⁺⁺ 1/3 ddl		Durée de l'expérience 3/3 ddl	
	F	sgf	F	sgf
Témoins	2,45	N.S.	1	N.S.
Niclosamide	106,78	< 1 %	3,07	N.S.
3,5-dichloro BNT	19,15	< 2,5 %	1,18	N.S.
Catégories	Teneur en ions Ca ⁺⁺ 1/2 ddl		Nature du toxique 2/2 ddl	
	F	sgf	F	sgf
1 ^{er} jour	5,22	N.S.	29,82	< 5 %
2 ^e jour	1,9	N.S.	1,58	N.S.
3 ^e jour	2,1	N.S.	1,77	N.S.
4 ^e jour	0,57	N.S.	1,9	N.S.

Tableau XII.

Résultats de l'analyse de variance (à deux facteurs) sur la teneur en ions Ca⁺⁺ d'une part, et sur la durée de l'expérience ou la nature du toxique d'autre part.

Abréviations. ddl: degrés de liberté. N.S.: non significatif. sgf: significativité.

Nombre de morts cumulés.

Les autres comparaisons montrent que les effets ne sont pas significatifs sauf pour la nature du toxique au 1^{er} jour d'expérience ($p < 5 \%$).

La comparaison des résultats sur le nombre de morts par 24 heures a également été effectuée (annexe, tableau II A, page 76). La durée de l'acclimatation, dans ce cas, n'a pas d'influence nette sur le nombre journalier des morts. Les seuls effets significatifs concernent la durée de l'expérience dans le cas du Niclosamide ($p < 1 \%$) et la nature du toxique au 4^e jour ($p < 2,5 \%$).

B. FACTEUR SÉDIMENT.

Le tableau X (page 42) montre que la toxicité des deux produits sur les *L. glabra* est supérieure à celle que nous avons relevée dans l'expérience type lorsque du sable de Fontainebleau est présent dans les récipients. Par contre, en présence de marne, la toxicité est fortement atténuée par rapport à celle relevée dans les expériences types ou avec le sable.

Les résultats de l'analyse statistique sur le nombre de morts cumulés sont fournis dans le tableau XI. Ils confirment les remarques précédentes en montrant l'influence significative du sédiment sur l'évolution globale de la mortalité chez les limnées soumises au toxique ($p < 1$ ou $< 0,1 \%$). La durée de l'expérience n'a pas d'effet significatif. Lorsque l'on étudie l'influence de la nature du toxique, on constate une significativité nette pour chaque jour ($p < 0,1 \%$).

Si l'on considère le nombre de morts par 24 heures (tableau III A, page 76), on constate que le sédiment a une influence significative sur le nombre journalier des décès dans le seul cas du 3,5-dichloro BNT ($p < 0,1 \%$). Les autres effets significatifs concernent la date du relevé pour le Niclosamide ($p < 1 \%$) comme précédemment ainsi que la nature du toxique aux 1^{er} et 3^e jours ($p < 2,5 \%$ et $p < 1 \%$ respectivement).

C. CONCENTRATION DE L'EAU EN IONS CALCIUM.

La présence d'une teneur réduite (20 mg.l^{-1}) se traduit par une augmentation globale de la mortalité aussi bien pour le Niclosamide que pour le 3,5-dichloro BNT. Ce fait est confirmé par les résultats de l'analyse statistique (tableau XII). La nature des toxiques a, également, une influence significative au 1^{er} jour d'expérience.

Catégories	Nourriture 1/3 ddl		Durée de l'expérience 3/3 ddl	
	F	sgf	F	sgf
Témoins	0	N.S.	0	N.S.
Niclosamide	1225	< 0,1 %	3,67	N.S.
3,5-dichloro BNT	26,35	< 2,5 %	1,43	N.S.
Catégories	Nourriture 1/2 ddl		Nature du toxique 2/2 ddl	
	F	sgf	F	sgf
1 ^{er} jour	0	N.S.	2,33	N.S.
2 ^e jour	0,25	N.S.	0,85	N.S.
3 ^e jour	0,26	N.S.	0,87	N.S.
4 ^e jour	0,31	N.S.	0,86	N.S.

Tableau XIII.

Résultats de l'analyse de variance (à deux facteurs) sur la nourriture d'une part, et sur la durée de l'expérience ou la nature du toxique d'autre part.

Abréviations. ddl: degrés de liberté. N.S. non significatif. sgf: significativité.

Nombre de morts cumulés.

Catégories	Eau courante 1/3 ddl		Durée de l'expérience 3/3 ddl	
	F	sgf	F	sgf
Témoins	1	N.S.	1	N.S.
Niclosamide	1,37	N.S.	1,07	N.S.
3,5-dichloro BNT	15,84	< 5 %	1	N.S.
Catégories	Eau courante 1/2 ddl		Nature du toxique 2/2 ddl	
	F	sgf	F	sgf
1 ^{er} jour	0,43	N.S.	0,62	N.S.
2 ^e jour	3,99	N.S.	5,73	N.S.
3 ^e jour	4	N.S.	5,86	N.S.
4 ^e jour	4	N.S.	5,81	N.S.

Tableau XIV.

Résultats de l'analyse de variance pour les expériences sur l'eau courante d'une part, et sur la durée de l'expérience ou la nature du toxique d'autre part.

Abréviations. ddl: degrés de liberté. N.S.: non significatif. sgf: significativité.

Nombre de morts cumulés.

Les résultats sur le nombre de décès par 24 heures sont présentés dans la première annexe (tableau IV A, page 77). La teneur de l'eau en ions calcium n'a pas d'influence sur la mortalité journalière des limnées. Les seuls effets significatifs concernent la durée de l'expérience pour le Niclosamide ($p < 1 \%$) et la nature du toxique au 1^{er} jour d'expérience ($p < 5 \%$).

D. *FACTEUR NOURRITURE.*

L'absence de nourriture (tableau X, page 42) se traduit par une augmentation de la mortalité dans le cas du 3,5-dichloro BNT. Par contre, dans le cas du Niclosamide, le nombre des morts est plus faible que celui enregistré dans l'expérience type.

Le tableau XIII confirme ces faits en montrant l'influence significative de ce facteur sur l'évolution globale de la mortalité dans les séries exposées aux toxiques ($p < 2,5 \%$ ou $< 0,1 \%$). Les autres facteurs étudiés n'ont pas d'influence dans le cadre de cette étude.

Nous n'avons pas noté de différence significative lorsqu'on compare les données sur le nombre de décès par 24 heures (tableau V A, page 77).

E. *FACTEUR EAU COURANTE.*

Lorsque les limnées sont maintenues dans l'eau courante, on ne constate pas de morts chez les témoins (tableau X). Dans les séries exposées au toxique, la mortalité est plus élevée que celle notée dans les expériences type correspondantes. Elle est même soudaine dans le cas du Niclosamide avec le décès de l'effectif total entre la 24^e et la 48^e heures de l'expérience.

Cette constatation est confirmée par l'analyse statistique sur le nombre de morts cumulés dans le cas du 3,5-dichloro BNT ($p < 5 \%$, tableau XIV). La durée de l'expérience n'a pas d'effet significatif. L'étude simultanée avec le facteur eau courante et le facteur nature du toxique montre que les effets ne sont pas significatifs.

La comparaison sur le nombre de décès par 24 heures (tableau VII A, page 78) ne montre pas de différence significative dans le cadre de cette étude.

DONNÉES HISTOPATHOLOGIQUES

Nous avons regroupé dans ce chapitre les résultats de l'étude histopathologique que nous avons effectuée sur les viscères de *L. glabra* lorsque le mollusque est exposé à une concentration sublétales de Niclosamide ou de 3,5-dichloro-BNT. Il s'agit de reconnaître les processus lésionnels dans trois organes cibles (glande digestive, gonade, rein) et de suivre cette pathologie dans le temps.

I. - ÉTUDE DESCRIPTIVE DES LÉSIONS.

L'examen des coupes histologiques permet de reconnaître trois lésions au niveau des organes cibles. L'une d'entre elles est la nécrose de l'épithélium et celle-ci est la première à se développer dans le temps. La seconde concerne la reconstitution de ce feuillet avec la croissance de nouvelles cellules. La troisième est la survenue d'une nouvelle vague de nécrose sur les lamelles rénales à épithélium reconstitué.

A. GLANDE DIGESTIVE.

La nécrose est plurifocale. Elle touche d'abord quelques cellules à calcium (Planche B, n° 1, page suivante) et s'étend ensuite pour affecter l'ensemble de l'épithélium. La reconstitution se reconnaît aux bombements épithéliaux au niveau des tubules. Ces derniers montrent des signes d'hyperactivité (n° 2).

1. *Première micrographie*: nécrose partielle dans la glande digestive au niveau des cellules à calcium. Les flèches indiquent les plages nécrosées. Quelques amibocytes (têtes de flèche) sont présents entre les tubules (Tu). Intensité +. Niclosamide, 24^e heure d'exposition. Grossissement: x 1.320.

2. *Deuxième micrographie*: reconstitution dans un tubule digestif. La flèche montre un bombement épithélial formé par les cellules à calcium. Noter, en plus, l'hyperactivité de l'épithélium avec des vacuoles intra-cytoplasmiques de grande taille (têtes de flèche). 3,5-dichloro-BNT, 19^e jour. Grossissement: x 540.

3. *Troisième micrographie*: nécrose partielle dans une gonade. Les points jaunes (flèches) correspondent à des cellules péri-folliculaires nécrosées. Les ovocytes (O) ont encore un aspect normal. Quelques spermatozoïdes (Sp) sont présents dans la lumière de l'acinus. Intensité ++. 3,5-dichloro-BNT, 96^e heure d'exposition. Grossissement: x 132.

Les tubules de la glande digestive (en vert) présentent une nécrose épithéliale d'intensité ++. Des amibocytes (*) sont présents entre la gonade et certains tubules digestifs.

4. *Quatrième micrographie*: atrophie de l'épithélium germinal dans deux acini gonadiques (flèches). Intensité de la nécrose: + + + +. Niclosamide, 12^e jour d'expérience. Grossissement: x 132.

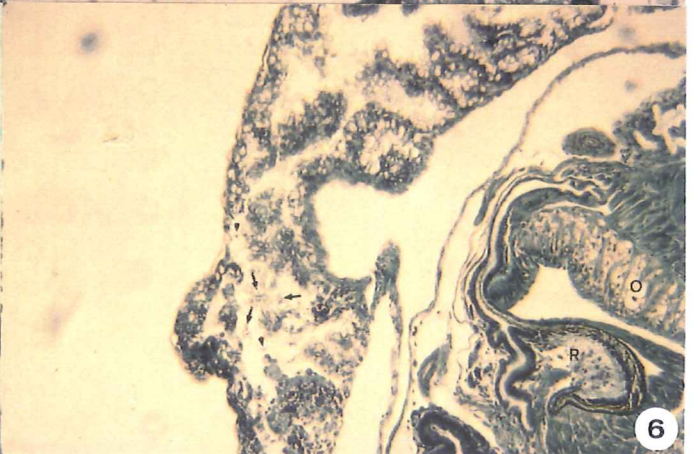
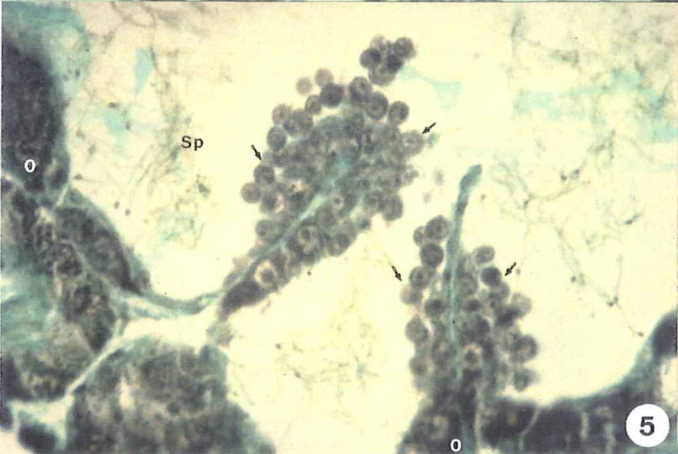
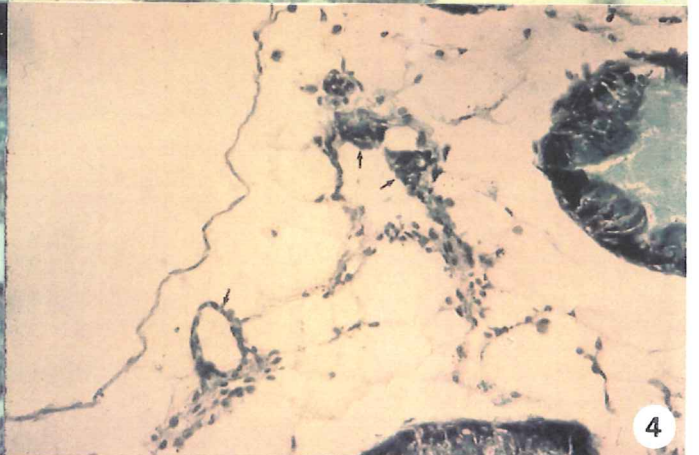
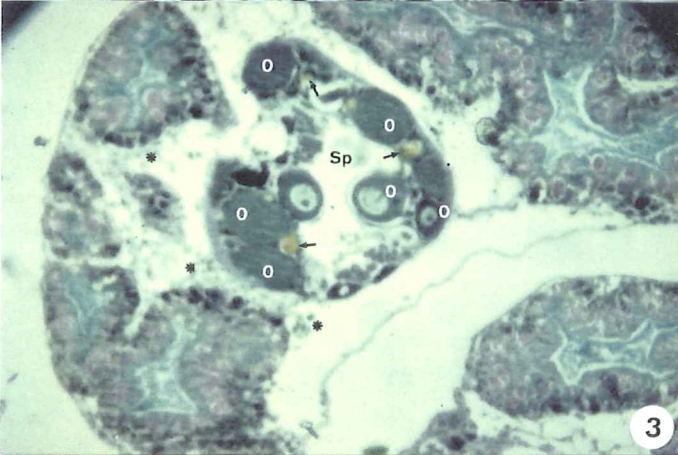
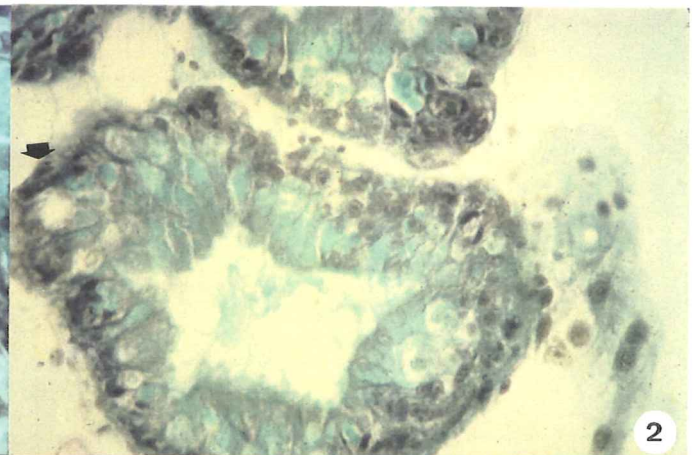
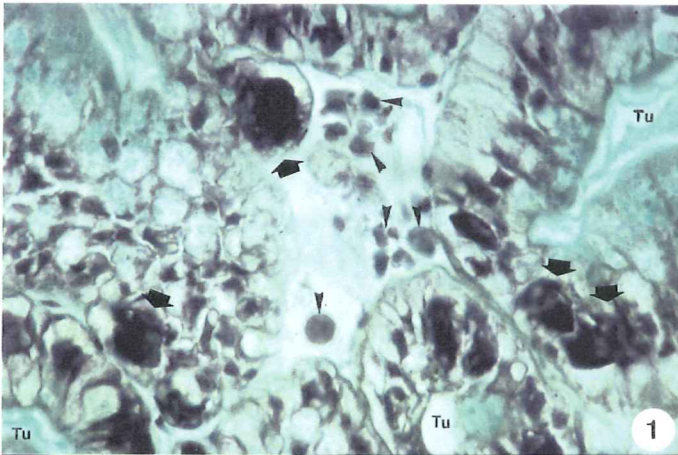
Les tubules digestifs (en vert) ont une nécrose d'intensité + + +.

5. *Cinquième micrographie*: reconstitution de l'épithélium germinal dans une gonade sous forme de micro-foyers. Les ovocytes (O) sont peu développés. Les cellules de la lignée mâle (flèches) ont une épaisseur réduite. Quelques spermatozoïdes (Sp) sont présents. Niclosamide, 26^e jour. Grossissement: x 1.320.

6. *Sixième micrographie*: nécrose de l'épithélium au niveau des lamelles rénales (première vague). Des concrétions libres (flèches) et des débris épithéliaux (têtes de flèche) s'observent dans la lumière du rein et entre les lamelles. Intensité ++. Niclosamide, 48^e heure d'exposition. Grossissement: x 132.

Autres abréviations. O: odontophore. R: radula

Planche B.
Les processus lésionnels chez *L. glabra*
lors de l'exposition à un toxique.



B. GONADE.

La nécrose s'observe d'abord au niveau des cellules péri-folliculaires (n° 3). Le processus s'étend ensuite aux cellules mâles où l'on observe une dissociation. Les ovocytes sont plus tardivement touchés, ce qui entraîne souvent une atrophie de l'épithélium germinifère (n° 4).

L'activité de la gonade est variable lors de la reconstitution. Les acini peuvent être remplis de spermatozoïdes mais on note fréquemment la présence de micro-foyers comme le montre la photographie n° 5. Les spermatocytes et les cellules ultérieures ne se développent que dans les zones où persistent des spermatogonies.

C. REIN.

Des concrétions en nombre variable et des noyaux nus, accompagnés de débris cellulaires sont expulsés dans la lumière lors de la première vague de nécrose (n° 6). Des dépôts denses s'observent dans les sinus intra-lamellaires jusqu'à la 72^e heure.

La reconstitution se reconnaît aux cellules épithéliales plus nombreuses qui, de petite taille au début, s'accroissent avec le temps. Une seconde phase de nécrose peut se développer à nouveau avec une atteinte plus irrégulière que dans le cas de la première vague.

II. - FRÉQUENCE DES LÉSIONS.

Les viscères des témoins ont un aspect structural normal, quelle que soit la date de leur sacrifice.

Par contre, des dommages s'observent chez les animaux intoxiqués. Les tableaux XV et XVI montrent la répartition des lésions en fonction des trois types lésionnels.

A. CAS DU NICLOSAMIDE (tableau XV, page suivante).

Deux glandes digestives ont un aspect normal à la 24^e et à la 48^e heure d'exposition. Les autres lésions présentent, jusqu'au 19^e jour, une nécrose partielle dont l'intensité augmente en fonction du temps. La reconstitution touche une glande au 19^e jour et les deux viscères du 26^e jour.

Viscère et lésion	Répartition des mollusques exposés au Niclosamide						
	24 heures	48 heures	72 heures	96 heures	12 jours	19 jours	26 jours
Glande digestive.							
- Aspect normal.	1	1					
- Nécrose +		1	1				
++	1		1	1		1	
+++				1	2	1	
++++							
- Reconstitution.						1	2
Gonade.							
- Nécrose +	1	2					
++	1		2	1		1	
+++				1			
++++					1		
- Reconstitution.					1	1	2
Rein.							
- Nécrose (1 ^e vague)							
+	2	1					
++		1	1	1			
+++			1				
++++				1	1		
- Reconstitution.					1	1	
- Nécrose (2 ^e vague)							
+						1	1
++							1

Tableau XV.
Répartition des limnées exposées au Niclosamide (0,21 mg.l⁻¹)
en fonction de l'aspect lésionnel du viscère.

Viscère et lésion	Répartition des mollusques exposés au 3,5-dichloro-BNT						
	24 heures	48 heures	72 heures	96 heures	12 jours	19 jours	26 jours
Glande digestive. - Aspect normal. - Nécrose + ++ +++ ++++ - Reconstitution.	1 1	2	2	1 1	1	2	2
Gonade. - Aspect normal. - Nécrose + ++ +++ ++++ - Reconstitution.	1 1	1 1	2	1 1	1	2	2
Rein. - Aspect normal. - Nécrose (1 ^e vague) + ++ +++ ++++ - Reconstitution. - Nécrose (2 ^e vague) + ++ +++	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1

Tableau XVI.
Répartition des limnées exposées au 3,5-dichloro-BNT (0,15 mg.l⁻¹)
en fonction de l'aspect lésionnel du viscère.

Aucune gonade n'est normale chez ces mollusques. La nécrose s'observe dans les glandes jusqu'au 19^e jour d'expérience avec une faible intensité (cotes + et ++) pendant les quatre premiers jours. La reconstitution se développe à partir du 12^e jour (1 limnée) et touche 3 mollusques jusqu'au 26^e jour.

Il faut noter que la nécrose est souvent partielle dans la glande digestive et la gonade, à l'exception d'une limnée qui possède une glande hermaphrodite atrophiée et en lyse totale (cote + + + +) au 12^e jour.

Les processus lésionnels sont plus complexes au niveau du rein. Une première phase de nécrose est déjà présente à partir de la 24^e heure et se développe en devenant totale chez deux limnées sacrifiées à la 96^e heure et au 12^e jour. La reconstitution lui fait suite chez deux mollusques au 12^e et au 19^e jour. Au-delà, on assiste au développement d'une deuxième vague de nécrose sur l'épithélium reconstitué et ce processus affecte les deux mollusques sacrifiés au 26^e jour.

Des dépôts denses sont présents dans les sinus intra-lamellaires à la 24^e et à la 48^e heure d'exposition. Leur développement n'a été observé que dans cette série.

B. CAS DU 3,5-DICHLORO-BNT.

Les résultats sont rapportés sur le tableau XVI.

L'évolution des lésions se superpose à celle que nous avons déjà rapportée dans le cas du Niclosamide. Quelques différences peuvent cependant être notées:

- L'évolution des lésions au niveau des trois organes est relativement stable chez les limnées exposées au 3,5-dichloro-BNT et sacrifiées à la 48^e ou à la 72^e heure.

- La nécrose de l'épithélium n'est pas complète dans la glande digestive et la gonade à l'inverse de la série exposée au Niclosamide où l'on observe une glande avec un tel aspect au 12^e jour.

- La reconstitution est plus précoce dans le cas de la glande digestive et de la gonade. Elle apparaît au 12^e jour (au lieu du 19^e jour dans la série exposée au Niclosamide).

DISCUSSION

Les résultats sur l'activité molluscicide des produits et les conséquences histopathologiques ont respectivement été présentés dans les chapitres troisième et quatrième.

Un exposé synthétique des résultats est fourni dans le premier paragraphe de ces commentaires. Il sera suivi d'une discussion générale afin de comparer les données que nous avons recueillies avec celles de la littérature.

I. - RAPPELS DES RÉSULTATS.

L'exposition des limnées au Niclosamide ou au 3,5-dichloro-BNT se traduit par un accroissement de la mortalité globale au cours de l'expérience. Il en résulte une augmentation faible des pCL_{50} avec des valeurs plus élevées au 4^e jour pour le 3,5-dichloro-BNT que pour le Niclosamide.

Les survivants présentent des attitudes variées en présence de ces deux produits. L'émersion des limnées est plus importante que celle des témoins jusqu'à la 48^e heure; par la suite, elle diminue vers des valeurs plus faibles. Un processus inverse s'observe pour les individus immergés, avec une activité normale. Les individus rétractés sont peu nombreux.

L'influence de plusieurs facteurs (pris par deux) sur la toxicité de ces produits a été étudiée en utilisant des concentrations égales à leurs CL₅₀ respectives pour la 96^e heure d'exposition. La mortalité des limnées augmente dans le cas du 3,5-dichloro-BNT si la durée de l'acclimatation se prolonge; dans le cas du Niclosamide, on retrouve un processus identique jusqu'au 8^e jour et une mortalité plus réduite lorsque les limnées utilisées sont maintenues en élevage pendant 15 jours. Le nombre de morts s'accroît de manière significative lorsqu'on emploie du sable comme sédiment mais il est fortement réduit s'il s'agit de la marne.

La mortalité augmente également si la teneur en ions calcium dans l'eau est réduite ou si les mollusques sont placés dans une eau courante. L'absence de nourriture se traduit par un nombre de morts plus important dans le cas du 3,5-dichloro-BNT, plus faible dans le cas du Niclosamide.

Des observations histopathologiques ont été réalisées sur la glande digestive, la gonade et le rein de limnées soumises à des concentrations sublétales de Niclosamide ou de 3,5-dichloro-BNT. Les trois viscères montrent la succession d'une nécrose épithéliale, suivie d'une reconstitution et d'une deuxième vague de nécrose (uniquement dans le cas du rein). La succession des lésions est la même dans les deux séries, malgré quelques différences dans les fréquences.

II. - COMPARAISON PAR RAPPORT À LA BIBLIOGRAPHIE.

A. DONNÉES ÉCO-TOXICOLOGIQUES.

1. L'attitude de *L. glabra* en présence des toxiques.

Les limnées ont une tendance naturelle à fuir le milieu aqueux lorsque leurs conditions de vie deviennent défavorables (GERMAIN, 1931). Cependant, ce comportement varie selon l'espèce considérée. En effet, *Lymnaea peregra ovata*, caractérisée par son faible degré d'amphibiose, mène sa vie en bordure de l'eau si la zone est soumise à des embruns réguliers ou migre seulement si le milieu s'assèche. Par contre, *L. truncatula* se rencontre sur les zones émergées dans ses biotopes naturels. Quant à l'espèce que nous étudions, *L. glabra*, elle s'émerge lorsque son gîte s'assèche.

Espèce	Temps d'exposition (en heures)	Niclosamide	3,5-dichloro-BNT
<i>L. p. ovata</i>	24 h	6,6	6,27
	48 h	6,8	6,73
	72 h	6,9	7
	96 h	6,99	7,34
<i>L. glabra</i>	24 h	N.D.	N.D.
	48 h	6,12	6,01
	72 h	6,16	6,21
	96 h	6,18	6,28

Tableau XVII.

Tableau synoptique permettant la comparaison des pCL₅₀:

- chez *L. p. ovata* (d'après VIGNOLES, 1990),

- chez *L. glabra* d'après nos résultats,

lors de l'exposition aux deux produits.

Abréviation. N.D.: valeur non déterminée.

L'analyse de VIGNOLES (1990) ainsi que nos propres observations permettent de constater que dans les conditions du laboratoire, les limnées s'émergent lorsqu'elles sont soumises au toxique, quelle que soit l'espèce du mollusque. Ceci pourrait correspondre à une réaction de fuite déjà rapportée chez *L. truncatula* lorsqu'elle est en présence de ses prédateurs sur le terrain (RONDELAUD, 1978).

Nous n'avons pas constaté de variation significative dans l'attitude de la limnée lorsqu'elle est au contact de l'un des deux toxiques. En présence de Niclosamide, les mollusques fuient la zone polluée jusqu'à la 48^e heure. Au-delà, le nombre de limnées émergées diminue. Pour comprendre ce phénomène, plusieurs hypothèses peuvent être énoncées parmi lesquelles nous retiendrons l'interprétation suivante. Après la 48^e heure d'expérience, la limnée retournerait dans la zone polluée afin de subvenir à ses besoins en nourriture et, par suite, évoluerait au sein de la solution de Niclosamide qui a subi une baisse d'activité avec le temps (page 13).

Le 3,5-dichloro-BNT rapporte des résultats similaires à ceux obtenus avec le Niclosamide. Nous émettons donc la même hypothèse.

2. L'efficacité des deux substances.

Les observations requises sur *L. glabra* sont en accord avec celles que VIGNOLES (1990) a effectuées sur l'espèce *L. p. ovata*. Le tableau XVII montre que toutes les valeurs des pCL_{50} augmentent en fonction du temps. De plus, l'accroissement est plus rapide pour le 3,5-dichloro-BNT qui est un dérivé substitué en *méta* que pour le Niclosamide. La toxicité du premier est donc plus élevée que celle du second à la 96^e heure.

Une analyse plus précise des résultats montre que pour les deux produits, les valeurs des pCL_{50} sont moins élevées chez *L. glabra* que chez *L. p. ovata*. Ceci implique que la CL_{50} de la deuxième limnée est inférieure à celle de notre mollusque. La différence relevée entre les deux espèces peut s'expliquer de plusieurs façons:

- Le poids des masses molles est plus important chez *L. p. ovata*. Or, plus la surface de contact avec le toxique est grande, meilleure serait la diffusion dans les tissus.

- La Limnée voyageuse présente un faible degré d'amphibiose par rapport à *L. glabra*. Le fait d'être plus immergée augmenterait le temps de contact avec le toxique.

- Ces deux espèces auraient des caractéristiques métaboliques différentes, en particulier un équipement enzymatique susceptible de dégrader le toxique et de l'éliminer en dehors de l'organisme.

La vérification de l'une de ces hypothèses impose de procéder à des expériences complémentaires sur l'importance du temps de contact par rapport à la mortalité des limnées.

3. Facteur acclimatation.

L'efficacité du Niclosamide subit des variations lorsque le temps d'acclimatation passe de 24 heures à 8 jours. Après un délai de 15 jours, le nombre de morts est plus faible. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité des individus constituant une population déterminée. Certains mollusques seraient plus sensibles que d'autres au toxique tandis qu'un autre contingent serait plus résistant. Comme le Niclosamide agit, d'après nos résultats, aux premières heures de l'expérience, les limnées les plus sensibles seraient les premières victimes.

Quant à la série des 15 jours, la mortalité est plus faible. Ceci suggère que les limnées les plus sensibles seraient mortes au cours de la phase d'acclimatation. L'expérimentation réalisée avec cette série ne porterait que sur les plus résistantes.

4. Facteur dureté calcique.

L'analyse de la littérature révèle que ce facteur a déjà fait l'objet de plusieurs études comme le rapportent ANDREWS *et al.* (1987) dans leur revue.

Nos résultats montrent que les produits sont plus efficaces pour une concentration en ions calcium voisine de 20 mg.l⁻¹. Par contre, une eau eucalcique (à 60 mg.l⁻¹) élève la CL₅₀.

Ces données concordent avec les observations que plusieurs auteurs ont faites sur d'autres espèces animales avec le Niclosamide (revue d'ANDREWS *et al.*, 1987). MEYLING *et al.* (1962) constatent que le Bayluscide WP 70 est considérablement moins actif sur *Biomphalaria* en eau dure (408 mg.l⁻¹ de CaCO₃) qu'en eau peu calcaire (29 mg.l⁻¹ de CaCO₃) ou que dans l'eau du robinet (71 mg.l⁻¹ de CaCO₃). HARRISSON et RATTRAY (1966) rapportent qu'au contact du Niclosamide, les Poissons meurent en 5 à 10 minutes dans

une eau peu calcaire (29 mg.l⁻¹ de CaCO₃) alors que le décès survient en 2 à 6 heures dans une eau de forte dureté (100 mg.l⁻¹).

De plus, le calcium a un effet protecteur sur la toxicité des métaux lourds (MARTIN et COUGHTREY, 1975). REBIERE (1985) et VINCENT *et al.* (1986) notent lors de leurs études sur les gammars que les chlorures métalliques et la N-trityl-morpholine sont moins actifs en eau dure.

Les résultats de nos expériences concordent parfaitement avec les références des auteurs précités.

5. Impact du sable.

Le manque relatif de références bibliographiques sur ce point ne permet pas d'interpréter avec certitude les résultats suivants:

- En présence de sable, la mortalité des limnées est supérieure à celle obtenue lors de l'expérience type. La seule explication plausible serait d'admettre que l'introduction de sable siliceux dans un milieu eucalcique entraînerait une modification du pH, ce qui se traduirait par un accroissement de la mortalité car les produits sont plus actifs dans les eaux à faible concentration en ions calcium et, donc, à pH plus faible (ANDREWS *et al.*, 1987; VIGNOLES, 1990).

- Le nombre des décès est, de plus, supérieur dans le cas du Niclosamide par rapport à l'effectif relevé avec le 3,5-dichloro-BNT. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats. La plus valable d'entre elles serait de rapporter ce fait à une absorption accrue du BNT par le quartz, basée sur la présence du groupement thiazole qui formerait des liaisons de nature indéterminée avec les grains de silice.

6. Autres facteurs.

En l'absence de nourriture, la mortalité de *L. glabra* pour le Niclosamide est inférieure à celle relevée lors de l'expérience type. Ce résultat indique que la nourriture joue un rôle dans le métabolisme des produits. Trois explications peuvent être proposées. La salade pourrait, dans les deux premières, entraîner la formation de molécules nouvelles, pourvues d'une certaine activité molluscicide à partir des produits d'origine ou encore

Références	Mollusque (Agent agressif)	Lésion (Organe)	Description de la lésion
MARTIN, in SPARKS, 1972; SPARKS, 1985.	<i>Arion ater</i> ¹ (métaldéhyde)	Glande digestive	Nécrose complète de l'épithélium 8 h après l'ingestion du toxique. Vacuolisation des cellules à calcium à l'extrémité des tubules.
		Rein	Lyse de nombreux néphrocytes avec pycnose ou clarification des noyaux. Présence de cellules vides.
MOUKRIM, 1987; MOUKRIM <i>et</i> <i>al.</i> , 1988.	<i>Lymnaea</i> <i>peregra ovata</i> (trichlorfon)	Glande digestive	Nécrose épithéliale débutant par les cellules à calcium et s'étendant ensuite à tout l'épithélium. Reconstitution de l'assise avec hyperplasie.
		Gonade	Nécrose des cellules germinales touchant les cellules péri-folliculaires, puis les spermatocytes et les ovocytes. Reconstitution très variable.
		Rein	Lyse massive de nombreux néphrocytes avec présence de concrétions et de noyaux nus dans la lumière du rein. Reconstitution avec hyperplasie partielle.
SINDOU, 1989; SINDOU <i>et al.</i> , 1990a, b, 1991a, b, c.	5 espèces de limnées (<i>Fasciola</i> <i>hepatica</i>) ²	Glande digestive	Nécrose partielle de l'épithélium se généralisant par la suite. Reconstitution avec hyperplasie.
		Gonade	Nécrose des cellules germinales touchant ou non l'une des deux lignées ou devenant totale avec atrophie de la glande. Reconstitution variable.
		Rein	Présence de cycles successifs de nécrose- reconstitution au niveau des lamelles. La partie distale est souvent détruite.

¹. *Arion ater* est un mollusque terrestre. L'une de ses variétés est la Limace rouge.

². *Fasciola hepatica* est un parasite. Les formes larvaires de ce Trématode se développent à l'intérieur des mollusques.

Tableau XVIII.
Les lésions de trois viscères chez des mollusques
soumis à un agent agressif chimique ou parasitaire.

pourrait ralentir la dégradation des toxiques. La troisième explication serait d'admettre que la salade fixe les toxiques et que les mollusques, en se nourrissant, absorberaient davantage de produit. La vérification de ces hypothèses impose de procéder à un dosage des produits initiaux et de leurs dérivés.

Le facteur eau courante montre l'existence de différences significatives entre les deux produits. En présence de Niclosamide, on note une mortalité de 100 % des individus à la 48^e heure alors que le pourcentage n'est que de 50 % pour le même relevé avec le 3,5-dichloro-BNT. Si l'on considère d'abord le Niclosamide, on peut penser que le renouvellement de l'eau maintiendrait le produit en suspension et que ceci favoriserait le contact du toxique avec l'animal. Les résultats du 3,5-dichloro-BNT peuvent s'interpréter à l'aide de l'hypothèse que nous avons formulée pour le sable: les molécules du toxique formeraient des liaisons avec les cristaux du verre constituant les parois de l'aquarium. Cette explication s'appuie en grande partie sur la présence de petits flocons sur le fond et/ou les parois lorsque l'expérience est réalisée avec ce produit.

B. DONNÉES HISTOPATHOLOGIQUES.

Les lésions de la glande digestive ou de la gonade consistent en une nécrose de l'épithélium, suivie par la reconstitution du feuillet. Dans le rein, deux autres lésions, l'oedème et les dépôts intralamellaires peuvent être présentes en dehors de la nécrose. Afin de permettre une comparaison avec la littérature, nous avons rapporté dans le tableau XVIII les différents types de lésions que plusieurs auteurs ont décrit chez un mollusque terrestre comme *Arion ater* ou chez d'autres limnées en présence de différents toxiques ou du parasite *Fasciola hepatica*. Cette étude synoptique montre que les lésions de *L. glabra* en présence du Niclosamide ou du 3,5-dichloro-BNT sont identiques à celles que SPARKS (1972, 1985), MOUKRIM *et al.* (1988), SINDOU *et al.* (1990a, b, 1991a, b, c) ont rapportées chez d'autres espèces de mollusques. Lors d'une agression parasitaire ou d'une intoxication, le Pulmoné réagit par une nécrose de l'épithélium dans plusieurs viscères avant que ce dernier ne se reconstitue. L'intensité, la date d'apparition et la durée de ces stades lésionnels varient d'un organe à l'autre.

Malgré quelques légères différences, la nécrose se développe rapidement dans les trois organes de *L. glabra*, que l'intoxication soit due au Niclosamide ou au 3,5-dichloro-BNT.

Certains viscères montrent l'existence de cellules en lyse à partir de la 24^e heure post-exposition au toxique. Ce point concorde avec les observations de MARTIN, *in SPARKS* (1985) chez *Arion ater* au contact du métaldéhyde car la nécrose de la glande digestive ou du rein est importante 8 heures après l'ingestion (tableau XVIII). En revanche, cette donnée diffère par rapport à celle d'autres auteurs:

- MOUKRIM (1987), MOUKRIM *et al.* (1988) constatent chez *L. p. ovata* que le début des lésions est un peu plus tardif dans les organes correspondants de cette espèce lorsqu'elle est exposée au trichlorfon.

- MOUKRIM (1991), MOUKRIM et RONDELAUD (1993) montrent chez *L. truncatula* que la nécrose épithéliale débute plus tardivement (en général au 3^e jour à 20° C) et qu'elle se développe plus lentement à l'exception du rein où elle frappe d'emblée l'ensemble des lamelles. L'évolution de cette lésion est identique quel que soit le Trématode utilisé (*Fasciola sp.* ou *Paramphistomum daubneyi*).

Plusieurs hypothèses, peut-être complémentaires, peuvent être fournies pour expliquer cette différence. Nous les avons regroupées dans le tableau ci-dessous:

Hypothèse	Définition	Nos résultats	MOUKRIM, 1987	MOUKRIM, 1991
	La différence s'explique par:			
1	- le protocole utilisé. - l'appréciation de l'intensité pour la nécrose.	Sacrifices journaliers jusqu'au 4 ^e jour. 4 indices (+ à + + + +)	Sacrifices au 3 ^e et au 7 ^e jour. 2 catégories: * nécrose partielle, * nécrose généralisée.	
2	La différence s'explique par la nature de l'agent agressif et sa concentration éventuelle.	Niclosamide (0,21 mg.l ⁻¹). 3,5-dichloro-BNT (0,15 mg.l ⁻¹).	Trichlorfon (0,1 mg.l ⁻¹)	Parasites.
3	La différence serait due à l'espèce du mollusque.	<i>L. glabra</i>	<i>L. p. ovata</i>	<i>L. truncatula</i>

La première hypothèse ne peut expliquer, à elle seule, les différences que l'on relève entre les auteurs précités car MARTIN, *in SPARKS* (1985) observe la nécrose dans la glande digestive et le rein des limaces au bout de 8 heures après l'ingestion du métaldéhyde. Il en est de même pour la troisième car SINDOU (1989) constate la même évolution des lésions -

avec quelques variations dans leur fréquence- chez cinq espèces de limnées lorsqu'elles sont parasitées par *F. hepatica*. A notre avis, la deuxième hypothèse serait la plus valable en rapportant ces différences à la nature de l'agent agressif et/ou sa dose. Si l'on adopte ce raisonnement, il semble logique de distinguer deux types de toxiques:

- Les produits chimiques comme le Niclosamide, le 3,5-dichloro-BNT ou le trichlorfon seraient à l'origine d'une toxicité aiguë lorsqu'ils sont au contact des viscères du mollusque. Les variations dans le début et l'extension de la nécrose épithéliale proviendraient de la dose utilisée. Cette interprétation s'appuie sur la revue de SPARKS (1985) considérant la pathologie viscérale qui se développe chez les Invertébrés lorsqu'ils sont agressés par voie chimique.

- Les parasites comme *F. hepatica* seraient à l'origine d'une agression plus lente de type chronique. Les variations dans l'évolution des lésions pourraient provenir en partie du nombre de miracidiums constatés lors de l'exposition.

Nos résultats montrent aussi que la nécrose généralisée (indice + + + +) est assez rare dans les trois organes de *L. glabra* comme on peut le constater sur le tableau suivant:

Produit	Organe	Nombre de cas et date de sacrifice
Niclosamide	Gonade.	1 au 12 ^e jour.
	Rein.	2 au 4 ^e et au 12 ^e jour.
3,5-dichloro- BNT	Rein.	1 au 4 ^e jour.

Nos résultats montrent également que les indices d'intensité ont des valeurs inférieures chez les autres limnées alors que la reconstitution apparaît aux mêmes dates dans les deux séries.

Devant ces deux types de données, nous nous sommes demandé si la reconstitution pouvait se développer en un point d'un viscère avant que la nécrose de l'épithélium ne se généralise ? Les arguments obtenus au travers de cette expérimentation sont en faveur de cette hypothèse. Mais compte-tenu du manque d'observations sur ce fait, il est utile de

vérifier cette question en procédant à des expériences complémentaires, par exemple à l'aide d'une substance qui serait peu toxique pour les mollusques.

Lorsque les *L. glabra* sont placées dans une eau normale, sans toxique, on constate que l'évolution des lésions viscérales est similaire dans les deux séries. Ces résultats concordent avec ceux de MOUKRIM *et al.* (1988) pour la glande digestive et la gonade de *L. p. ovata*. Le développement de la pathologie viscérale serait donc indépendant de la nature du toxique lorsque les limnées intoxiquées sont remises dans l'eau de la station d'origine. Par contre, il y a une discordance dans le cas du rein avec une seule vague de nécrose jusqu'au 28^e jour chez *L. p. ovata*, et un cycle complet de nécrose-reconstitution, suivi d'une deuxième vague de nécrose chez *L. glabra*.

L'hypothèse la plus valable pour expliquer cette discordance serait de rapporter ce fait à la durée de l'exposition qui est plus longue pour MOUKRIM *et al.* (1988): 7 jours au lieu de 4 dans notre étude. Cet accroissement du temps de contact avec le toxique serait à l'origine d'un développement désynchronisé des lésions avec présence de néphrocytes en lyse (première vague) à côté de cellules en reconstitution ou d'éléments restaurés touchés par la seconde vague de nécrose. Pour vérifier cette hypothèse, il faut soumettre des *L. glabra* pendant des périodes de plus en plus longues à l'activité d'un molluscicide connu pour l'évolution de son comportement en solution aqueuse.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Des *L. glabra* ont été exposées au 3,5-dichloro BNT pour déterminer son activité molluscicide et analyser ses conséquences histopathologiques sur les mollusques survivants. Les résultats ont été comparés avec ceux fournis par un molluscicide connu, le Niclosamide.

Les résultats peuvent être regroupés sous deux rubriques.

1. L'activité molluscicide des deux produits.

L'exposition des limnées se traduit par un accroissement de la mortalité globale au cours de l'expérience. Il en résulte une augmentation faible des pCL_{50} avec des valeurs plus élevées au 4^e jour pour le 3,5-dichloro BNT que pour le Niclosamide.

Les survivants présentent des attitudes variées en présence de ces deux produits. L'émersion des limnées est plus importante que celle des témoins jusqu'à la 48^e heure. Un processus inverse s'observe pour les individus immergés, avec une activité normale.

L'influence de plusieurs facteurs pris isolément a été étudiée en utilisant des concentrations voisines de la CL_{50} . La mortalité augmente dans le cas du 3,5-dichloro BNT si la durée de l'acclimatation se prolonge; elle évolue de la même façon jusqu'au 8^e jour dans le cas du Niclosamide mais elle est plus réduite chez des limnées acclimatées pendant

15 jours. Le nombre de morts s'accroît lorsqu'on emploie du sable comme sédiment mais il est fortement réduit s'il s'agit de la marne.

La mortalité augmente également si la teneur en ions calcium dans l'eau est réduite ou si les mollusques sont placés dans une eau courante. L'absence de nourriture se traduit par un nombre de morts plus important dans le cas du 3,5-dichloro-BNT, plus faible dans le cas du Niclosamide.

2. Les lésions viscérales.

La glande digestive, la gonade et le rein de *L. glabra* montrent la succession d'une nécrose épithéliale et d'une reconstitution lorsque le mollusque est exposé à une concentration sublétales de Niclosamide ou de 3,5-dichloro-BNT. Une nouvelle vague de nécrose (dans le rein seulement) se développe ultérieurement sur les lamelles restaurées.

L'évolution des lésions est la même dans les deux séries, malgré quelques différences dans les fréquences.

Le développement de nos recherches a soulevé quelques problèmes. Le plus important d'entre eux concerne la dégradation du 3,5-dichloro-BNT dans le milieu naturel et le devenir des produits qui en dérivent. La résolution de ce point nécessite donc:

- de faire une étude de laboratoire à l'aide de la chimie analytique pour connaître la nature des dérivés,
- et de tester l'activité molluscicide de ces derniers.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDREWS, P., THYSSEN, J., LORKE, D., 1987.- The biology and toxicology of molluscicides, Balyuscide®. 61-116. *In: The toxicology of molluscicides.* par WEBBE, G. éd. Pergamon Press, Oxford.
- BARBOSA, F.S., COSTA, D.P., 1981.- A long term schistosomiasis control project with molluscicide in a rural area of Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **75**, 41-52.
- BARNISH, G., PRENTICE, M.A., 1981.- Lack of resistance of the snail *Biomphalaria glabrata* after nine years of exposure to Balyuscide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75**, 106-107.
- 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.*, **74**, 488-492.
- BORAY, J.C., 1969.- Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.*, **7**, 97-210.
- 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.
- CHANDLER, A.C., 1920.- Control of fluke diseases by destruction of the intermediate host. *J. Agric. Res.*, **20**, 196-197.
- CLÉDAT, 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, n° 23, 83 p.

- CLÉDAT, D., DEBORD, J., PÉNICAUT, B., 1989.- Basicité et lipophilie de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole. *Analisis*, **17**, 398-400.
- DAFFALLA, A.N., AMIN, M.A., 1976.- Laboratory and field evaluation of the molluscicidal properties of *habat-el-mollok* (*Croton* sp.). *East Afr. J. Med. Res.*, **3**, 185-195.
- DOSSAJI, S.F., KAIRU, M.J., GONDWE, A.T., OUMA, J.H., 1977.- On the evaluation of the molluscicidal properties of *Polygonum senegalense* forma *senegalense*. *Lloydia*, **40**, 290-293.
- EUZEBY, J., 1971.- Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine. Tome II. Fasc. 2. Livre 1. Vigot éd., Paris, 798 p.
- EUZEBY, J., 1984.- Les parasitoses humaines d'origine animale: caractères épidémiologiques. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 324 p.
- FARNSWORTH, N.R., HENDERSON, T.O., SOEJARTO, D.D., 1987.- Plants with potential molluscicidal activity. 131-203. In: Plant molluscicides, par MOTT, K.E. UNDP/World Bank/WHO, Genève.
- GABE, M., 1968.- Techniques histologiques. Masson et Cie éd., Paris, 1113 p.
- GAYRAL, P., CAVIER, R., 1977.- Actualités et perspectives d'avenir des molluscicides. 177-209. In: "Activités en chimie thérapeutique". 5^e série. Société de Chimie Thérapeutique éd., Paris.
- GERMAIN, L., 1931.- Mollusques terrestres et fluviatiles. Faune de France, n° 22. Lechevalier éd., Paris, 416 p.
- HARRISSON, A.D., RATTRAY, E.A., 1966.- Biological effects of mollusciciding natural waters. *S. Afr. J. Sci.*, **62**, 238-241.
- HUBENDICK, B., 1951.- Recent *Lymnaeidae*. Their variation, morphology, taxonomy, nomenclature, and distribution. *Kungl. Svenska Vetensk. Handl.*, **3**, 1-223.
- JELNES, J.E., 1977.- Letter: evidence of possible molluscicide resistance in schistosome intermediate hosts from Iran. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **71**, 451.
- KLOOS, H., McCULLOUGH, F.S., 1981.- Plant molluscicides: a review. Synthèse W.H.O., WHO/VBG/81.834, WHO/SCHISTO/81.59, 33 p.
- LACOUTURE, L., 1991.- Étude de la toxicité de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole sur *Euglena gracilis* Klebs. Thèse Doct. Pharmacie, Limoges, n° 382, 82 p.
- LAJUGIE, J.P., 1992.- Impact *in vitro* de l'utilisation de quelques dérivés molluscicides du benzamido-2 nitro-5 thiazole sur un Amphipode dulçaquicole, *Gammarus pulex* L. Thèse Doct. Pharmacie, Limoges, n° 317, 145 p.

- LEMMA, A., BRODY, G., NEWELL, J.W., PARKHURST, R.M., SKIMMER, W.A., 1972.- *Endod* (*Phytolacca dodecandra*) natural product molluscicide, increased potency with butanol extraction. *J. Parasitol.*, **58**, 104-107.
- LEMMA, A., GOLL, P., DUNCAN, J., MAZENGA, B., 1978.- Control of schistosomiasis with use of *endod* in Adwa, Ethiopia: research of a five-year study. 415-436. *In: Proceedings of the International Conference on Schistosomiasis*. S.O.P. Press éd., Le Caire.
- LEO, A., 1983.- The octanol-water partition coefficient of aromatic solutes: effect of electronic interactions, alkyl chains, hydrogen bonds and *ortho*-substitution. *J. Chem. Perkin Trans.*, **2**, 825-838.
- LEVEQUE, C., 1990.- Impact de la lutte antivectorielle sur l'environnement aquatique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **65**, Suppl. 1, 119-124.
- MACCARIO, J., 1978.- Sur le traitement statistique des courbes doses-réponses dans le cas des réponses "tout ou rien". Thèse Doct. ès. Sci. Pharm., Univ. Paris-Sud, n° 77, 119 p.
- MACCARIO, J., DIDRY, J.R., AUGET, J.L., 1980.- Méthode de comparaison des courbes doses-réponses dans le cas où les paramètres ne sont pas estimables. *Rev. Stat. Appl.*, **28**, 51-61.
- 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.
- MAGE, C., 1988.- Contribution à l'étude de la fasciolose à *Fasciola hepatica* L. chez les bovins allaitants dans le Limousin et la Cerdagne (France). Conséquences zootechniques et essais thérapeutiques. Thèse Doct. Univ. Limoges, Sci. Nat., n° 3, 142 p.
- MAGE, C., RONDELAUD, D., 1983.- Réflexions sur la prévention de la fasciolose en France. *Dossiers de l'élevage*, **5**, 25-28.
- MARTIN, M.H., COUGHTREY, P.J., 1975.- Comparison between the levels of Pb, Zn, and Cd with contaminated environment. *Chemosphere*, **5**, 15-20.
- MEYLING, A.H., SCHUTTE, C.H.J., PITCHFORD, R.J., 1962.- Some laboratory investigations on Bayer 73 and ICI 24223 as molluscicides. *Bull. Wild Hlth Org.*, **27**, 95-98.
- McCULLOUGH, F.S., GAYRAL, P., DUNCAN, J., CHRISTIE, J.D., 1981.- Les molluscicides dans la lutte contre la schistosomiase. *Bull. Org. Mond. Santé*, **59**, 17-26.

- MEDINA, F.R., RITCHIE, L.S., 1980.- Molluscicidal activity of the Puerto-Rican weed, *Solanum nodiflorum* Jacquin against snail hosts of *Fasciola hepatica*. *Econ. Bot.*, **34**, 368-375.
- MEDINA, F.R., WOODBURY, R., 1979.- Terrestrial plants molluscicidal to lymnaeid hosts of fascioliasis hepatica in Puerto-Rico. *J. Agr. Univ. Puerto-Rico*, **63**, 366-376.
- MOUKRIM, A., 1987.- Action de pesticides organophosphorés sur le mollusque *Lymnaea peregra* Müller. Etudes biochimiques, histologiques et histochimiques. Thèse Doct. Univ. Limoges, Sci. Nat., n° 25, 133 p.
- MOUKRIM, A., 1991.- Étude écologique et éthologique de *Lymnaea truncatula* Müller et de son parasite, *Fasciola hepatica* L. dans le système d'irrigation de Tassila, province d'Agadir. Charge parasitaire et conséquences histopathologiques. Thèse Doct. ès-Sci. (Maroc), Parasitol., Agadir, n° 2, 203 p.
- MOUKRIM, D., RONDELAUD, D., 1993.- Evolution of visceral lesions in *Lymnaea truncatula* in single and dual infections by three trematode species. *Res. Rev. Parasitol.* (sous presse).
- MOUKRIM, A., RONDELAUD, D., BARTHE, D., 1988.- Premières données sur les effets d'une concentration sub létale de trichlorfon chez le Mollusque *Lymnaea peregra ovata* Müller. A propos de quelques observations histopathologiques. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **113**, 381-387.
- PECHEUR, M., 1974.- Lutte stratégique contre la distomatose. *C.R. Rech., I.R.S.I.A.*, **38**, 85-150.
- REBIÈRE, H., 1985.- Toxicité comparée de l'action de quatre sels métalliques ($ZnCl_2$, $BaCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_3$) et d'un composé organique de synthèse, le Frescon, sur deux Mollusques Gastéropodes (*Lymnaea glabra*, *Potamopyrgus jenkinsi*) et sur deux Crustacés Amphipodes (*Gammarus pulex*, *Echinogammarus berilloni*) d'eau douce. Thèse Doct. Pharmacie, Limoges, n° 3, 194 p.
- RONDELAUD, D., 1978.- Le comportement des Limnées tronquées (*Lymnaea (Galba) truncatula* Müller) saines ou infestées par *Fasciola hepatica* L. en présence de leurs prédateurs. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **53**, 63-74.
- RONDELAUD, D., AMAT-FRUT, E., PESTRE-ALEXANDRE, M., 1982.- La distomatose humaine à *Fasciola hepatica* L. Etude épidémiologique de 121 cas survenus sur une période de 25 ans. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **75**, 291-300.
- RONDELAUD, D., MAGE, C., 1988.- Limnée tronquée et molluscicides. *Bull. G.T.V.*, **6**, 69-76.

- SCHOEB, H.A., HASSAN, A.A., EL-SAYEB, M.N., REFAHY, L., 1984.- The molluscicidal properties of *Agave decipiens* and *Agave americana* (var. *marginata*). *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, **14**, 265-273.
- SINDOU, P., 1989.- Contribution à l'étude de la pathologie viscérale chez plusieurs espèces de limnées infestées par *Fasciola hepatica* L. Thèse Doct. Univ. Limoges, Sci. Nat., n° 16, 167 p.
- SINDOU, D., RONDELAUD, D., BARTHE, D., 1990a.- Visceral pathology and size of the host snail. Comparative studies in *Lymnaea glabra* Müller infected by *Fasciola hepatica* L. *Parasitol. Res.*, **76**, 280-281.
- SINDOU, P., RONDELAUD, D., BARTHE, D., 1990b.- *Fasciola hepatica* L.: étude comparative de la pathologie viscérale chez six espèces de limnées soumises dès leur naissance à des infestations monomiracidienne individuelles. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **115**, 331-340.
- SINDOU, P., CABARET, J., RONDELAUD, D., 1991a.- Survival of snails and characteristics lesions of *Fasciola hepatica* infection in four European species of *Lymnaea*. *Vet. Parasitol.*, **40**, 47-58.
- SINDOU, P., RONDELAUD, D., BARTHE, D., 1991b.- La réaction amibocytaire circulante et le tissu producteur chez quatre espèces de limnées lors d'une infestation par *Fasciola hepatica* L. *Haliotis*, **21**, 167-174.
- SINDOU, P., RONDELAUD, D., BARTHE, D., 1991c.- Comparative studies on the lesions of the digestive gland and of the kidney in young and adult snails from four lymnaeid species infected by *Fasciola hepatica*. *Proc. Tenth. Int. Malacol. Congr. (Tübingen, 1989)* 255-258.
- SPARKS, A.K., 1972.- Chemical Injuries. 164-202. In: Invertebrate pathology: non communicable diseases. Academic Press, New York-Londres.
- SPARKS, A.K., 1985.- Synopsis of invertebrate pathology exclusive of insects. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam-Oxford-New York, 423 p.
- SZMIDT, V., 1992.- Essai de culture *in vitro* des neurones chez le mollusque *Lymnaea stagnalis* L. Thèse Doct. Pharmacie, Limoges, n° 338, 81 p.
- TCHOUNWOU, P.B., ENGLANDE, A.J. Jr, MALEK, E.A., 1991.- Toxicity evaluation of Bayluscide and malathion to three developmental stages of freshwater snails. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **21**, 351-358.
- TORREALBA, J.F., SCORZA, J.V., SANABRIA, M.S., VASQUEZ, A.D., RAMOS, B.I., RICCARDI, B., JORDAN, L.S., 1953.- Nota preliminar sobre la accion malaquisita del fruto de paraparo (*Sapindus saponaria*). *Gac. Med.*, **61**, 299-307.

- 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 quantitative. Thèse Doct. Univ. Limoges, Sci. Nat., n° 46, 131 p.
- VINCENT, M., DEBORD, J., PENICAUT, B., 1986.- Action comparée de la toxicité de chlorures métalliques et d'un molluscicide organique de synthèse, la N-trityl-morpholine, sur deux Amphipodes dulçaquicoles, *Gammarus pulex* et *Echinogammarus berilloni*. *Ann. Rech. Vet.*, **17**, 441-446.
- WAGNER, V.A., 1933.- The possibility of eradicating bilharzia by extensive planting of the tree *Balanites*. *S. Afr. Med. J.*, **10**, 10-11.
- WARREN, K.S., PETERS, P.A., 1969.- Cercariae of *Schistosoma mansoni* and plants, attempt to penetrate *Phaseolus vulgaris* and *Hedychium coronarium*. *Nature*, **217**, 647-648.
- WEBBE, G., 1987.- The toxicology of molluscicides. Pergamon Press, Oxford, 167 p.
- XIMENES, T., 1991.- Le contrôle biologique de *Lymnaea truncatula* Müller, hôte intermédiaire de *Fasciola hepatica* L. Possibilités et perspectives. Thèse Doct. Vétérinaire, Fac. Méd. Créteil, E.N.V. Maisons-Alfort, n° 122, 103 p.

ANNEXE

DONNÉES BRUTES SUR LA MORTALITÉ DE *L. glabra* EN PRÉSENCE DES DEUX TOXIQUES PRIS ISOLÉMENT.

Le tableau I A montre les valeurs brutes utilisées pour le calcul de la CL_{50} .

Les tableaux II A à VI A rapportent les résultats de l'analyse statistique sur le nombre quotidien de morts, non cumulés.

Niclosamide					3,5-dichloro-BNT				
Conc. en mg.l ⁻¹	1 ^{er} jour	2 ^e jour	3 ^e jour	4 ^e jour	Conc. en mg.l ⁻¹	1 ^{er} jour	2 ^e jour	3 ^e jour	4 ^e jour
0,01	0	0	0	0	0,1	0	3	5	10
0,1	0	0	0	0	0,12	0	8	24	28
0,12	1	7	12	16	0,13	26	54	66	68
0,15	0	0	0	0	0,15	0	4	10	44
0,18	12	14	18	20	0,16	32	54	62	64
0,20	4	8	10	22	0,19	32	54	64	68
0,21	38	38	38	44	0,20	0	6	28	42
0,24	0	32	61	62	0,21	12	24	34	34
0,25	14	62	68	68	0,24	9	27	54	62
0,27	34	38	38	42	0,25	2	26	60	62
0,48	31	73	80	80	0,48	9	32	69	71
0,96	44	67	80	80	0,96	8	54	79	89
1	36	38	38	80	1	2	80	80	80

Tableau I A.
Valeurs brutes utilisées pour la détermination de la CL₅₀
(avec 80 mollusques pour chaque concentration).

Catégories	Durée d'acclimatation 2/6 ddl		Durée de l'expérience 3/6 ddl	
	F	sgf	F	sgf
Témoins	2,33	N.S.	3	N.S.
Niclosamide	0,88	N.S.	10,67	< 1 %
3,5-dichloro BNT	2,04	N.S.	0,71	N.S.
Catégories	Durée d'acclimatation 2/4 ddl		Nature du toxique 2/4 ddl	
	F	sgf	F	sgf
1 ^{er} jour	0,57	N.S.	8,91	N.S.
2 ^e jour	1,29	N.S.	0,87	N.S.
3 ^e jour	0,64	N.S.	1,19	N.S.
4 ^e jour	10	N.S.	12	< 2,5 %

Tableau II A.

Résultats de l'analyse de variance (à deux facteurs) sur la durée d'acclimatation d'une part, et sur la durée de l'expérience ou la nature du toxique d'autre part..

Abréviations. ddl: degrés de liberté. N.S. non significatif. sgf: significativité.

Nombre de morts par 24 heures, non cumulés.

Catégories	Nature du sédiment 2/6 ddl		Durée de l'expérience 3/6 ddl	
	F	sgf	F	sgf
Témoins	1	N.S.	1	N.S.
Niclosamide	0,36	N.S.	11,4	< 1 %
3,5-dichloro BNT	30,87	< 0,1 %	0,96	N.S.
Catégories	Nature du sédiment 2/4 ddl		Nature du toxique 2/4 ddl	
	F	sgf	F	sgf
1 ^{er} jour	0,54	N.S.	8,36	< 2,5 %
2 ^e jour	2,6	N.S.	1,58	N.S.
3 ^e jour	0,03	N.S.	13,45	< 1 %
4 ^e jour	1,73	N.S.	4	N.S.

Tableau III A.

Résultats de l'analyse de variance (à deux facteurs) sur la nature du sédiment d'une part, et sur la durée de l'expérience ou la nature du toxique d'autre part.

Abréviations. ddl: degrés de liberté. N.S.: non significatif. sgf: significativité.

Nombre de morts par 24 heures, non cumulés.

Catégories	Teneur en ions Ca ⁺⁺ 1/3 ddl		Durée de l'expérience 3/3 ddl	
	F	sgf	F	sgf
Témoins	2,45	N.S.	1	N.S.
Niclosamide	2,93	N.S.	59,22	< 1 %
3,5-dichloro BNT	2,27	N.S.	0,85	N.S.
Catégories	Teneur en ions Ca ⁺⁺ 1/2 ddl		Nature du toxique 2/2 ddl	
	F	sgf	F	sgf
1 ^{er} jour	5,22	N.S.	28,92	< 5 %
2 ^e jour	1,12	N.S.	1	N.S.
3 ^e jour	3,57	N.S.	1,86	N.S.
4 ^e jour	0,14	N.S.	0,43	N.S.

Tableau IV A.

Résultats de l'analyse de variance (à deux facteurs) sur la teneur en ions ca⁺⁺ d'une part, et sur la durée de l'expérience ou la nature du toxique d'autre part.

Abréviations. ddl: degrés de liberté. N.S. non significatif. sgf: significativité.

Nombre de morts par 24 heures, non cumulés.

Catégories	Nourriture 1/3 ddl		Durée de l'expérience 3/3 ddl	
	F	sgf	F	sgf
Témoins	0	N.S.	0	N.S.
Niclosamide	0,97	N.S.	8,3	N.S.
3,5-dichloro BNT	9	N.S.	0,57	N.S.
Catégories	Nourriture 1/2 ddl		Nature du toxique 2/2 ddl	
	F	sgf	F	sgf
1 ^{er} jour	0	N.S.	2,33	N.S.
2 ^e jour	1,27	N.S.	1	N.S.
3 ^e jour	0,31	N.S.	1,62	N.S.
4 ^e jour	1	N.S.	2,78	N.S.

Tableau V A.

Résultats de l'analyse de variance (à deux facteurs) sur la nourriture d'une part, et sur la durée de l'expérience ou la nature du toxique d'autre part.

Abréviations. ddl: degrés de liberté. N.S.: non significatif. sgf: significativité.

Nombre de morts par 24 heures, non cumulés.

Catégories	Eau courante 1/3 ddl		Durée de l'expérience 3/3 ddl	
	F	sgf	F	sgf
Témoins	1	N.S.	1	N.S.
Niclosamide	0,18	N.S.	0,58	N.S.
3,5-dichloro BNT	2,89	N.S.	1	N.S.
Catégories	Eau courante 1/2 ddl		Nature du toxique 2/2 ddl	
	F	sgf	F	sgf
1 ^{er} jour	0,43	N.S.	0,62	N.S.
2 ^e jour	2,58	N.S.	1	N.S.
3 ^e jour	0	N.S.	0	N.S.
4 ^e jour	0	N.S.	0	N.S.

Tableau VI A.

Résultats de l'analyse de variance (à deux facteurs) sur l'eau courante d'une part, et sur la durée de l'expérience ou la nature du toxique d'autre part.

Abréviations. ddl: degrés de liberté. N.S.: non significatif. sgf: significativité.

Nombre de morts par 24 heures, non cumulés.

Titre: ÉTUDE COMPARATIVE DU NICLOSAMIDE ET DU 3,5-DICHLORO-2-BENZAMIDO-5-NITROTHIAZOLE. ACTIVITÉ MOLLUSCICIDE ET CONSÉQUENCES HISTOPATHOLOGIQUES. Par C. FRUGNAC.

Des *L. glabra* ont été exposées au 3,5-dichloro BNT pour déterminer son activité molluscicide et analyser ses conséquences histopathologiques sur les mollusques survivants. Les résultats ont été comparés avec ceux fournis par un molluscicide connu, le Niclosamide.

L'exposition des limnées se traduit par un accroissement de la mortalité globale au cours de l'expérience. Il en résulte une augmentation faible des pCL₅₀ avec des valeurs plus élevées au 4^e jour pour le 3,5-dichloro BNT que pour le Niclosamide.

Les survivants présentent des attitudes variées en présence de ces deux produits. L'émersion des limnées est plus importante que celle des témoins jusqu'à la 48^e heure. Un processus inverse s'observe pour les individus immergés, avec une activité normale.

L'influence de plusieurs facteurs pris isolément a été étudiée en utilisant des concentrations voisines de la CL₅₀. La mortalité augmente dans le cas du 3,5-dichloro BNT si la durée de l'acclimatation se prolonge; elle évolue de la même façon jusqu'au 8^e jour dans le cas du Niclosamide mais elle est plus réduite chez des limnées acclimatées pendant 15 jours. Le nombre de morts s'accroît lorsqu'on emploie du sable comme sédiment mais il est fortement réduit s'il s'agit de la marne.

La mortalité augmente également si la teneur en ions calcium dans l'eau est réduite ou si les mollusques sont placés dans une eau courante. L'absence de nourriture se traduit par un nombre de morts plus important dans le cas du 3,5-dichloro-BNT, plus faible dans le cas du Niclosamide.

La glande digestive, la gonade et le rein de *L. glabra* montrent la succession d'une nécrose épithéliale et d'une reconstitution lorsque le mollusque est exposé à une concentration subléthale de Niclosamide ou de 3,5-dichloro-BNT. Une nouvelle vague de nécrose (dans le rein seulement) se développe ultérieurement sur les lamelles restaurées. L'évolution des lésions est la même dans les deux séries, malgré quelques différences dans les fréquences.

MOTS-CLÉS: 2-benzamido-5-nitrothiazole. Éco-toxicologie. Histopathologie. *Lymnaea glabra*. Mollusque. Niclosamide.