



UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1994

Thèse n° 337

# THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 6 Juillet 1994

par

**Christine TARDIEU épouse FRANQUES**

née le 28 Septembre 1969 à MILLAU (12)

**Effet de l'action prolongée du 2-benzamido-5-nitrothiazole sur  
la croissance d'*Euglena gracilis* Klebs**

## EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Monsieur NICOLAS, Professeur . . . . . Président  
Monsieur BOTINEAU, Maître de Conférences . . . . . Juge  
Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences . . . . . Juge  
Monsieur LACHATRE, Maître de Conférences . . . . . Juge  
Monsieur RONDELAUD, Maître de Conférences . . . . . Juge

# UNIVERSITE DE LIMOGES

-----

## FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur **RABY**

- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1<sup>er</sup> Assesseur)

Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences (2<sup>e</sup> Assesseur)

**Personnel enseignant :**

**\* PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

<b>BENEYTOUT</b> Jean-Louis	Biochimie
<b>BERNARD</b> Michel	Physique-Biophysique
<b>BOSGIRAUD</b> Claudine	Microbiologie
<b>BROSSARD</b> Claude	Pharmacotechnie
<b>BUXERAUD</b> Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
<b>CHULIA</b> Albert	Pharmacognosie
<b>CHULIA</b> Dominique	Pharmacotechnie
<b>DELAGE</b> Christiane	Chimie Générale et Minérale
<b>GHESTEM</b> Axel	Botanique et Cryptogamie
<b>GUICHARD</b> Claude	Toxicologie
<b>HABRIOUX</b> Gérard	Biochimie
<b>LEFORT DES YLOUSES</b> Daniel	Pharmacie Galénique
<b>NICOLAS</b> Jean-Albert	Microbiologie, Parasitologie
<b>LOUDART</b> Nicole	Pharmacodynamie
<b>PENICAUT</b> Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
<b>RABY</b> Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique

**SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE, 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.*

*Veillez accepter l'expression de notre respectueuse reconnaissance.*

*A notre Directeur de Thèse*

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

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

*Nous avons été sensible à votre aide et à vos conseils tout  
au long de ce travail.*

*Veillez trouver ici l'expression de notre profonde  
gratitude.*

*A nos Juges*

Monsieur le Docteur M. BOTINEAU  
Maître de Conférences,  
Service de Botanique,

Monsieur le Docteur G. LACHATRE,  
Maître de Conférences,  
Service de Toxicologie,

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

*Nous vous sommes très reconnaissante pour votre participation à ce Jury de thèse.*

*Nous vous remercions pour l'intérêt que vous avez témoigné et les critiques que vous avez faites lors de la lecture du prédocument.*

*Nous adressons tous nos remerciements:*

- à M. le Dr. P. VIGNOLES,

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Limoges, pour sa disponibilité et son aide maintes fois répétées.

- à Mme R. MOUZET,

pour sa gentillesse et son dévouement.

- à M. M. TRIHI,

pour son accueil chaleureux et son aide amicale.

A Christophe,

A mes parents,

A Sandrine et Eric,

avec toute ma tendresse.

## INTRODUCTION

Les molluscicides représentent actuellement un axe de recherches dans la lutte contre les parasitoses dont les hôtes intermédiaires sont des mollusques.

Ces maladies ont des répercussions mondiales sur le plan de la santé humaine : d'après l'O.M.S., 40 % des maladies tropicales sont des bilharzioses. Elles interviennent aussi sur le plan économique au niveau des animaux d'élevages : de nombreux ovins et bovins sont atteints en zone tempérée comme en zone tropicale.

A l'heure actuelle, seules deux molécules sont commercialisées : le Niclosamide (Bayluscide<sup>®</sup>) et la N-trityl-morpholine (Frescon<sup>®</sup>). Mais cette dernière a été rapidement écartée en raison de sa rémanence importante et de sa trop forte toxicité pour la faune et la flore qui vivent dans les habitats des mollusques.

A l'heure actuelle, il n'y a pas de molluscicide qui soit capable de contrôler les populations du seul mollusque cible. Ces produits ont tous un impact sur les autres espèces animales ou végétales non visées appartenant au même biotope (Crustacés, Poissons, Mammifères, Algues et Végétaux supérieurs). De plus, JELNES (1977) rapporte une résistance notable au Niclosamide chez *Bulinus truncatus*. Par conséquent, il est important de rechercher des composés plus sélectifs pour leur cible et moins toxiques pour l'environnement. C'est dans ce but que des études ont été



réalisées avec les dérivés du 2-benzamido-5-nitrothiazole (CAVIER *et al.*, 1978 ; MADULO-LEBLOND *et al.*, 1981 ; VIGNOLES, 1990).

Le but de notre étude est d'évaluer l'influence du 2-benzamido-5-nitrothiazole sur la croissance d'*Euglena gracilis* lorsque le toxique est appliqué à doses sublétales pendant plusieurs semaines. Cette étude doit permettre de déterminer s'il existe ou non une modification de croissance sous l'effet du produit.

Nous avons adopté le plan suivant :

- le chapitre premier est consacré à des rappels sur les molluscicides et leurs méthodes d'étude ;
- le chapitre deuxième porte sur le matériel biologique que nous avons étudié : *Euglena gracilis* Klebs ;
- le chapitre troisième présente le protocole expérimental et la méthodologie ;
- le chapitre quatrième regroupe les résultats ;
- le chapitre cinquième rassemble l'interprétation de ces données et leur comparaison à celles parues dans la littérature.

## **LES MOLLUSCICIDES ET LES MÉTHODES D'ÉTUDE**

Les rappels présentés dans ce paragraphe portent sur des données générales que nous avons relevées dans plusieurs thèses et publications. Nous examinerons successivement, le champ d'action des molluscicides, leur sélection, leurs caractéristiques et leur impact sur l'environnement.

### **I. POURQUOI LES MOLLUSCICIDES SONT-ILS UTILISÉS DANS LA LUTTE CONTRE LES PARASITOSES ?**

Les mollusques interviennent comme hôte intermédiaire dans le cycle évolutif de parasites dont l'homme et les animaux domestiques sont les hôtes définitifs. C'est pourquoi il faut contrôler ces Invertébrés.

Les données présentées dans ce paragraphe proviennent des notes de GAYRAL et CAVIER (1977).

## A. PARASIToses CONCERNÉES

Les distomatoses hépato-biliaires sont provoquées par plusieurs Trématodes et leurs conséquences économiques sont très lourdes sur le cheptel. Dans les pays de l'Europe de l'Ouest, l'affection la plus fréquente est la distomatose à *Fasciola hepatica* (ou fasciolose). MAGE (1988) signale que 50 à 70 % des ovins et des bovins sont touchés dans les départements du Centre sur le territoire français. Le mollusque concerné dans ce cas est la Limnée tronquée (*Lymnaea truncatula* Müller).

Les bilharzioses (ou schistosomoses) atteignent 200 à 300 millions de personnes. D'après l'O.M.S. il s'agit de la seconde maladie parasitaire dans le monde mais elle est en voie de passer au premier rang car elle risque de supplanter le paludisme.

Quatre espèces de schistosomes peuvent parasiter l'Homme :

- *Schistosoma haematobium* Bilharz est responsable de la bilharziose vésicale. Ce parasite se développe chez des mollusques du genre *Bulinus* qui vivent en Afrique et au Moyen-Orient.
- *S. mansoni* Sambon provoque la bilharziose intestinale. Le mollusque concerné est une planorbe. Le genre *Biomphalaria* vit aux Antilles, en Amérique du Sud et en Afrique intertropicale.
- *S. intercalatum* est à l'origine de la bilharziose rectale. Son hôte intermédiaire est un bulin du sous-genre *Pyrgophysa*.
- *S. japonicum* est responsable de la bilharziose artério-veineuse. Elle peut s'observer chez l'Homme et les animaux domestiques. Les mollusques sont des *Oncomelania* et vivent en Extrême-Orient.

La présence et la pullulation des mollusques dépendent a) des caractères physico-chimiques de l'eau où ils se trouvent, b) de la teneur en matières organiques, c) de la végétation aquatique qui fournit l'alimentation et sert de support aux pontes, et d) de la vitesse du courant, car les animaux préfèrent les eaux calmes.

Les conditions climatiques et l'activité humaine peuvent favoriser ou limiter la pullulation de ces animaux.

Les programmes d'industrialisation et de mise en valeur des terres par irrigation vont provoquer l'expansion des bilharzioses par création de gîtes pour les mollusques : canaux, drains, réservoirs, lacs de retenue.

## **B. LA LUTTE CONTRE CES PARASITOSES**

Le contrôle des parasitoses peut s'effectuer au niveau de l'homme ou du mollusque.

Au niveau de l'homme, la lutte va consister, d'une part à limiter la dissémination des fécès et la contamination humaine par l'éducation sanitaire, et d'autre part à stériliser les porteurs de parasites par une chimiothérapie antibilharzienne.

La destruction des mollusques a parfois suffi pour diminuer la prévalence dans des foyers de bilharziose. Elle est obtenue par l'épandage de molluscicides et par des mesures qui visent à modifier le milieu pour le rendre inhospitalier aux mollusques (drainage, alternance de remplissage et d'assèchement...).

La lutte molluscicide est actuellement un des maillons essentiels dans le contrôle des bilharzioses. Cependant la pollution du milieu et le déséquilibre de l'écosystème sont les facteurs à redouter (VIGNOLES et *al.*, 1990 a).

## **II. SÉLECTION DES MOLLUSCICIDES**

### **A. EXISTE-T-IL UN MOLLUSCICIDE IDÉAL ?**

Actuellement, tout molluscicide a des effets toxiques sur la faune ou la flore aquatique.

Les critères de sélection d'un molluscicide (GAYRAL et CAVIER, 1977 ; LEVEQUE, 1990) sont généralement les suivants :

- être actif à faible concentration sur tous les stades du mollusque et sur les différentes espèces d'hôtes intermédiaires de parasites de l'Homme et des animaux domestiques ;
- ne pas être toxique pour l'Homme ;
- ne pas avoir d'impact sur les Poissons à différentes étapes de leur cycle biologique, sur les végétaux et les Mammifères consommant l'eau traitée.

- ne pas provoquer à long terme, un déséquilibre des écosystèmes.
- ne pas donner des produits de dégradation toxiques s'accumulant dans les chaînes trophiques ;
- être stable dans l'eau, ne pas se dégrader à la lumière solaire, avoir une activité identique quel que soit le pH ;
- être d'un prix attractif et d'emploi aisé.

### **B. SÉLECTION DES PRODUITS**

La sélection primaire est destinée à retenir des molécules actives. Elle se fait sur des mollusques élevés en laboratoire ou récoltés dans la nature.

La sélection définitive se fait en déterminant l'activité des produits sur les mollusques aquatiques ou amphibiens.

Les essais permettent d'établir des courbes de toxicité temps / concentration et d'évaluer la dose létale à 50 % (qui tue 50 % des animaux).

En même temps, on étudiera la stabilité et le maintien du pouvoir molluscicide dans l'eau à différents pH, sous éclairage solaire, selon la température, selon les sels minéraux ou les matières organiques.

Enfin, on déterminera la toxicité sur l'environnement, notamment sur les plantes et les algues, les Invertébrés aquatiques comme les gammarès (VIGNOLES, 1990).

### **C. ESSAIS SUR LE TERRAIN**

Avant les essais sur grande échelle, il est indispensable d'étudier le composé retenu sur des petits biotopes reproduisant les écosystèmes à traiter.

Les essais préliminaires permettent de déterminer la concentration optimale de produit à utiliser, la durée de l'exposition et le mode d'application.

L'impact sur l'environnement peut être évalué par une surveillance chimique et biologique. Le contrôle chimique consiste à rechercher les résidus de pesticides dans l'eau, les sédiments. La surveillance biologique permet de suivre l'évolution temporelle des écosystèmes traités et de déterminer après une ou plusieurs années de traitement, l'incidence de la lutte contre les mollusques sur la maladie parasitaire. Il est cependant nécessaire de préciser que le molluscicide doit être utilisé afin de contrôler l'expansion des colonies de mollusques mais qu'il ne vise pas à éradiquer ce dernier car le milieu serait colonisé par une autre espèce de Pulmoné (RONDELAUD, 1988).

### III. CARACTÉRISTIQUES DES MOLLUSCICIDES

Nous nous sommes servi des travaux de GAYRAL et CAVIER (1977), de McCULLOUGH *et al.* (1981) et de VIGNOLES (1990).

#### A. PRINCIPAUX GROUPES DE MOLLUSCICIDES

A l'heure actuelle, deux produits molluscicides sont commercialisés (GRENAILLE, 1991).

- le Niclosamide est utilisé en pratique sous trois formes : a) en poudre mouillable à 60 % de principe actif (ou Mollutox<sup>®</sup>), b) en poudre mouillable à 70 % de principe actif (ou Bayluscide<sup>®</sup>) et c) en concentré émulsionnable à 25 % de principe actif (ou Clonitralide<sup>®</sup>).

- la N-tritylmorpholine ou Frescon<sup>®</sup> à 16,5 % de principe actif.

Cependant de nombreux programmes d'étude ont été effectués en utilisant diverses molécules. The International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics, section 125, répertorie les molluscicides les plus utilisés. Chaque chapitre décrit les propriétés physicochimiques, toxicologiques et pharmacologiques de toutes les molécules ainsi que leurs effets sur les principaux organismes vivants susceptibles d'être en contact avec ces substances.

Le tableau ci-dessous répertorie les principales propriétés et les mécanismes d'action de ces produits.

Produits	Propriétés et mécanisme d'action
Niclosamide	<ul style="list-style-type: none"> <li>- insoluble dans l'eau ;</li> <li>- transfère les protons à travers la membrane interne de la mitochondrie ce qui provoque l'inhibition de la synthèse d'ATP ;</li> <li>- très toxique pour les mollusques et leurs oeufs ;</li> <li>- la dose létale varie inversement avec la température. Il est donc préférable d'appliquer Mollutox® (ou Bayer 73) au printemps ou en été (EL-GINDY, 1975 a).</li> <li>- ténicide très actif.</li> </ul>
N-trityl-morpholine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- insoluble dans l'eau ;</li> <li>- stable aux différents facteurs de l'environnement : lumière solaire, végétation, boues ;</li> <li>- non actif en milieu acide car il s'hydrolyse en dérivés inactifs ;</li> <li>- effet rémanent de l'ordre de 3 semaines dans les milieux favorables ;</li> <li>- agit au niveau des membranes musculaires en stimulant l'entrée de calcium dans les cellules ce qui provoque des contractures musculaires irréversibles entraînant la mort par tétanie permanente ;</li> <li>- actif sur les mollusques jeunes et adultes mais pas sur les oeufs.</li> </ul>
Pentachlorophénate de sodium (NaPCP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- très soluble dans l'eau. Il se disperse bien dans le courant mais n'a aucune rémanence ;</li> <li>- inhibe la synthèse d'ATP : le mécanisme d'action est le même que celui du Niclosamide ;</li> <li>- agit sur les mollusques et leurs oeufs ;</li> <li>- utilisé aussi comme herbicide.</li> </ul>
Nicotinamilides	<ul style="list-style-type: none"> <li>- toxiques pour les mollusques adultes mais peu actifs sur les jeunes et les oeufs.</li> </ul>
Dérivés métalliques : Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , composés organiques de l'étain	<ul style="list-style-type: none"> <li>- poisons respiratoires actifs car ils inhibent les enzymes du cycle de Krebs ;</li> <li>- le sulfate de cuivre est l'un des sels utilisés. L'activité est rapide à fortes doses mais elle est réduite en présence de matières organiques, de boues et à pH élevé.</li> <li>- le diméthylthiocarbamate de zinc ou zirame est le seul sel de zinc utilisé. Il est actif sur les adultes et les oeufs.</li> <li>- les composés organiques de l'étain ont une activité molluscicide lente, puissante, rémanente et qui s'exerce sur tous les stades de développement. Ils sont stables et peu dégradés par l'environnement. Enfin ils ne sont pas actifs sur les <i>Oncomelania</i>.</li> </ul>
Dérivés du BNT	<ul style="list-style-type: none"> <li>- toxicité renforcée par la présence d'atomes d'halogènes sur le cycle benzénique ;</li> <li>- activité molluscicide plus marquée sur les sujets jeunes que sur les sujets adultes ;</li> </ul>
Dichloro-2,5 bromo-4 phénol (B-2 ou Phébröl)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- activité molluscicide mais à des doses très élevées : à la 24<sup>e</sup> heure d'exposition, la DL<sub>90</sub> est 60 fois supérieure à celle du niclosamide (JOUBERT et PRETORIUS, 1991).</li> </ul>

Outre leur action sur les mollusques, les molluscicides présentent également une certaine toxicité pour les formes larvaires libres des parasites. La plupart des composés sont cercaricides souvent à des concentrations inférieures à celles qui sont nécessaires pour tuer les mollusques. De plus, même à des doses sublétales, le Niclosamide diminue le pouvoir infestant des cercaires pour le Vertébré, ce qui réduit la charge parasitaire chez l'hôte définitif. Il peut aussi, comme d'autres molluscicides, ralentir le développement des stades larvaires chez le mollusque (BAYER, 1970).

Enfin, la sensibilité aux molluscicides diffère chez les mollusques selon qu'ils sont infestés ou non. Le sulfate de cuivre et le NaPCP sont plus toxiques chez les animaux parasités. Le Niclosamide est plus actif chez les mollusques avec une infestation mature que ceux parasités depuis 10 à 11 jours. Le parasitisme entraîne vraisemblablement des modifications dans le métabolisme du mollusque ce qui peut influencer sur la réponse aux molluscicides (GAYRAL et CAVIER, 1977).

#### **B. MOLLUSCIDES D'ORIGINE VÉGÉTALE**

Plusieurs végétaux ont la réputation d'avoir une activité molluscicide, les plus connus sont *Phytolacca dodecandra* (Phytolaccacées), *Ambrosia maritima* (Composacées), *Swartzia madagascariensis* (Papilionacées).

Si ces plantes sont cultivées dans des pays tropicaux où sévissent les bilharzioses, elles peuvent libérer un principe molluscicide et contribuer ainsi à une "auto-défense" des populations locales (GAYRAL et CAVIER, 1977 ; McCULLOUGH *et al.*, 1981).

Parmi les classes de composés chimiques examinés, les saponines sont les composés les plus prometteurs car ils possèdent un niveau d'activité qui est égal à celui des agents synthétiques et, de plus, ils sont présents en grande quantité dans les plantes.

TAURISSON (1991) rappelle les différentes techniques d'application du molluscicide d'origine végétale.

La technique la plus simple et la plus ancienne est celle préconisée par ARCHIBALD et WAGNER (1930, *in* TAURISSON, 1991) avec les palmiers du genre *Balanites*. Cette technique a ensuite été reprise pour *Phytolacca dodecandra* : il suffisait de planter des buissons de cette plante le long des canaux et des cours d'eau peuplés de mollusques et de provoquer simplement la chute des baies dans l'eau. Malheureusement, on avait compté sans les oiseaux qui se



précipitaient sur les baies, c'est pourquoi la plupart d'entre elles disparaissaient avant même d'avoir pu tomber dans l'eau.

Une autre méthode très simple consiste à mettre une plante fraîchement coupée, entière ou découpée en morceaux, dans le site d'endémie à traiter. Mais, en fait, très peu de plantes s'avèrent actives contre les mollusques de cette manière.

En réalité, on est amené la plupart du temps à extraire les constituants actifs de la plante. La préparation molluscicide se présente donc sous forme d'un liquide qui sera dispersé dans l'eau.

Le molluscicide d'origine végétale le mieux étudié est celui qui provient des baies d'endod, nom éthiopien de la plante grimpante *Phytolacca dodecandra*. Le composant molluscicide actif des baies d'endod est une saponine triterpénoïde, glucoside de l'acide oléanolique. Ce composant est rapidement biodégradé. Sa toxicité pour les mammifères et les plantes est faible mais il est ichtyotoxique (toxique pour les poissons) aux concentrations molluscicides. De plus, cette saponine n'a pas d'effet ovicide à des concentrations qui sont létales pour les mollusques adultes, ce qui exige de doubler la fréquence des applications.

#### IV. RÉSISTANCE AUX MOLLUSCICIDES

DUNCAN et BROWN (1988) citent dans leur article de nombreux essais qui ont été répertoriés dans la littérature parue sur la résistance aux molluscicides.

En effet, des études sur la résistance aux molluscicides ont été réalisées très tôt avec le mollusque *Oncomelania* sp. et le NaPCP. Des résultats divergents sont obtenus. NEWTON (1963) cite des auteurs qui ont détecté une résistance (OKABE *et al.*, 1956 ; OTA *et al.*, 1956) et d'autres qui n'ont rien décelé (WALTON *et al.*, 1958 ; GANCARZ, 1958 ; KOMIYA *et al.*, 1961). Ceci pourrait s'expliquer par des méthodes d'étude différentes ou encore par des facteurs saisonniers comme la température ou un changement physiologique des mollusques après l'hibernation.

D'autre part, JELNES (1977) soumet simultanément deux groupes de *Bulinus truncatus* à du Niclosamide. L'un d'entre eux avait été traité pendant 10 ans avec le produit. D'après l'auteur, ce lot aurait acquis une résistance vis-à-vis du molluscicide. BARNISH et PRENTICE (1981) suggèrent que ces résultats sont dus à une modification de la sensibilité de la souche d'origine après 10 ans de culture en laboratoire.

Les résultats des autres auteurs sont variables :

- BARNISH et PRENTICE (1981) ne constatent pas de résistance chez *Biomphalaria glabrata* après 9 ans d'exposition au Niclosamide.

- Des populations de *Bulinus truncatus* exposées sur le terrain à la N-trityl-morpholine (au Soudan), se montrent plus tolérantes à ce composé et l'absorbent plus lentement que les mollusques des zones non traitées (McCULLOUGH *et al.*, 1981).

- EL-GINDY (1975 a, b) montre l'absence de résistance au Mollutox<sup>®</sup> chez des *Biomphalaria alexandrina* qui avaient été traités par 5 applications successives de molluscicide. La mortalité de ces mollusques était plus importante que celle constatée chez les planorbes qui avaient été exposées pour la première fois à la même concentration. D'après l'auteur, cet accroissement de la mortalité serait proportionnel à la fréquence des applications et par suite à une augmentation des doses de molluscicide.

Il apparaît donc des contradictions en ce qui concerne la résistance vis-à-vis des molluscicides. En fait, du point de vue pratique, il n'existe pas de preuve concluante sur la possibilité qu'ont les mollusques hôtes d'acquérir une résistance significative aux molluscicides. Néanmoins, l'Organisation Mondiale de la Santé est en train de proposer des essais pour éprouver la résistance aux molluscicides sur le terrain (McCULLOUGH *et al.*, 1981).

## V. IMPACT DES MOLLUSCICIDES SUR L'ENVIRONNEMENT

L'étude de tout pesticide nécessite d'établir l'évaluation des risques pour l'environnement. Ainsi les observations faites sur le terrain sont complétées par les constatations établies par les essais de laboratoire.

Le but de ces essais est de déterminer l'activité d'une substance chimique sur une population homogène (réactif biologique) dans des conditions opératoires définies (température, milieu, pH, solvant, durée d'exposition, concentrations...).

Comme il est impossible d'examiner tous les éléments, les recherches sont généralement concentrées sur 2 ou 3 groupes d'organismes (LEVEQUE, 1990). Les plus fréquemment cités sont les Poissons, les Crustacés et les Algues.

## **A. IMPACT SUR LES POISSONS**

En raison de leur position en haut de la chaîne trophique, ils peuvent concentrer les résidus et être sensibles à la disparition de certaines catégories de proies.

La majorité des molluscicides sont responsables d'un effet ichtyotoxique plus ou moins important :

- le Niclosamide est toxique pour les poissons et les grenouilles aux concentrations molluscicides mais il reste le molluscicide de choix car la restauration du milieu est très rapide (BAYER, 1970).

- la N-trityl-morpholine et son produit de dégradation principal, le triphénylcarbinol, sont toxiques pour quelques espèces de Poissons mais cette mortalité peut être diminuée par une meilleure sélection de dosages et de modes d'application utilisés (BEYNON, 1971).

- le NaPCP et les composés organiques de l'étain sont assez toxiques pour les poissons (GAYRAL et CAVIER, 1977).

- les nicotinanilides semblent peu toxiques pour les poissons. Il n'y a pas de toxicité aiguë chez *Carassius oratus* et *Sarotherodon mossambicus* (McCULLOUGH *et al.*, 1981).

- le sulfate de cuivre et le zirame ont une ichtyotoxicité relativement modeste (GAYRAL et CAVIER, 1977).

- le Phébrol est très ichtyotoxique en particulier pour *Oreochromis mossambicus* (JOUBERT et PRETORIUS, 1991).

## **B. IMPACT SUR LES CRUSTACÉS**

De nombreuses études locales ont été réalisées avec un Crustacé qui vit dans les habitats d'un mollusque (*Lymnea peregra ovata*). Il s'agit de *Gammarus pulex pulex*. Cet Invertébré est souvent utilisé dans les tests de toxicité (VINCENT *et al.*, 1986 ; RENAUDIN, 1987 ; VIGNOLES, 1990).

### C. IMPACT SUR LES ALGUES D'EAU DOUCE

Les Algues jouent un rôle important dans l'environnement : elles libèrent par la photosynthèse de grandes quantités d'oxygène qui sont utilisées par les microorganismes hétérotrophes aérobies. De plus, ces algues représentent un maillon indispensable dans la chaîne alimentaire.

De nombreux essais de toxicité ont été réalisés avec les euglènes comme modèle de base :

- L'euglène est sensible aux herbicides comme le chloro-isopropyl-phényl-carbamate (CIPC). Ce produit ralentit la croissance des euglènes en inhibant la multiplication cellulaire. Cet effet augmente avec la dose de l'herbicide (ROUX, 1984).

- EDJALI et CALVAYRAC (1991) ont mené une étude pour évaluer les effets des ions métalliques ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ou  $Cu^{2+}$ ) sur l'intensité respiratoire d'*Euglena gracilis*. Après un traitement de 1, 2 ou 4 heures, les cellules montrent un accroissement de leurs échanges gazeux. A l'inverse, si on utilise simultanément le cyanure et l'arséniate, on constate une décroissance de l'activité respiratoire chez les euglènes.

- D'autres recherches ont porté sur l'action du cadmium sur *Euglena gracilis* (BONALY *et al.*, 1978 ; BONALY-CANTAREL, 1988) : ces ions inhibent la croissance des euglènes et ceci s'accompagne d'une perturbation du cycle cellulaire, d'une inhibition de la respiration et d'une augmentation de la photosynthèse. Cependant ces Algues peuvent acquérir une résistance vis-à-vis du métal car des cellules résistantes ont été identifiées en raison du manque de certains glycoconjugués. On n'a pas pu déterminer si l'acquisition de la résistance était le résultat de la sélection des cellules ne possédant pas ces glycoconjugués ou bien si elle provenait d'une modification de la structure de leur pellicule.

- Les euglènes sont cependant sensibles aux dérivés du BNT car on note une inhibition de leur croissance à partir de certaines concentrations de toxique. Les  $CI_{50}$  (concentration de produit réduisant de 50 % la croissance des Algues),  $CL_{50}$  et  $CA_{max}$  (concentration activatrice maximale) ont été calculées pour quelques uns de ces produits (DUFOUR, 1989 ; VIGNOLES, 1990 ; GRENAILLE, 1991 ; LACOUTURE, 1991). De plus, VIGNOLES (1990) montre qu'à partir de la 72<sup>e</sup> heure, la valeur de  $pCI_{50}$  (cologarithme de  $CI_{50}$ ) diminue dans le cas des dérivés du BNT. D'après cet auteur, cette décroissance pourrait s'expliquer par la mise en place d'un système enzymatique dans la reconnaissance et l'hydrolyse des molécules de toxique et ce système pourrait induire une résistance des euglènes vis-à-vis des dérivés du BNT.

C'est cette hypothèse qui est à l'origine des recherches que nous rapportons dans le présent mémoire. Nous nous proposons de vérifier ou d'infirmer cette hypothèse en procédant à des essais avec le BNT non substitué (à pH 3,5) et *Euglena gracilis* sur une période de 6 semaines.

## ***EUGLENA GRACILIS***

Le but de ce chapitre est de présenter les raisons du choix pour cette algue. La structure de cette dernière est, de plus, rappelée dans le dernier paragraphe.

### **I. RAISONS DU CHOIX**

Les algues sont des végétaux chlorophylliens susceptibles de vivre dans des conditions écologiques les plus diverses. La plupart d'entre elles se développent dans les océans ou les eaux douces, mais il en existe aussi sur le sol et l'écorce des arbres à condition qu'elles y trouvent une humidité suffisante.

Comme leur structure et leur morphologie sont variées, tous les types de reproduction et tous les cycles de développement sont possibles.

Les algues appartiennent en réalité à de nombreux embranchements très distincts les uns des autres parce qu'elles n'ont pas beaucoup de caractères communs.

Les Algues interviennent directement ou indirectement dans de nombreux secteurs liés à l'activité humaine (alimentaire, économique, océanographique), ou bien en rapport avec la pollution.

#### **A. LA PRODUCTIVITÉ DES OCÉANS**

Dans les océans, le phytoplancton et les algues macroscopiques sont des producteurs primaires de molécules organiques à partir de substances minérales.

L'importance du phytoplancton dans les chaînes alimentaires est illustrée par le fait que les meilleures zones de pêche sont celles où le phytoplancton est abondant.

L'importance du plancton et des grandes algues est d'un tout autre ordre. En effet, au cours de la photosynthèse, ils libèrent de l'oxygène qui fait retour à l'atmosphère et permet ainsi la respiration de tous les organismes.

#### **B. LES ALGUES ET LA POLLUTION**

##### **1. Les "explosions" de population**

Connues depuis longtemps, les marées rouges se manifestent encore périodiquement de nos jours au large de la Californie et de la Floride en tuant les Poissons, les Crustacés... L'eau devenue visqueuse abrite des milliards de Dinophycées qui se reproduisent à une cadence rapide, très probablement lorsque la teneur en cobalt dans l'eau de mer est à leur convenance car cet élément entre dans la constitution de la vitamine B<sub>12</sub> (GORENFLOT, 1975).

D'une manière générale, le phytoplancton réagit à un enrichissement de l'eau en substances azotées. Une partie des nitrates apportés au sol par les engrais se retrouve dans les rivières et les lacs. On assiste alors à une explosion des populations algales.

Les algues sont donc considérées comme des marqueurs de pollution.

## 2. L'auto-épuration du milieu marin

En matière de pollution, les Algues macroscopiques et surtout le phytoplancton sont des auxiliaires précieux dans la lutte contre les germes bactériens. La disparition rapide des bactéries (provenant des eaux d'égout) dans l'eau de mer est un phénomène bien connu : 99 % des bactéries des eaux usées meurent en 48 h de séjour dans l'eau de mer. Le milieu marin est donc capable d'une auto-épuration.

### II. PRÉSENTATION D'*EUGLENA GRACILIS*

La classe des Euglénophycées groupe des algues unicellulaires qui sont très communes dans les eaux douces et saumâtres. Ces végétaux constituent un matériel de choix pour les recherches sur la physiologie cellulaire (photosynthèse, métabolisme, besoins en vitamines, croissance, phototactisme, etc...).

La revue de la littérature ne nous a pas permis de trouver des études précises sur la morphologie et la structure d'*E. gracilis*, c'est la raison pour laquelle nous avons constitué ce paragraphe avec des textes généraux provenant d'ENCYCLOPAEDIA UNIVERSALIS (1988).

#### A. CLASSIFICATION D'*E. GRACILIS*

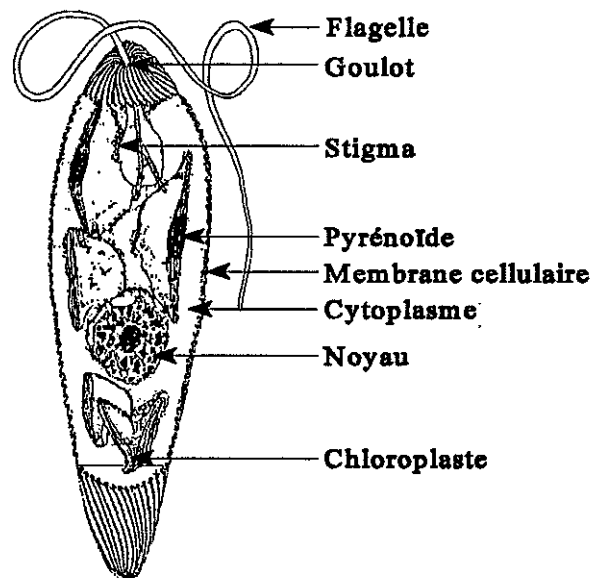
La classification systématique de cette algue est la suivante :

Phylum	: Chromophytes
Embranchement	: Pyrrophytes
Classe	: Euglenophycées
Famille	: <i>Euglenidae</i>
Genre	: <i>Euglena</i>
Espèce	: <i>gracilis</i> Klebs 1883
Variété	: Z



## **B. STRUCTURE D'UNE EUGLÈNE**

Comme le montre le schéma ci-dessous, l'euglène se présente comme une cellule fusiforme de 50 par 12  $\mu\text{m}$ . Elle est légèrement arrondie vers l'avant et se termine par une courte pointe vers l'arrière.



### **1. La pellicule ou paroi**

L'euglène est entourée d'une membrane (ou pellicule) parcourue de fines striations. Ces stries sont des bandelettes de nature protéique disposées en hélice. Elles sont orientées vers la région postérieure de la cellule.

Cette pellicule est déformable et permet à la cellule de se renfler dans sa partie moyenne et de prendre une forme de toupie. Ces déformations, en progressant lentement d'une extrémité de la cellule à l'autre, provoquent un mouvement de reptation caractéristique dénommé métabolie.

### **2. Le noyau**

Il est le plus souvent excentré vers la partie postérieure de la cellule. De forme arrondie ou allongée, il contient un ou plusieurs endosomes (nucléoles persistant pendant la division).

Les chromosomes restent à l'état condensé et sont donc différenciés pendant tout le cycle nucléaire. Cependant, le noyau ne se voit guère en microscopie photonique. On repère sa position à l'emplacement que les plastes laissent libre.

Pendant la division, la membrane nucléaire persiste et un faisceau de microtubules apparaît autour de l'endosome, à proximité des chromosomes.

### 3. La cinétide

La pellicule s'invagine à l'intérieur de la cellule au niveau de l'extrémité antérieure et délimite ainsi un réservoir qui communique avec l'extérieur par un étroit goulot. Une vacuole pulsatile jouxte le bord ventral du réservoir et vient y déverser rythmiquement son contenu.

Du fond du réservoir, partent deux flagelles de taille inégale. Le premier est court et grêle ; il n'a aucun rôle locomoteur. Seul le second émerge du goulot et intervient dans le déplacement de la cellule.

Un photorécepteur se situe au niveau du stigma. Ce système constitue l'appareil photosensible de l'euglène.

### 4. Les constituants cytoplasmiques

#### a. Les plastes

Les plastes contiennent les chlorophylles a et b, des caroténoïdes, ce qui permet une activité photosynthétique sous l'effet du rayonnement lumineux.

Le nombre, la forme et la taille des plastes varient chez les Euglènes. On en distingue trois types :

- le plus primitif est un plastidome unique avec un pyrénioïde central et des lames rayonnantes comme chez *E. viridis*.
- le deuxième type, le plus fréquent, comporte plusieurs plastes possédant chacun un pyrénioïde. *E. gracilis* possède une dizaine de chloroplastes.

- dans le troisième type, le plastidome est fragmenté en de nombreux plastes lenticulaires dépourvus de pyrénoloïde.

### ***b. Les annexes plastidiales***

Elles correspondent à des structures particulières telles que les pyrénoloïdes et le stigma :

- Le pyrénoloïde est une région différenciée du stroma. Son diamètre est compris entre 1 et 5 µm et sa structure est finement granuleuse. Autour de cet organite s'accumule le paramylon ce qui le rend facilement identifiable en microscopie photonique. Son rôle est encore énigmatique. Il semble jouer un rôle actif dans la synthèse de polysaccharides à poids moléculaire élevés au dépend de sucres plus simples qui résultent de la photosynthèse.
- Le stigma, généralement indépendant, pourrait correspondre à une différenciation locale de la membrane plasmique située souvent au niveau du flagelle. Il est généralement constitué par une ou plusieurs couches de globules de 100 µm de diamètre environ. Il est coloré en rouge par le β-carotène qu'il contient. Le stigma intervient vraisemblablement dans la réponse phototactique des cellules mobiles. Son rôle exact est cependant mal compris car le stigma n'est pas le photorécepteur.

### ***c. Autres constituants***

Il s'agit des organites suivants :

- le chondriome : il est formé d'un réticulum grêle, ramifié, dessinant des mailles irrégulières autour des chloroplastes, du noyau et du réservoir.
- l'appareil de Golgi : il est constitué de dictyosomes épais formés par l'empilement de nombreux saccules. Certains d'entre eux sont associés à la vacuole pulsatile.
- la vacuole pulsatile : elle intervient dans les échanges entre la cellule et le milieu extérieur puisqu'elle excrète les déchets et régule la pression osmotique.

## **C. BIOLOGIE ET ÉCOLOGIE**

### **1. Déplacements**

Les euglènes se déplacent selon une trajectoire hélicoïdale grâce aux mouvements du flagelle. De plus, des déformations de la paroi peuvent être observées ce qui permet aux cellules de s'étirer ou de se contracter. Ces déformations peuvent conduire à un déplacement de l'algue par reptation.

Lorsque les conditions deviennent défavorables (assèchement par exemple), les euglènes cessent tout mouvement, s'arrondissent et s'entourent d'une épaisse couche de mucilage formant une enveloppe kystique.

### **2. Reproduction asexuée**

Elle se fait par division longitudinale de la cellule précédée d'une duplication de la cinétide.

La division de la cellule est une mitose antéro-postérieure : elle débute au niveau du réservoir et progresse vers l'extrémité caudale de la cellule.

Chaque cellule fille ne possède que la moitié du nombre de bandes cuticulaires. Au cours de la croissance, de nouvelles bandes se formeront entre les anciennes.

### **3. Nutrition**

De nombreuses espèces d'euglènes sont pourvus d'un appareil photosynthétique comme les végétaux supérieurs.

Comme nous l'avons indiqué plus haut, les plastes des euglènes renferment de la chlorophylle a et b et des pigments caroténoïdes. Ces espèces sont capables d'une activité photosynthétique et donc peuvent être considérées comme des autotrophes. En réalité, elles sont hétérotrophes vis-à-vis des vitamines B<sub>1</sub> et B<sub>12</sub>. Il s'agit donc d'espèces photo-auxotrophes.

*E. gracilis* est considéré en plus comme un hétérotrophe facultatif : elle est donc capable de se développer à l'obscurité si le milieu contient des substances organiques. La cellule est alors dite étiolée car les plastes se transforment en proplastes par perte de la structure lamellaire et des

pigments. Cette involution est cependant réversible car ces proplastides régénèrent des lamelles et resynthétisent de la chlorophylle lorsque les euglènes sont replacées à la lumière.

Certaines espèces d'euglènes incolores sont dépourvues d'appareil plastidial : ce sont des hétérotrophes stricts qui ne se développent qu'en milieu riche en matières organiques.

#### 4. Remarque

La plupart des euglènes vivent en eau douce et peuvent supporter des écarts de pH importants (de 3,5 à 9 pour *E. gracilis*).

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Ce chapitre présente le protocole expérimental et la méthodologie que nous avons utilisés tout au long de nos essais.

### **I. MATÉRIEL BIOLOGIQUE**

#### **A. *ORIGINE ET ENTRETIEN DE LA SOUCHE***

La souche nous a été fournie par Madame le Prof. BONALY de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry (Hauts-de-Seine).

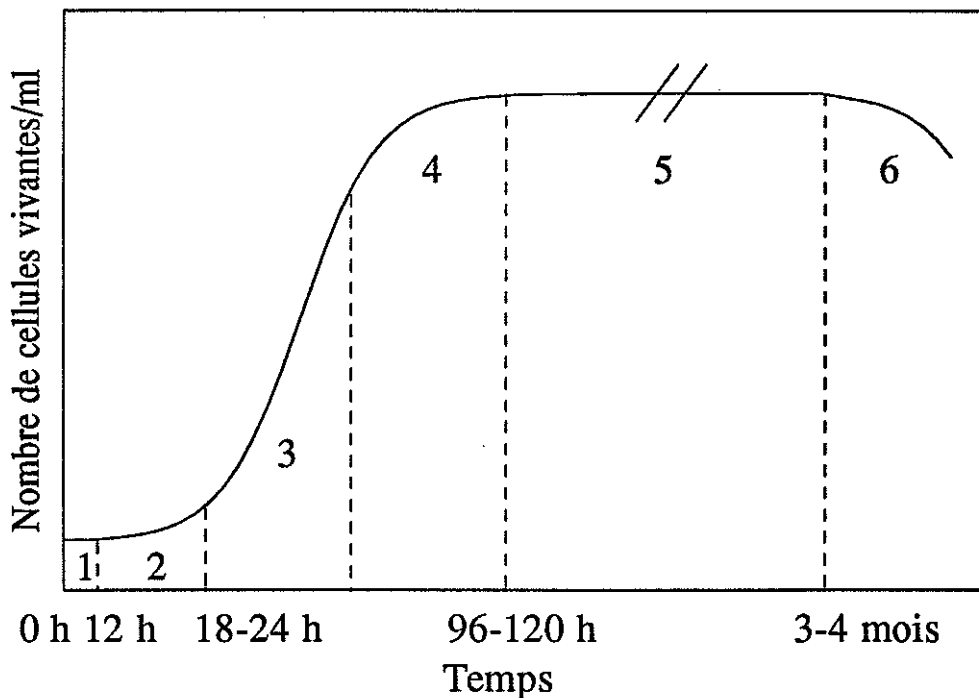
Les euglènes sont entretenues au laboratoire dans une enceinte climatique avec des conditions constantes : température de 25°C, éclairage de 12 heures diurnes. Elles sont cultivées dans un milieu nutritif approprié (milieu de Schiff : GREENBLATT et SCHIFF, 1959).

L'entretien de la souche s'effectue dans des flacons en plastique type boîte de Roux (80 cm<sup>2</sup>). Ce type de flacon permet à la lumière de passer au travers du milieu même avec une densité cellulaire importante ; de plus, les risques de contamination sont diminués. Le repiquage des euglènes s'effectue en prélevant 1 ml de la culture précédente et en l'ajoutant à 50 ml du milieu nutritif stérilisé par autoclavage. Toutes les opérations réalisées pour l'ensemencement sont accomplies sous une hotte à flux laminaire pour éviter toute contamination.

## B. CINÉTIQUE DE LA CROISSANCE

D'après MILLET (1984), on distingue six phases dans la croissance d'une culture d'euglènes lorsque la cinétique est représentée en coordonnées semi-logarithmiques (comme ci-dessous) :

- une phase de latence brève. Elle correspond au temps que met l'euglène pour s'adapter à son nouveau milieu.
- une phase de démarrage.
- une phase de croissance exponentielle. La multiplication cellulaire est optimale.
- une phase de ralentissement correspondant au début de l'appauvrissement du milieu.
- une phase stationnaire ou plateau. On note un arrêt de la croissance en raison de l'épuisement du milieu. Au cours de cette phase, les cellules se maintiennent grâce à l'utilisation de leurs réserves et en partie grâce à la photosynthèse.
- phase de décroissance. Toutes les réserves sont épuisées et les cellules commencent à mourir.



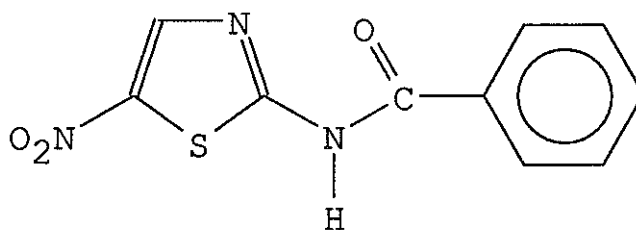
- |                                       |                                   |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 1 : Phase de latence                  | 4 : Phase de ralentissement       |
| 2 : Phase de démarrage                | 5 : Phase stationnaire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

## II. PRODUIT CHIMIQUE

Le 2-benzamido-5-nitrothiazole (BNT) possède des propriétés molluscicides et antiparasitaires. Il est possible d'exalter ces propriétés par substitution du cycle benzénique avec un ou plusieurs atomes de chlore ou de brome. On montre que les 3,4-dichloro-BNT et 3,5-dichloro-BNT ont un pouvoir molluscicide supérieur à celui du Niclosamide.(MADULO-LEBLOND *et al.*, 1981).

Le BNT se comporte en solution aqueuse comme une monobase faible (CLEDAT, 1989 ; DEBORD *et al.*, 1988).

Nous avons indiqué ci-dessous les principales caractéristiques de ce produit.



Masse molaire = 249,3 g.mol<sup>-1</sup>

Ka : constante d'acidité (pKa = - log Ka = 6,58)

λ1 : longueur d'onde du maximum d'absorption de la forme protonée (350 nm)

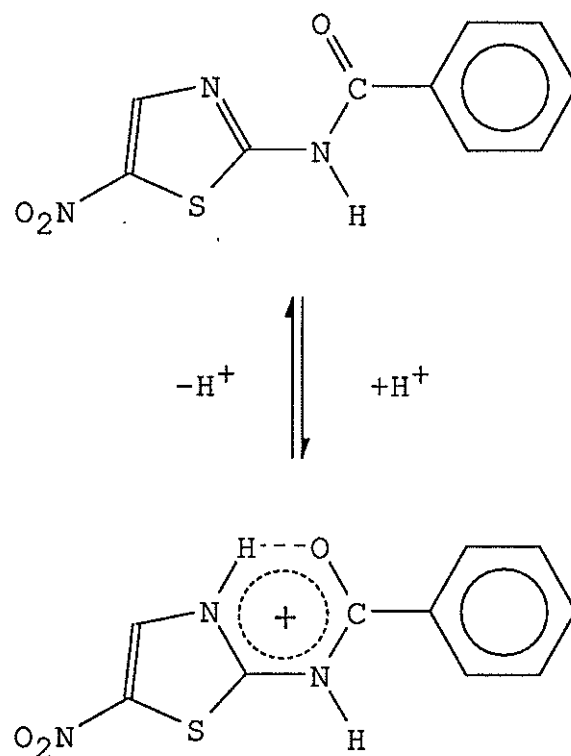
λ2 : longueur d'onde du maximum d'absorption de la forme neutre (422 nm)

ε1 : coefficient d'extinction molaire de la forme protonée en l.mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (log ε1 = 4,21)

ε2 : coefficient d'extinction molaire de la forme neutre en l.mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (log ε2 = 4,40)

La figure suivante illustre l'équilibre acido-basique pour les dérivés du BNT en solution aqueuse (GRENAILLE, 1991).





Lorsque la molécule est placée en milieu acide, un proton se fixe sur l'azote endocyclique du thiazole. Une liaison hydrogène se forme entre l'oxygène de la fonction amide et ce proton ce qui entraîne la formation d'un nouveau cycle. En pH neutre ou basique, la molécule se présente sous sa forme neutre.

Les composés étudiés sont relativement stables en solution aqueuse. La faible basicité des dérivés du BNT montre que dans les milieux aqueux naturels, ils existeront essentiellement sous forme de molécules neutres et seront donc facilement absorbés par les organismes aquatiques, ce qui pourrait expliquer en partie leur forte toxicité pour les mollusques.

Le mode d'action serait identique à celui du Niclosamide, c'est la raison pour laquelle nous avons présenté dans l'annexe 1 le mécanisme d'action de ce dernier produit.

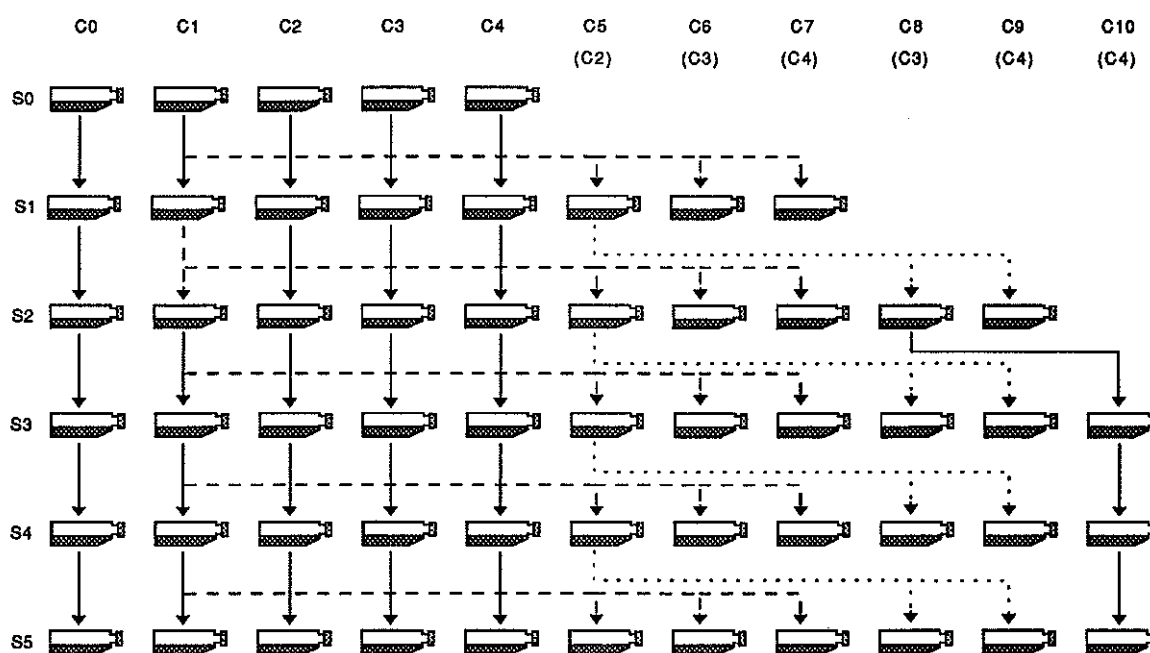
### III. PROTOCOLE D'ÉTUDE

Les euglènes sont régulièrement repiquées une fois par semaine dans 50 ml de milieu. En effet, il est préférable que les euglènes aient une croissance exponentielle (soit trois jours de

culture) pour avoir un bon renouvellement de la culture au cours des essais, avec un temps de latence réduit.

Chaque nouvelle culture est réalisée avec un inoculum permettant d'avoir  $50.10^3$  Euglènes/ml à partir de ces algues en croissance exponentielle. Ces cultures sont réalisées en 4 séries avec un repiquage hebdomadaire selon le schéma présenté ci-dessous.

#### Protocole des repiquages hebdomadaires



- la première série correspond à une gamme de cinq concentrations en BNT qui se distribuent entre 0 et  $43,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  (notées  $C_0$ ,  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  et  $C_4^1$ ). Le repiquage des euglènes de chaque flacon est effectué à la même concentration en BNT.
- dans la deuxième série, on prélève des euglènes qui ont été cultivées en présence de BNT à la dose  $C_1$  et on les ensemence dans du milieu de culture avec une concentration en toxique supérieure ( $C_2$ ,  $C_3$  et  $C_4$ ). Nous les avons dénommées  $C_5$ ,  $C_6$  et  $C_7$  respectivement afin de ne pas les confondre avec celles de la première série.

<sup>1</sup> Les valeurs de ces concentrations figurent sur la page 39

- dans la troisième série, on prend des euglènes cultivées en présence de BNT à la dose  $C_5$  et on les repique dans un milieu avec les doses  $C_3$  et  $C_4$ . Ces deux dernières ont été notées  $C_8$  et  $C_9$ .
- dans la quatrième série, on effectue un repiquage des algues cultivées à la dose  $C_8$  et on les ensemence dans un milieu à la dose  $C_4$ . Cette dernière est notée  $C_{10}$ .

#### IV. MÉTHODOLOGIE

##### A. PRÉPARATION DU MILIEU DE MAINTENANCE

On prépare 100 ml de milieu sans les vitamines. L'acide malique, l'acide glutamique, le  $(NH_4)_2HPO_4$  et le  $KH_2PO_4$  sont des poudres ; elles sont pesées puis dissoutes dans un erlenmeyer contenant 98 ml d'eau distillée tiédie. On ajoute à cette solution 2 ml de la fraction minérale préalablement préparée et conservée au réfrigérateur. Le milieu obtenu est concentré deux fois.

Afin d'obtenir une meilleure dissolution des poudres et une meilleure homogénéisation du milieu, le mélange est agité.

Le milieu est à pH 3,5 ce qui limite les développements bactériens.

Dans le milieu ainsi préparé (100 ml), on prélève 25 ml auxquels on ajoute 25 ml d'eau distillée. Le milieu final est concentré une fois et, après stérilisation à l'autoclave, permet l'entretien de la souche d'euglène.

Les vitamines sont ajoutées au milieu directement dans le flacon de repiquage.

La composition du milieu de culture est précisée dans l'annexe 2.

##### B. PRÉPARATION DU MILIEU TÉMOIN ET DU MILIEU TOXIQUE

###### 1. Milieu témoin

Il contient 25 ml de milieu concentré deux fois, X ml de PEG 400 sans toxique et on complète avec de l'eau distillée afin d'avoir 50 ml.

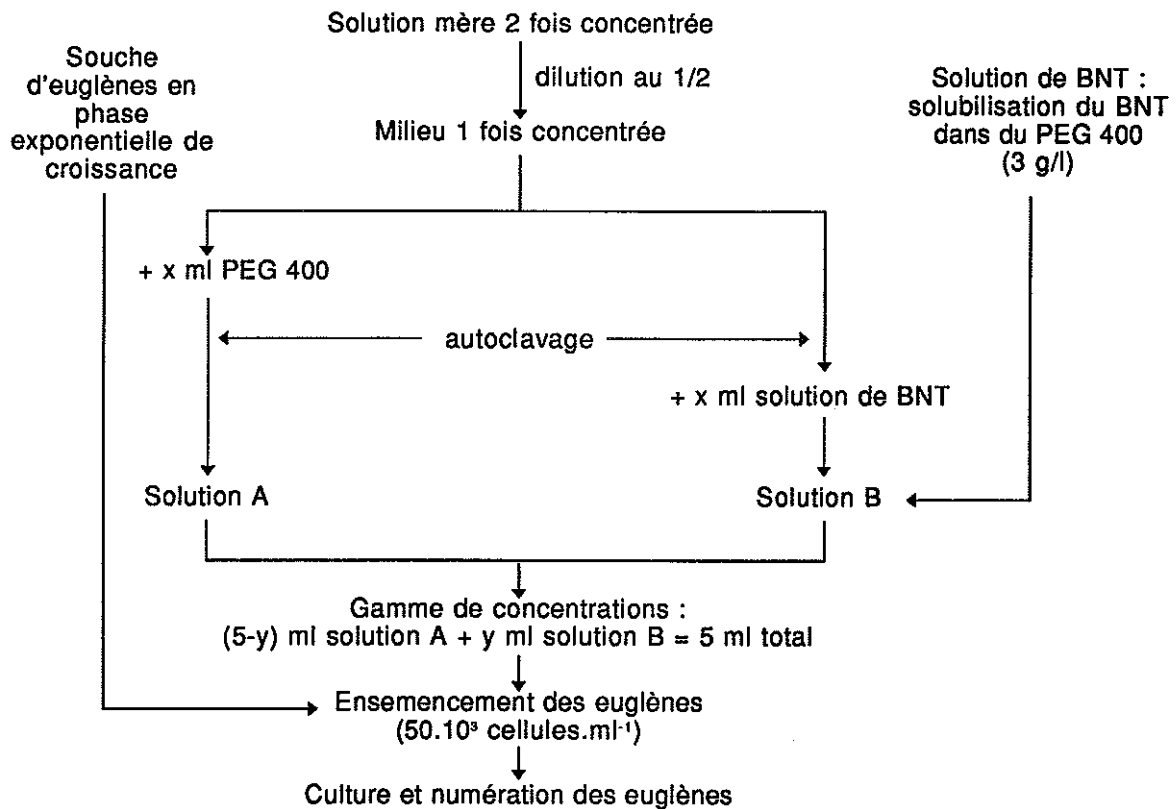
Ce milieu, appelé milieu A, est stérilisé à l'autoclave pendant 20 min à 120°C.

## 2. Milieu toxique

Comme la solubilité du BNT dans l'eau est très faible, il faut un solvant organique pour le dissoudre tel que le polyéthylène glycol 400 (PEG 400). Quinze mg de BNT sont dissouts dans 5 ml de PEG 400 à l'agitateur Bransonic permettant ainsi d'obtenir une solution mère à  $3 \text{ g.l}^{-1}$ .

La préparation de la solution toxique se fait en ajoutant 25 ml de milieu concentré deux fois, X ml de la solution toxique de BNT et on complète avec de l'eau distillée pour obtenir 50 ml. Cette solution constitue le milieu B.

Toutes ces opérations sont schématisées sur la figure suivante.



### **C. RÉPARTITION DU MILIEU DANS LES DIFFÉRENTS FLACONS**

Nous utilisons des flacons type boîte de Roux. La répartition du milieu dans ces flacons s'effectue sous une hotte à flux laminaire dans les conditions les plus stériles possibles afin d'éviter toute contamination bactérienne.

La gamme de concentration est réalisée en mélangeant le milieu A et le milieu B en proportions variables de telle sorte que l'on ait un volume final de 5 ml par flacon avec une concentration constante en PEG 400 (1,6 %).

Les vitamines B<sub>1</sub> et B<sub>12</sub> sont ajoutées dans chaque flacon juste avant l'ensemencement des Euglènes.

### **D. ENSEMENCEMENT DES EUGLÈNES**

L'ensemencement se fait à partir d'une souche mère repiquée quelques jours auparavant de telle sorte que les euglènes soient en phase exponentielle.

Avant la mise en culture, on effectue un comptage de la souche-mère afin de déterminer le volume de l'inoculum pour obtenir  $50.10^3$  cellules.ml<sup>-1</sup> dans les flacons. Les flacons sont ensuite placés dans l'enceinte climatique.

### **E. MÉTHODE DE COMPTAGE**

Le comptage est effectué au microscope optique sur une cellule de Malassez. Cette cellule présente deux plates-formes rectangulaires comportant en leur centre un quadrillage gravé. Ce quadrillage composé de 100 rectangles de 0,25 mm de longueur à 0,20 mm de largeur correspond à un volume de 1 mm<sup>3</sup>, soit 1µl. Les valeurs de numération sont exprimées en ml.

Pour chaque comptage, on effectue deux prélèvements dans des conditions stériles sous la hotte à flux laminaire :

- le premier prélèvement permet de déterminer le nombre total d'euglènes présentes dans le milieu. On utilise l'acide sulfochromique pour fixer les cellules vivantes et faciliter ainsi la numération. Les quantités du milieu et d'acide sulfochromique utilisées varient en fonction de la

concentration d'algues supposée dans le milieu de culture, et ceci dans le but d'avoir environ 100 à 200 euglènes dans le quadrillage de la cellule de Malassez.

- le deuxième prélèvement permet de dénombrer les cellules mortes qui seront colorées par le bleu trypan.

Le tableau ci-dessous indique les volumes d'acide sulfochromique et de bleu trypan utilisés en fonction du nombre d'euglènes.ml<sup>-1</sup>.

Volumes (µl)		Nombre de milliers de cellules par millilitre		
		50 - 200	200 - 4000	> 4000
Fixation des euglènes	prélevé	20	20	10
	acide sulfochromique	10	100	190
Coloration des euglènes	prélevé	20	20	10
	bleu trypan	10	10	10
	eau distillée	-	20	80

nombre d'euglènes vivantes = nombre d'euglènes fixées - nombre d'euglènes mortes

Le nombre N de cellules par ml est :

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

N : nombre de cellules / ml

n<sub>m</sub> : nombre de cellules comptées sur la cellule de Malassez

d : dilution

#### **F. DOSAGE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DES SOLUTIONS TOXIQUES**

Lorsqu'on ajoute la solution toxique (BNT + PEG 400) au milieu, on observe un relargage important du BNT. Ce relargage est tel que la filtration stérilisante entraîne un pourcentage de perte très élevé. Ceci nous a conduit à stériliser le milieu de culture à l'autoclave et à ajouter par la suite la solution toxique.

Le BNT est dosé dans le milieu de culture selon la méthode spectrophotométrique.

Selon la loi de Beer-Lambert, nous avons :

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

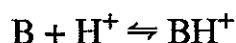
A : absorbance de la solution

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

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

L : longueur du trajet optique (1 cm)

Le BNT est une base faible. Selon le pH, il est sous forme neutre ou sous forme protonée :



B : base faible

Forme basique      Forme acide

Pour calculer la concentration en BNT, il faut tenir compte de cet équilibre acido-basique :

$$A = \epsilon_1 L [BH^+] + \epsilon_2 L [B]$$

soit

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

A : absorbance de la solution  
L : longueur du trajet optique (1 cm)  
 $\epsilon_1$  : coefficient d'extinction de la forme acide  $[BH^+]$  en  $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$   
 $\epsilon_2$  : coefficient d'extinction de la forme basique  $[B]$  en  $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$   
C : concentration totale en  $\text{mol.l}^{-1}$  ( $C = [B] + [BH^+]$ )

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

Comme le pH du milieu est égal à 3,5, nous mesurons l'absorbance de la solution à  $\lambda_1$  nm (pic de la forme protonée). A cette longueur d'onde, la forme neutre n'absorbe pas ( $\epsilon_2 = 0$ ) et donc l'équation (1) se résume à :

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

A : absorbance de la solution  
L : longueur du trajet optique (1 cm)  
 $\epsilon_1$  : coefficient d'extinction de la forme acide [BH<sup>+</sup>] en l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>  
C : concentration totale en mol.l<sup>-1</sup> (C = [B] + [BH<sup>+</sup>])

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

L'application numérique suivante est un exemple de l'utilisation de ces formules.

$$\begin{aligned} \text{pH} &= 3,5 \\ \text{pK}_a &= 6,58 \\ \log \epsilon_1 &= 4,21 \end{aligned}$$

L'absorbance du milieu toxique (milieu B) est en moyenne égale à 0,7058 à 350 nm.

$$x = 8,3176 \cdot 10^{-4} \quad C = 4,35 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$$

Pour l'expérience, nous réalisons une gamme de concentration à partir de ce milieu B et du milieu A (milieu sans BNT).

	Témoin	Flacon 1 (C1)	Flacon 2 (C2)	Flacon 3 (C3)	Flacon 4 (C4)
Volume milieu B (ml)	0	2	3	4	5
Volume milieu A (ml)	5	3	2	1	0
Concentrations calculées ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	0	17,4	26,1	34,8	43,5



## V. TESTS STATISTIQUES

### A. CALCUL DE LA COURBE DE CROISSANCE DE L'EUGLÈNE

A partir des valeurs expérimentales, nous pouvons définir une courbe logistique théorique dont l'équation est la suivante :

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

$N$  : nombre de cellules par ml au temps  $t$

$N_0$  : nombre initial de cellules par ml

$N_{\max}$  : nombre maximum de cellules par ml

$k$  : taux de croissance maximal en  $h^{-1}$

On détermine les valeurs de trois paramètres  $N_0$ ,  $N_{\max}$  et  $k$  par régression non linéaire selon la méthode de Gauss-Newton, en utilisant :

- la forme logarithmique de l'équation (1)

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

- les approximations initiales suivantes des trois paramètres :

$N_0$  égal à  $50 \cdot 10^3$  cellules.ml<sup>-1</sup>

$N_{\max}$  égal à la valeur la plus élevée obtenue lors de la numération

$$k = \frac{1}{t} \ln \left( \frac{\frac{N_{\max}}{N_0} - 1}{\frac{N_{\max}}{N} - 1} \right)$$

$t$  : heure de la première numération  
 $N$  : nombre de cellules.ml<sup>-1</sup> au temps  $t$

**B. ANALYSE DE VARIANCE À DEUX FACTEURS**

Le but est de comparer les moyennes de plusieurs échantillons indépendants pour tester l'influence de deux facteurs.

Le tableau indiqué ci-dessous présente la distribution des valeurs moyennes obtenues sous l'influence de deux facteurs (facteur A et facteur B) :

	B <sub>1</sub>	...	B <sub>j</sub>	...	B <sub>q</sub>
A <sub>1</sub>	x <sub>11</sub>	...	x <sub>1j</sub>	...	x <sub>1q</sub>
.	.		.		.
.	.		.		.
A <sub>i</sub>	x <sub>i1</sub>	...	x <sub>ij</sub>	...	x <sub>iq</sub>
.	.		.		.
.	.		.		.
A <sub>p</sub>	x <sub>p1</sub>	...	x <sub>pj</sub>	...	x <sub>pq</sub>

On considère que le facteur A peut avoir p modalités et que le facteur B possède q modalités ce qui représente un ensemble de pq modalités. On effectue alors les calculs suivants :

- La moyenne  $\bar{x}$  des valeurs x<sub>ij</sub> est définie de la manière suivante :

$$\bar{x} = \frac{1}{pq} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^q x_{ij}$$

- Moyennes conditionnelles

$$\bar{x}_{i\cdot} = \frac{1}{q} \sum_{j=1}^q x_{ij}$$

(moyenne de la i<sup>e</sup> ligne)



$$\bar{x}_{\cdot j} = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p x_{ij} \quad (\text{moyenne de la } j^{\text{e}} \text{ colonne})$$

- Variance factorielle due au facteur A

$$s_A^2 = \frac{q}{p-1} \sum_{i=1}^p (\bar{x}_{i\cdot} - \bar{x})^2$$

dispersion des moyennes conditionnelles  
 $\bar{x}_{i\cdot}$  autour de la moyenne  $\bar{x}$

- Variance factorielle due au facteur B

$$s_B^2 = \frac{p}{q-1} \sum_{j=1}^q (\bar{x}_{\cdot j} - \bar{x})^2$$

dispersion des moyennes conditionnelles  
 $\bar{x}_{\cdot j}$  autour de la moyenne  $\bar{x}$

- Variance factorielle due à l'interaction des deux facteurs

$$s_{AB}^2 = \frac{1}{(p-1)(q-1)} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^q (x_{ij} - \bar{x}_{i\cdot} - \bar{x}_{\cdot j} + \bar{x})^2$$

- Théorème de l'analyse de variance : cela permet de mettre en relation la variance estimée ( $s^2$ ) des valeurs  $x_{ij}$  et les variances factorielles calculées précédemment :

$$(pq - 1)s^2 = (p - 1)s_A^2 + (q - 1)s_B^2 + (p - 1)(q - 1)s_{AB}^2$$

- Conclusions :

On calcule pour finir les rapports suivants :

$$f_A = \frac{s_A^2}{s_{AB}^2} \quad \text{associé aux degrés de liberté } v_1 = p - 1, v_2 = (p - 1)(q - 1)$$

$$f_B = \frac{s_B^2}{s_{AB}^2} \quad \text{associé aux degrés de liberté } v_1 = q - 1, v_2 = (p - 1)(q - 1)$$

Les valeurs  $f_A$  et  $f_B$  sont ensuite comparées aux valeurs théoriques des tables de Snédécour pour un risque d'erreur donné (dans la suite de notre étude, ce dernier est égal à 5 %). Ces valeurs permettent de quantifier respectivement l'influence du premier et du deuxième facteurs.

## **RÉSULTATS**

Le premier temps de ce chapitre est consacré à des observations préliminaires sur les cellules vivantes et mortes. Dans le deuxième paragraphe, nous avons regroupé toutes les données quantitatives et les résultats fournis par l'analyse statistique.

### **I. DONNÉES QUALITATIVES**

#### **A. CELLULES VIVANTES**

Tous les constituants cellulaires de l'euglène ne sont pas visibles au grossissement  $\times 40$  utilisé pour la numération. Cependant, nous pouvons observer :

- par différence de contraste avec le milieu, le flagelle locomoteur qui émerge du goulot ;
- le stigma de couleur rouge qui se voit selon l'incidence de la cellule ;
- les plastes colorés en vert, situés en périphérie de la cellule.

Selon le pH, l'euglène possède une morphologie différente : elle est fusiforme à pH 3,5 et prend une forme de bâtonnet à pH 7,2.

Grâce aux battements du flagelle, les euglènes se déplacent selon une trajectoire hélicoïdale. Leur mobilité varie selon le pH :

- à pH 3,5, les cellules ont une mobilité réduite. Elles présentent de nombreuses déformations (contractions, distorsions).
- à pH 7,2, les cellules sont très mobiles.

### **B. CELLULES MORTES**

Les cellules mortes n'ont pas de variation morphologique en fonction du pH. Elles se présentent le plus souvent sous forme globulaire. Parfois, nous avons pu observer des cellules mortes allongées de même longueur que les cellules vivantes, mais avec un diamètre plus réduit.

Les cellules mortes sont mises en évidence par coloration avec le bleu trypan : elles présentent des inclusions bleues denses et un cytoplasme coloré en bleu clair.

## **II. DONNÉES QUANTITATIVES**

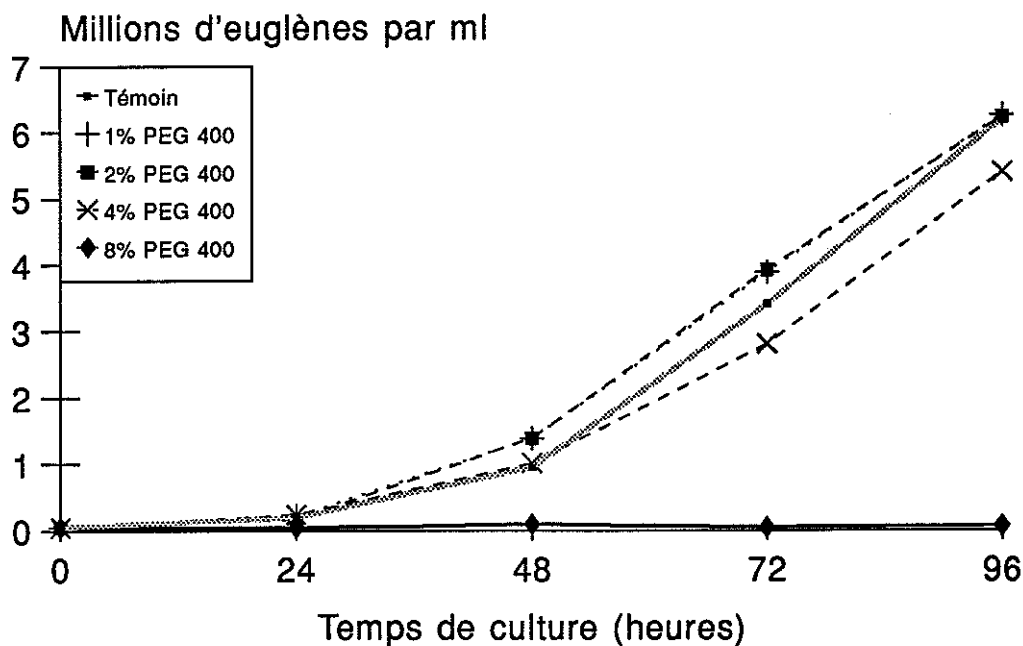
### **A. TÉMOINS**

Le milieu de culture utilisé pour notre étude contient une certaine concentration de PEG 400 qui a permis de solubiliser le BNT. Il est donc nécessaire de vérifier que ce solvant n'ait aucune influence sur la croissance des euglènes.

#### **1. Action du PEG 400**

Le graphique suivant montre les différences de croissance chez des euglènes cultivées à pH 3,5 en présence de PEG 400 aux doses suivantes : 0 % (témoin), 1 %, 2 %, 4 % et 8 %.

## Effet de la concentration en PEG 400 sur la croissance des euglènes cultivées à pH 3,5



La lecture du graphe permet d'établir les constatations suivantes :

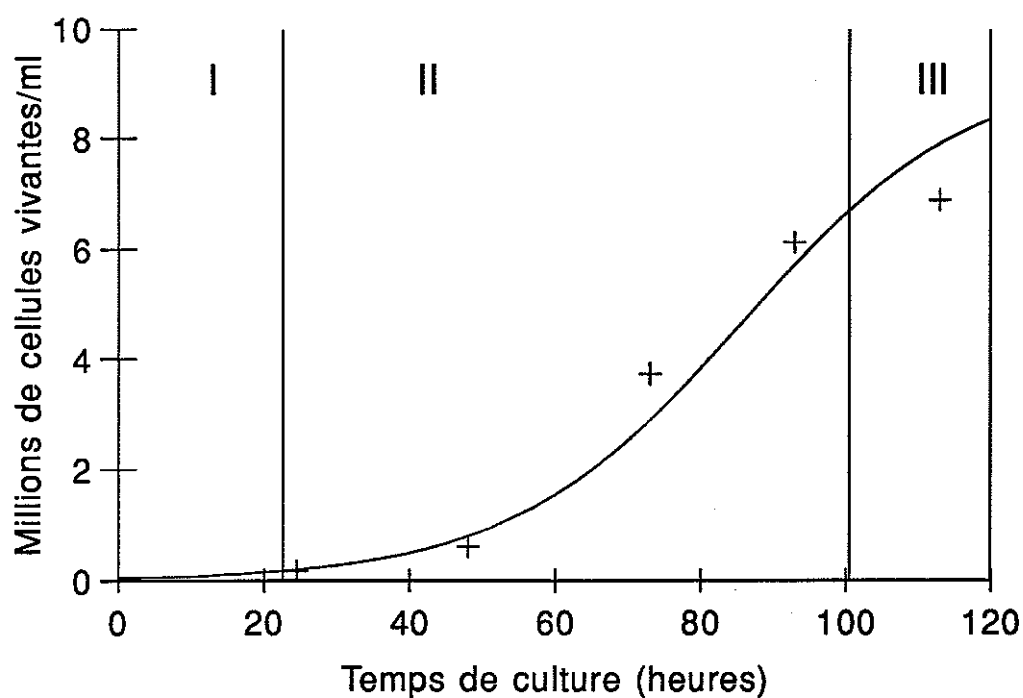
- aux concentrations de 1 et 2 %, la croissance des euglènes est sensiblement identique, voire même supérieure à celle du témoin ;
- à la dose de 4 %, nous notons une légère diminution de la croissance par rapport à celle du témoin. Cette diminution n'est cependant pas significative ;
- lorsque le milieu contient 8 % de PEG 400, les euglènes subissent un effet cytostatique c'est-à-dire que le solvant inhibe la croissance des algues mais on ne note pas une augmentation de la mortalité.

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé un milieu à 1,6 % de PEG 400 : à cette concentration, le solvant n'a pas d'action sur les cellules et, en conséquence, seul le BNT pourra agir sur la croissance des euglènes.

## 2. Croissance des euglènes témoins

La courbe de croissance possède les différentes phases de la courbe théorique (chapitre III) : une phase de latence (I), une phase de croissance exponentielle (II), une phase de ralentissement (III) comme le montre le graphique ci-dessous.

### Croissance des euglènes témoins



La phase de latence est mal définie ; elle se confond avec la phase de démarrage parce que les premières numérations débutent 20 heures après l'ensemencement.

Le début et la durée des différentes phases sont récapitulés dans le tableau suivant.

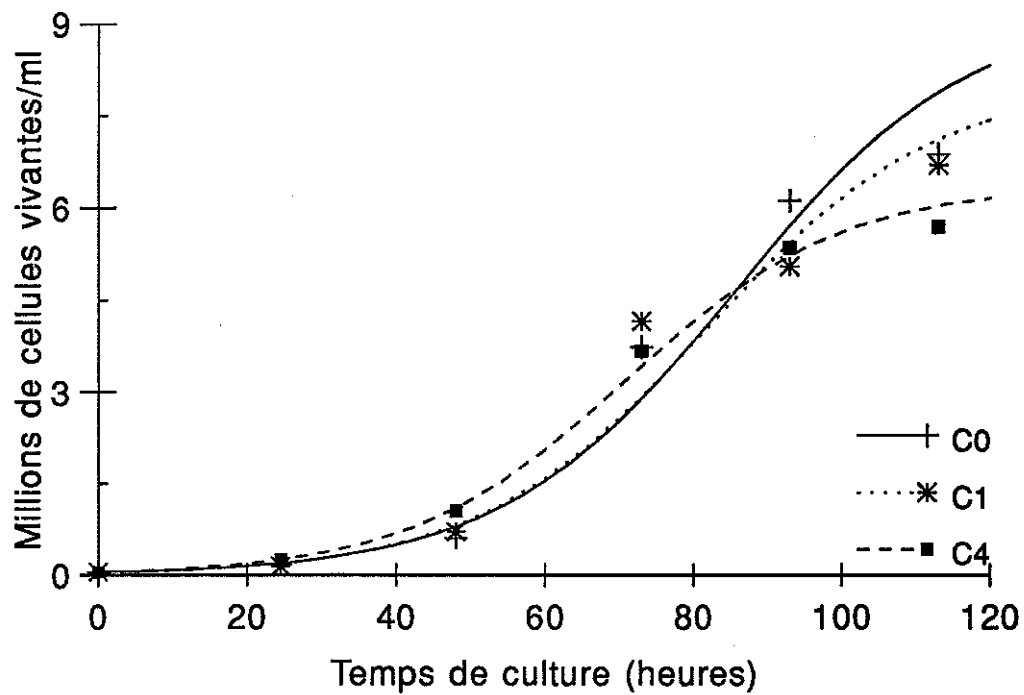
Nom de la phase	Début (en h)	Durée (en h)
latence	0	24
exponentielle	24	76
ralentissement	100	20
(plateau ?)	>120	



## B. EUGLÈNES SOUMISES AU TOXIQUE

Le graphe suivant montre l'effet du BNT à doses sublétales sur la croissance des algues. dans un but de comparaison, nous y avons indiqué également celle du témoin.

### Effet du BNT sur la croissance des algues



On constate que :

- pendant la phase de latence et la phase exponentielle, les euglènes intoxiquées ont une croissance identique à celle du témoin ;
- pendant la phase de ralentissement et la phase stationnaire, l'augmentation de concentration en BNT s'accompagne d'une diminution numérique des cellules.

### III. ETUDE STATISTIQUE

L'analyse de variance à deux facteurs permet d'étudier l'influence simultanée de deux paramètres sur la croissance des euglènes intoxiquées.

Les trois premiers paramètres sont a) la concentration en produit (facteur dose ou Fdose), b) le temps de culture (facteur heure ou Fheure) et c) le nombre de repiquages (facteur semaine ou Fsemaine). Nous faisons alors varier deux facteurs et nous fixons le troisième.

Nous avons de plus considéré un quatrième paramètre, le Fsemaine/dose. Il correspond à l'association des facteurs semaine et dose. Dans ce cas, nous avons étudié simultanément ce facteur par rapport à Fheure.

#### A. INFLUENCE DE LA DOSE (FDOSE)

##### 1. Par rapport à celle du temps de culture (Fheure)

Le facteur fixé est, dans ce cas, Fsemaine. La comparaison a été réalisée à  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$  et  $S_5$ .

Le tableau suivant regroupe les valeurs des deux facteurs étudiés (Fdose, Fheure) calculées pour chaque semaine et leur signification au seuil de 5 %.

Comparaison $C_0$ , $C_1$ , $C_2$ , $C_3$ et $C_4$ entre 24 h et 96 h						
	$S_0$	$S_1$	$S_2$	$S_3$	$S_4$	$S_5$
Fdose $v_1 = 4$ , $v_2 = 12$	1,07 (NS)	2,68 (NS)	2,92 (NS)	3,79 (NS)	4,65 (NS)	3,74 (NS)
Fheure $v_1 = 3$ , $v_2 = 12$	611,28 (S)	557,08 (S)	774,09 (S)	540,99 (S)	1439,65 (S)	369,15 (S)

$v_1$  et  $v_2$  : degrés de liberté. NS : non significatif. S : significatif au seuil de 5 %.

Le temps de culture a une influence significative sur la croissance des cellules. A l'inverse, la dose n'a pas d'influence.

## 2. Par rapport à la semaine de repiquage (Fsemaine)

Le facteur fixé est Fheure : à la 24<sup>e</sup>, 48<sup>e</sup>, 72<sup>e</sup> et 96<sup>e</sup> heure après le repiquage.

Le tableau suivant regroupe les valeurs des deux facteurs étudiés (Fdose, Fsemaine) calculées pour chaque heure et leur signification au seuil de 5 %.

Comparaison C <sub>0</sub> , C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> et C <sub>4</sub> entre S <sub>0</sub> et S <sub>5</sub>				
	24 h	48 h	72 h	96 h
Fdose v1 = 4, v2 = 20	0,70 (NS)	0,65 (NS)	0,64 (NS)	1,05 (NS)
Fsemaine v1 = 5, v2 = 20	3,62 (S)	4,69 (S)	6,23 (S)	6,53 (S)

v1 et v2 : degrés de liberté. NS : non significatif. S : significatif au seuil de 5 %.

Le facteur semaine exerce une influence significative sur la croissance des euglènes. Par contre, la dose est sans effet.

### **B. INFLUENCE DE FSEMAINE/DOSE PAR RAPPORT À FHEURE**

Dans ce paragraphe, nous nous proposons d'étudier l'influence du temps de culture (Fheure) par rapport aux effets cumulés de la semaine de repiquage et de la dose.

Le tableau suivant regroupe les valeurs des deux facteurs étudiés (Fheure et Fsemaine/dose) calculées pour chaque cas ainsi que leur signification au seuil 5 %.

Comparaisons (entre 24 h et 96 h)	Fheure	Fsemaine/dose
S <sub>0</sub> C <sub>1</sub> , S <sub>1</sub> C <sub>5</sub> , S <sub>2</sub> C <sub>8</sub> , S <sub>3</sub> C <sub>10</sub>	459,59 <sup>a</sup> (S)	5,25 <sup>a</sup> (S)
S <sub>1</sub> C <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> C <sub>5</sub> , S <sub>3</sub> C <sub>8</sub>	177,25 <sup>b</sup> (S)	4,64 <sup>c</sup> (NS)
S <sub>2</sub> C <sub>1</sub> , S <sub>3</sub> C <sub>5</sub> , S <sub>4</sub> C <sub>8</sub>	146,54 <sup>b</sup> (S)	4,42 <sup>c</sup> (NS)
S <sub>3</sub> C <sub>1</sub> , S <sub>4</sub> C <sub>5</sub> , S <sub>5</sub> C <sub>8</sub>	75,46 <sup>b</sup> (S)	4,36 <sup>c</sup> (NS)

v1 et v2 : degrés de liberté (avec a : v1 = 3, v2 = 9 ; b : v1 = 3, v2 = 6 ; c : v1 = 2, v2 = 6).  
NS : non significatif. S : significatif au seuil de 5 %.

L'influence du temps de culture est significative. L'influence cumulée de la dose et de la semaine est non significative sauf pour la première série de repiquage.

### C. INFLUENCE DU PROTOCOLE DE REPIQUAGE

Par cette expression, nous considérons le procédé selon lequel les cellules sont repiquées avec les mêmes concentrations de BNT (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> ou C<sub>4</sub>) ou avec des algues cultivées à des doses inférieures. Le détail du protocole est indiqué sur le schéma de la page 33.

#### 1. Comparaison entre C<sub>2</sub> et C<sub>5</sub>

Le tableau suivant regroupe les valeurs de Fdose et celles de Fsemaine (de S<sub>1</sub> à S<sub>5</sub>) calculées pour chaque heure et leur signification au seuil de 5 %.

	24 h	48 h	72 h	96 h
Fdose v1 = 1, v2 = 4	0,19 (NS)	0,24 (NS)	0,23 (NS)	0,07 (NS)
Fsemaine v1 = 4, v2 = 4	1,13 (NS)	1,17 (NS)	1,10 (NS)	0,69 (NS)

v1 et v2 : degrés de liberté. NS : non significatif. S : significatif au seuil de 5 %.

Les deux facteurs n'ont pas d'influence significative sur la croissance des euglènes.

## 2. Comparaison entre C<sub>3</sub> et

### a. C<sub>6</sub>

Le tableau suivant regroupe les valeurs de Fdose et celles de Fsemaine (de S<sub>1</sub> à S<sub>5</sub>) calculées pour chaque heure et leur signification au seuil de 5 %.

	24 h	48 h	72 h	96 h
Fdose v1 = 1, v2 = 4	0,04 (NS)	0,01 (NS)	0,11 (NS)	0,24 (NS)
Fsemaine v1 = 4, v2 = 4	8,68 (S)	9,68 (S)	6,37 (NS)	1,90 (NS)

v1 et v2 : degrés de liberté. NS : non significatif. S : significatif au seuil de 5 %.

Le protocole de repiquage n'a pas d'influence significative. On note par contre une significativité pour Fsemaine à la 24<sup>e</sup> et à la 48<sup>e</sup> heure.

### b. C<sub>6</sub> et C<sub>8</sub>

Le tableau suivant regroupe les valeurs de Fdose et celles de Fsemaine (de S<sub>2</sub> à S<sub>5</sub>) calculées pour chaque heure et leur signification au seuil de 5 %.

	24 h	48 h	72 h	96 h
Fdose v1 = 2, v2 = 6	1,19 (NS)	0,58 (NS)	0,42 (NS)	0,39 (NS)
Fsemaine v1 = 3, v2 = 6	3,22 (NS)	2,66 (NS)	2,14 (NS)	1,31 (NS)

v1 et v2 : degrés de liberté. NS : non significatif. S : significatif au seuil de 5 %.

Les deux facteurs n'ont pas d'influence significative sur la croissance des euglènes.

### 3. Comparaison entre C<sub>4</sub> et

#### a. C<sub>7</sub>

Le tableau suivant regroupe les valeurs de Fdose et celles de Fsemaine (de S<sub>1</sub> à S<sub>5</sub>) calculées pour chaque heure et leur signification au seuil de 5 %.

	24 h	48 h	72 h	96 h
Fdose v1 = 1, v2 = 4	< 0,01 (NS)	0,28 (NS)	0,44 (NS)	0,11 (NS)
Fsemaine v1 = 4, v2 = 4	4,00 (NS)	5,22 (NS)	6,95 (S)	6,23 (NS)

v1 et v2 : degrés de liberté. NS : non significatif. S : significatif au seuil de 5 %.

Le protocole de repiquage n'a pas d'influence significative sur la croissance des euglènes. Fsemaine n'exerce une influence significative qu'à la 72<sup>e</sup> heure.

#### b. C<sub>7</sub> et C<sub>9</sub>

Le tableau suivant regroupe les valeurs de Fdose et celles de Fsemaine (de S<sub>2</sub> à S<sub>5</sub>) calculées pour chaque heure et leur signification au seuil de 5 %.

	24 h	48 h	72 h	96 h
Fdose v1 = 2, v2 = 6	0,04 (NS)	0,32 (NS)	0,42 (NS)	0,49 (NS)
Fsemaine v1 = 3, v2 = 6	9,08 (S)	15,47 (S)	21,54 (S)	7,33 (S)

v1 et v2 : degrés de liberté. NS : non significatif. S : significatif au seuil de 5 %.

Le protocole de repiquage n'a pas d'effet significatif. Par contre Fsemaine a toujours une influence nette sur la croissance des euglènes.

#### 4. Comparaison entre C<sub>4</sub> et C<sub>10</sub>

Le tableau suivant regroupe les valeurs de Fdose et celles de Fsemaine (de S<sub>3</sub> à S<sub>5</sub>) calculées pour chaque heure et leur signification au seuil de 5 %.

	24 h	48 h	72 h	96 h
Fdose v1 = 1, v2 = 2	0,22 (NS)	0,16 (NS)	0,45 (NS)	1,38 (NS)
Fsemaine v1 = 2, v2 = 2	0,44 (NS)	0,80 (NS)	1,44 (NS)	1,26 (NS)

v1 et v2 : degrés de liberté. NS : non significatif. S : significatif au seuil de 5 %.

Les deux facteurs étudiés n'ont pas d'influence significative sur la croissance des Euglènes.

## COMMENTAIRES

Ce chapitre se compose de trois parties. La première porte sur les résultats que nous avons obtenus au cours de nos différentes manipulations. La seconde concerne l'interprétation de ces données. La dernière regroupe les éléments de comparaison par rapport aux travaux parus dans la littérature.

### I. SYNTHÈSE DES RÉSULTATS

Les euglènes cultivées à une dose donnée et repiquées dans les mêmes conditions ne présentent pas de modification significative dans leur croissance.

Les cultures effectuées initialement à la dose  $C_1$  ( $17,4 \mu\text{mol.l}^{-1}$  de BNT) et repiquées la semaine suivante à une dose supérieure ne présentent pas de différence significative dans leur croissance lorsque la dernière dose utilisée est inférieure à  $C_4$  ( $43,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ).

Par contre, lorsque les cellules sont cultivées et repiquées en utilisant  $C_4$  comme dernière dose, on constate une modification significative dans la croissance des euglènes.



## II. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Le plan de ce paragraphe est identique à celui que nous avons adopté au cours de l'étude statistique.

### A. INFLUENCE DE FDOSE, FHEURE ET FSEMAINE

Les facteurs sont d'abord commentés deux par deux puis ensembles :

- Fheure et Fdose.

L'influence significative de Fheure que nous avons constaté tout au long de l'expérience peut s'expliquer par la multiplication continue des euglènes : en effet, le nombre de cellules suit une croissance normale, qu'il s'agisse d'une culture témoin ou d'algues exposées au toxique. Par contre, pour Fdose, la non significativité démontre que la prolifération des euglènes n'est pas modifiée lorsque le BNT est à dose sublétales. Ces conditions expérimentales vont nous permettre de déterminer dans la suite de notre étude si un changement survient dans la croissance des algues.

- Fsemaine et Fdose.

Fsemaine exerce une influence significative sur la croissance des euglènes. Pour expliquer ce résultat, il est logique de penser que la modification de croissance constatée en fonction de ce facteur pourrait résulter d'un changement dans la sensibilité des cellules vis à vis du BNT lorsqu'il est appliqué à doses répétées. Par contre, le fait que Fdose n'a pas d'influence significative pour un temps et une semaine de culture donnés, démontre que nous nous situons toujours à dose sublétales. De ces deux résultats, nous pouvons en déduire que les modifications de sensibilité seraient identiques d'une semaine à l'autre.

- Fheure et Fsemaine/dose.

Fheure exerce une influence significative pour la raison que nous avons rapportée ci-dessus. Par contre, Fsemaine/dose n'a une influence significative qu'entre  $S_0$  et  $S_3$  pour les doses  $C_1$ ,  $C_5$ ,  $C_8$  et  $C_{10}$ . Sous l'effet de ce changement dans les conditions de culture, les euglènes ont donc tendance à modifier les caractéristiques de leur croissance. Cependant, le même type de repiquage réalisé à partir de  $S_1$  n'a pas d'effet significatif sur

la croissance des cellules et ceci montre que ces dernières s'adaptent tout de suite à leur milieu, après un seul changement de culture.

#### **B. INFLUENCE DU PROTOCOLE DE REPIQUAGE**

L'interprétation des résultats sera faite pour chaque concentration de BNT prise isolément. Nous commencerons donc par la dose  $C_2$  avant d'aborder la dose  $C_3$  et de terminer par la dose  $C_4$ .

##### **- Comparaison entre $C_2$ et $C_5$**

$F_{dose}$  et  $F_{semaine}$  n'ont pas d'influence significative. Ceci démontre qu'il n'y a pas de modification dans la croissance des cellules de  $S_1$  à  $S_5$  quel que soit le temps de culture. Il est logique de penser que les algues s'adaptent immédiatement à leurs conditions de culture lorsque la dose en BNT dans le milieu est égale à  $C_2$ .

##### **- Comparaison entre $C_3$ , $C_6$ et $C_8$**

Lorsqu'on compare  $C_3$  et  $C_6$  (de  $S_1$  à  $S_5$ ), les constatations sur l'influence de  $F_{dose}$  sont identiques à celles que nous avons effectuées à l'alinéa précédent. Par contre,  $F_{semaine}$  a un effet significatif sur la croissance à la 24<sup>e</sup> et à la 48<sup>e</sup> heure. Pour expliquer ce fait, on peut émettre l'hypothèse que le temps d'adaptation pour les euglènes cultivées à la dose  $C_3$  serait plus long que celui constaté chez les algues lorsqu'elles sontensemencées à la concentration  $C_2$ .

Si on complète l'analyse précédente en comparant  $C_3$ ,  $C_6$  et  $C_8$  (de  $S_2$  à  $S_5$ ), on note que les cellules se sont adaptées immédiatement à leur nouvelle condition de culture car  $F_{semaine}$  n'a pas d'influence significative. Ce résultat suggère que les repiquages successifs de  $C_1$  à  $C_8$  laisseraient aux euglènes le temps de s'habituer à leur milieu.

##### **- Comparaison entre $C_4$ , $C_7$ et $C_9$**

Aucune différence notable n'est observée entre  $C_4$  et  $C_7$  à l'exception de  $F_{semaine}$  qui a une influence significative à la 72<sup>e</sup> heure dans l'intervalle  $S_1$  à  $S_5$ . Malgré cette constatation, nous estimons que ce résultat isolé doit être considéré comme non significatif sur l'ensemble de l'analyse. Par conséquent, les cellules subissent de la même manière l'effet du produit quels que soient le temps et la semaine de culture.

La comparaison des trois concentrations  $C_4$ ,  $C_7$  et  $C_9$  (de  $S_2$  à  $S_5$ ) montre que  $F_{dose}$  n'a pas d'influence significative sur la croissance des euglènes. Cependant, on constate que pour une heure donnée et quel que soit la dose ( $C_4$ ,  $C_7$ ,  $C_9$ ), il y a une augmentation significative dans le nombre de cellules par ml en fonction de la semaine de culture ( $F_{semaine}$  significatif au seuil de 5 %). Dans ces conditions, on peut penser que les cellules pourraient développer une résistance. Comme la comparaison entre  $C_4$  et  $C_7$  n'a pas permis de dégager un phénomène de ce type, il est judicieux de penser que l'apparition de cette résistance serait essentiellement due au repiquage des euglènes selon le protocole  $C_9$ .

### C. REMARQUE

La comparaison en  $C_4$  et  $C_{10}$  montre que la croissance n'est pas modifiée. Les cellules ne montrent pas d'accoutumance à l'action du BNT qu'il s'agisse d'un repiquage à dose constante ( $C_4$ ) ou d'un ensemencement réalisé à partir d'algues cultivées à doses croissantes.

### III. DISCUSSION

La comparaison de nos résultats a été effectuée par rapport aux travaux publiés par l'école limousine sur la croissance des euglènes lorsqu'elles sont soumises au BNT et à ses dérivés. A cet effet, nous avons utilisé les thèses de DUFOUR (1989), de VIGNOLES (1990), de GRENAILLE (1991) et de LACOUTURE (1991).

Afin de permettre une comparaison avec les données de ces auteurs, nous avons la  $CA_{max}$  à partir de nos propres résultats. Le tableau ci-dessous regroupe tous ces éléments.

	$CA_{max}$ ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	$CL_{50}$ ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	$CI_{50}$ ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )
Nos résultats	17,4 à 43,5	> 43,5	> 43,5
Littérature	2,34 à 2,57	14,1 à 14,5	10 à 11

L'analyse de ce tableau montre que nos résultats sur les trois paramètres précités sont largement supérieurs à ceux rapportés dans la littérature. L'interprétation de cette discordance est assez délicate à réaliser. L'explication la plus valable serait de rapporter cette différence à la nature du produit utilisé. Nous nous sommes basé sur l'hypothèse que VIGNOLES (1990) a formulée dans le cadre de ses recherches : les produits de dégradation du BNT seraient inactifs. Dans ces conditions, on peut penser que les concentrations supérieures relevées dans le cadre de notre travail pourraient être liées à une certaine dégradation du produit lui-même, nécessitant ainsi une dose supérieure de BNT pour avoir les mêmes effets. Comme le produit utilisé provient du même lot que celui employé par VIGNOLES, la vérification de ces deux hypothèses impose d'estimer la proportion de produit dégradé.

## RESUME ET CONCLUSIONS

Notre étude s'inscrit dans le cadre des travaux qui ont été réalisés sur le BNT et ses dérivés. Son but est de mettre en évidence une éventuelle modification dans la croissance d'une algue unicellulaire : *E. gracilis*.

Ces expériences ont été effectuées en cultivant les euglènes en présence de concentrations sublétales de BNT. Des repiquages ont été effectués chaque semaine à partir des cultures soumises au toxique de deux manières différentes : soit à la même dose, soit à une dose plus élevée mais appartenant à la même gamme de concentrations.

Les résultats obtenus peuvent se résumer en trois points :

- les euglènes cultivées à une dose donnée et repiquées dans les mêmes conditions ne présentent pas de modification significative de leur croissance.

- les cultures effectuées initialement à la dose  $C_1$  et repiquées la semaine suivante à une dose supérieure ne présentent généralement pas de différence significative dans leur croissance lorsque la dernière dose utilisée est inférieure à  $C_4$ .

- par contre, lorsque les cellules sont cultivées et repiquées en utilisant  $C_4$  comme dernière dose, on constate une modification significative dans la croissance des euglènes.

Cette dernière donnée suggère que les algues pourraient développer une certaine résistance au produit.

Cette dernière hypothèse nécessite de réaliser des expériences complémentaires sur une plus longue période pour la confirmer ou l'infirmer. Si les algues développent effectivement une résistance, il est nécessaire de supposer les faits suivants :

- si les dérivés du BNT sont appliqués sur le terrain pour contrôler les mollusques hôtes de *Fasciola hepatica*, ces derniers peuvent développer une résistance. Il serait donc nécessaire d'augmenter les doses pour avoir la même activité molluscicide.

- il est nécessaire de rappeler que les doses molluscicides du BNT stimulent la croissance des euglènes. Si l'on augmente les doses, on peut aboutir à un déséquilibre important dans le milieu.

## BIBLIOGRAPHIE

- BARNISH G., PRENTICE M.A. (1981). Lack of resistance of the snail *Biomphalaria glabrata* after nine years of exposure to Bayluscide. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75** 106-107.
- BAYER (1970). Bayluscide® : molluscicide for the control of freshwater snails, vectors of bilharziasis. Documentation scientifique Bayer, 7 p.
- BEYNON K.I. (1971). The fate and effects of Frescon molluscicide in aquatic systems. *Schrif. Wasser Boden Lufthyg.* **34** 95-107.
- BONALY-CANTAREL J. (1988). Cytophysiologie et cytotoxicologie chez les algues unicellulaires. Action du cadmium sur des cellules d'*Euglena gracilis*. Apport de la cytométrie en flux liquide. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **135** 27-40.
- BONALY J., BARIAUD A., DELCOURT A., MESTRE J.C. (1978). Les effets des ions Cd<sup>2+</sup> sur les cellules d'*Euglena gracilis* L. : cytotoxicité et acquisition d'une résistance. *C. R. Acad. Sci. Paris série D* **287** 463-466.

- CAVIER R., GAYRAL P., GUILLAUMEL J., CLAVEL J.M., DEMERSEMAN P., ROYER R. (1978). Recherches sur les dérivés nitrés d'intérêt biologique. XVI. Relations entre structures et activités protozoocides, anthelminthiques et molluscicides dans la série du benzamido-2 nitro-5 thiazole. *Eur. J. Med. Chem.* **13** 539-543.
- CLEDAT D. (1989). Influence de la structure sur la basicité, la lipophilie et la stabilité de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole. Thèse Doct. Univ. Chimie-Chimie Physique, Limoges, 83 p.
- CORBETT J.R. (1974). The biochemical mode of action of pesticides. Academic Press, éd. London, New York, 330 p.
- DEBORD J., FRAYSSE J.L., PENICAUT B. (1988). Etude spectrophotométrique de la basicité de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole. *Analisis* **16** 519-522.
- DUFOUR I. (1989). Impact de l'utilisation de molluscicides sur la croissance d'*Euglena gracilis* *in vitro*. Thèse Doct. Pharm., Limoges, 86 p.
- DUNCAN J., BROWN N. (1988). Molluscicide resistance and a field test kit. *Trop. Med. Parasit.* **39** 59-61.
- EDJLALI M., CALVAYRAC R. (1991). Effets des ions métalliques sur l'intensité respiratoire et sur les capacités catalytiques chez *Euglena gracilis* Z. C. R. Acad. Sci. Paris **312** série III 177-182.
- ENCYCLOPEDIA UNIVERSALIS (1988). Euglenophyceae. Encyclopedia universalis éd., Paris, 522-524.
- EL-GINDY H.I. (1975 a). Mollutox and Bayer 73 as molluscicides against *Bulinus truncatus* and *Biomphalaria alexandrina*. *Egypt. J. Bilharz.* **2** 213-220.
- EL-GINDY H.I. (1975 b). A comparative study on the effect of repeated application of Bayer 73 and Mollutox on *Biomphalaria alexandrina*. *J. Egypt. Med. Assoc.* **58** 313-323.
- GANCARZ Z. (1958). Studies on schistosomiasis. 3. Resistance of *Oncomelania* snails to sodium pentachlorophenate. *Chin. Med. J.* **77** 242-243.



- GAYRAL P., CAVIER R. (1977). Actualités et perspectives d'avenir des molluscicides. *In* : Actualité en chimie thérapeutique, 5<sup>e</sup> série, Société de Chimie Thérapeutique ed., Paris, 177-209.
- GORENFLOT R. (1975). Précis de Botanique, tome 1, 184 p.
- GREENBLATT G.L., SCHIFF J.A. (1959). A pheophytine like pigment in dark adapted *Euglena gracilis*. *J. Protozool.* 6 23-28.
- GRENAILLE V. (1991). Les effets toxiques de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole sur *Euglena gracilis* Klebs. Thèse Doct. Pharm., Limoges, 93 p.
- JELNES J.E. (1977). Letter : Evidence of possible molluscicide resistance in schistosome intermediate hosts from Iran. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71 451.
- JOUBERT P.H., PRETORIUS S.J. (1991). Laboratory evaluation of B-2 as a molluscicide in the control of the snail intermediate hosts of schistosomiasis in South Africa. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 85 447-453.
- KOMIYA Y., YASURAOKA K., HOSAKA Y., OGAWA K. (1961). The resistance of the *Oncomelania* snail to molluscicides. 1. Sodium pentachlorophenate. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 14 131-137.
- LACOUTURE L. (1991). Etude de la toxicité de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole sur *Euglena gracilis* Klebs. Thèse Doct. Pharm., Limoges, 82 p.
- LEVEQUE C. (1990). Impact de la lutte antivectorielle sur l'environnement aquatique. Proceedings ICOPA VII, Paris, 20-24 août 1990. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65 suppl.1 119-124.
- MADULO-LEBLOND G., GAYRAL P., GUILLAUMEL J., CLAVEL J.M., DEMERSEMAN P., ROYER R. (1981). Recherches sur les dérivés nitrés d'intérêt biologique. XXIII. Nouvelles données relatives aux propriétés molluscicides des dérivés halogénés du benzamido-2 nitro-5 thiazole. *Eur. J. Med. Chem.* 16 267-270.
- MAGE C. (1988). Contribution à l'étude de la fasciolose à *Fasciola hepatica* L. des bovins allaitants dans le Limousin et la Cerdagne (France). Conséquences zootechniques et essais thérapeutiques. Doct. Univ. Limoges, Sci. Nat., n° 3, 136 p.

- McCULLOUGH F.S., GAYRAL P., DUNCAN J., CHRISTIE J.D. (1981). Les molluscicides dans la lutte contre la schistosomiase. *Bull. W.H.O.* **59** 17-26.
- MILLET F. (1984). Mise en évidence des rythmes circannuels de croissance chez *Euglena gracilis* et *Chlamydomonas reinhardtii*. Thèse Doct. 3<sup>e</sup> cycle Sci. Pharm., Paris XI, 118 p.
- NEWTON W.L. (1963). The development in the laboratory of resistance to sodium pentachlorophenate in *Australorbis glabratus*. *Bull. W.H.O.* **29** 539-544.
- OKABE K., OKAHARA T., ONO N. (1956). Studies on the prevention of Schistosomiasis japonica. Resistance of *Oncomelania nosophora* to PCP-Na. *J. Kurume Med. Ass.* **19** 1609-1614.
- OTA S., SATO S. (1956). Resistance of *Oncomelania nosophora* to molluscicides. *Kitakanto Med. J.* **6** 287.
- RENAUDIN M.C. (1987). Action d'un insecticide organophosphoré, le méthyl-parathion sur un Crustacé Amphipode, *Gammarus pulex*. Thèse Doct. Pharm., Limoges, n° 325, 86 p.
- ROUX P. (1984). Influence du CIPC sur la croissance et la morphologie plastidienne d'*Euglena gracilis*. Thèse Doct. Pharm., Limoges, 81 p.
- TAURISSON C. (1991). Plantes molluscicides et bilharziose. Thèse Doct. Pharm., Limoges, 258 p.
- VIGNOLES P. (1990). Toxicité du benzamido-2 nitro-5 thiazole et de onze dérivés sur *Lymnaea peregra ovata* Müller, *Gammarus pulex pulex* L. et *Euglena gracilis* Klebs. Relations structure-activité quantitatives. Thèse Doct. Univ. Sci. Nat., Limoges, 130 p.
- VIGNOLES P., DREYFUSS G., CLEDAT D., DEBORD J., PENICAUT B., RONDELAUD D. (1990). Lutte antivectorielle dans la distomatose à *Fasciola hepatica* L. I. Relation structure-activité quantitative de composés molluscicides sur *Lymnaea peregra ovata* Müller. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* **8** 119-125.

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.

WALTON B.C., WINN M.M., WILLIAMS J.E. (1958). Development of resistance to molluscicides in *Oncomelania nosophora*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 7 618-619.

WEBBE G. (1987). The toxicology of molluscicides. International encyclopedia of pharmacology an therapeutics, section 125, par Webbe G. éd. Pergamon Press.

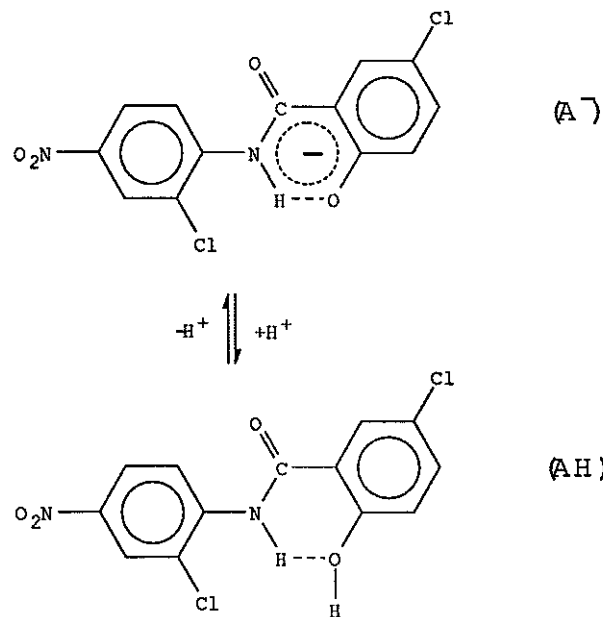
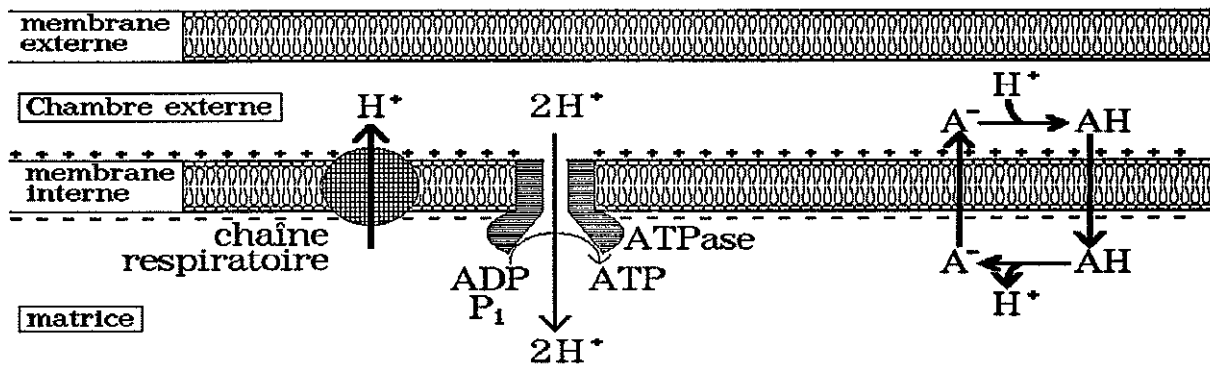
## **ANNEXES**

## ANNEXE 1

### Mode d'action du Niclosamide et du BNT

Les propriétés acido-basiques de ces dérivés nitrés, jointes à leur lipophilie, incitent à penser qu'ils pourraient inhiber la respiration cellulaire des organismes contaminés en entrant en compétition avec l'ATPase mitochondriale : ils inhibent ainsi la synthèse d'ATP. Un tel mécanisme d'action est en effet établi pour le Niclosamide (CORBETT, 1974). D'après DEBORD (résultats non publiés), le mode d'action du BNT serait identique à celui du Niclosamide.

La figure suivante schématise les échanges moléculaires entre les deux formes du Niclosamide en fonction du pH.



## ANNEXE 2

### Composition du milieu de culture (GREENBLATT et SCHIFF, 1959)

Pour la culture des euglènes, nous utilisons un milieu organotrophique contenant tous les éléments nécessaires au développement de la cellule. Il comprend deux fractions : une fraction organique et une fraction minérale.

Fraction organique		Fraction minérale	
acide malique	0,4 g	MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	12 g
acide glutamique	1 g	CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	0,9 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,04 g	FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,08 g	BO <sub>3</sub> H	0,2 g
vitamine B <sub>1</sub>	3 mg	EDTA Na <sub>2</sub>	0,5 g
vitamine B <sub>12</sub>	13 µg	ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,3 g
H <sub>2</sub> O	qsp 100 ml	MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	0,1 g
		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 ml
		H <sub>2</sub> O	qsp 1 l

Les vitamines sont conservées à +4°C. Elles sont à l'état de solutions concentrées, stérilisées par filtration sur une membrane de 0,22 µm.

Pour le milieu de culture des euglènes, nous ajoutons 2 ml de la fraction minérale à 98 ml de la fraction organique, puis nous diluons le milieu obtenu de moitié. Nous obtenons un milieu une fois concentré à pH 3,5.

## TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION . . . . .	7
LES MOLLUSCICIDES ET LES MÉTHODES D'ÉTUDE . . . . .	9
I.    Pourquoi les molluscicides sont-ils utilisés dans la lutte contre les parasitoses ? . . . . .	9
A.    Parasitoses concernées . . . . .	10
B.    La lutte contre ces parasitoses . . . . .	11
II.   Sélection des molluscicides . . . . .	11
A.    Existe-t-il un molluscicide idéal ? . . . . .	11
B.    Sélection des produits . . . . .	12
C.    Essais sur le terrain . . . . .	12
III.  Caractéristiques des molluscicides . . . . .	13
A.    Principaux groupes de molluscicides . . . . .	13
B.    Molluscicides d'origine végétale . . . . .	15
IV.  Résistance aux molluscicides . . . . .	16
V.    Impact des molluscicides sur l'environnement . . . . .	17
A.    Impact sur les Poissons . . . . .	18
B.    Impact sur les Crustacés . . . . .	18
C.    Impact sur les Algues d'eau douce . . . . .	19
 <i>Euglena gracilis</i> . . . . .	 21
I.    Raisons du choix . . . . .	21
A.    La productivité des océans . . . . .	22
B.    Les algues et la pollution . . . . .	22
1.    Les "explosions" de population . . . . .	22
2.    L'auto-épuration du milieu marin . . . . .	23
II.   Présentation d' <i>Euglena gracilis</i> . . . . .	23
A.    Classification d' <i>E. gracilis</i> . . . . .	23
B.    Structure d'une Euglène . . . . .	24
1.    La pellicule ou paroi . . . . .	24
2.    Le noyau . . . . .	24
3.    La cinétide . . . . .	25

4.	Les constituants cytoplasmiques . . . . .	25
a.	Les plastes . . . . .	25
b.	Les annexes plastidiales. . . . .	26
c.	Autres constituants . . . . .	26
C.	Biologie et écologie . . . . .	27
1.	Déplacements . . . . .	27
2.	Reproduction asexuée . . . . .	27
3.	Nutrition . . . . .	27
4.	Remarque . . . . .	28
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES . . . . .</b>		<b>29</b>
I.	Matériel biologique . . . . .	29
A.	Origine et entretien de la souche . . . . .	29
B.	Cinétique de la croissance . . . . .	30
II.	Produit chimique . . . . .	31
III.	Protocole d'étude . . . . .	32
IV.	Méthodologie . . . . .	34
A.	Préparation du milieu de maintenance . . . . .	34
B.	Préparation du milieu témoin et du milieu toxique . . . . .	34
1.	Milieu témoin . . . . .	34
2.	Milieu toxique . . . . .	35
C.	Répartition du milieu dans les différents flacons . . . . .	36
D.	Ensemencement des Euglènes . . . . .	36
E.	Méthode de comptage . . . . .	36
F.	Dosage spectrophotométrique des solutions toxiques . . . . .	37
V.	Tests statistiques . . . . .	40
A.	Calcul de la courbe de croissance de l'Euglène . . . . .	40
B.	Analyse de variance à deux facteurs . . . . .	41
<b>RÉSULTATS . . . . .</b>		<b>44</b>
I.	Données qualitatives. . . . .	44
A.	Cellules vivantes . . . . .	44
B.	Cellules mortes . . . . .	45
II.	Données quantitatives . . . . .	45





A.	Témoins . . . . .	45
1.	Action du PEG 400 . . . . .	45
2.	Croissance des euglènes témoins . . . . .	47
B.	Euglènes soumises au toxique . . . . .	48
III.	Etude statistique. . . . .	49
A.	Influence de la dose (Fdose) . . . . .	49
1.	Par rapport à celle du temps de culture (Fheure) . . . . .	49
2.	Par rapport à la semaine de repiquage (Fsemaine) . . . . .	50
B.	Influence de Fsemaine/dose par rapport à Fheure . . . . .	50
C.	Influence du protocole de repiquage . . . . .	51
1.	Comparaison entre C <sub>2</sub> et C <sub>5</sub> . . . . .	51
2.	Comparaison entre C <sub>3</sub> et . . . . .	52
a.	C <sub>6</sub> . . . . .	52
b.	C <sub>6</sub> et C <sub>8</sub> . . . . .	52
3.	Comparaison entre C <sub>4</sub> et . . . . .	53
a.	C <sub>7</sub> . . . . .	53
b.	C <sub>7</sub> et C <sub>9</sub> . . . . .	53
4.	Comparaison entre C <sub>4</sub> et C <sub>10</sub> . . . . .	54
	COMMENTAIRES. . . . .	55
I.	Synthèse des résultats . . . . .	55
II.	Interprétation des résultats. . . . .	56
A.	Influence de Fdose, Fheure et Fsemaine . . . . .	56
B.	Influence du protocole de repiquage . . . . .	57
C.	Remarque . . . . .	58
III.	Discussion. . . . .	58
	RESUME ET CONCLUSIONS . . . . .	60
	BIBLIOGRAPHIE . . . . .	62
	ANNEXES . . . . .	67



Titre : EFFET DE L'ACTION PROLONGÉE DU 2-BENZAMIDO-5-NITROTHIAZOLE SUR LA CROISSANCE D'*Euglena gracilis* Klebs. par Christine TARDIEU-FRANQUES.

Le but de notre étude est de mettre en évidence une éventuelle modification dans la croissance d'une algue unicellulaire : *E. gracilis*.

Ces expériences ont été effectuées en cultivant les euglènes en présence de concentrations sublétales de 2-benzamido-5-nitrothiazole. Des repiquages ont été effectués chaque semaine à partir des cultures soumises au toxique de deux manières différentes : soit à la même dose, soit à une dose plus élevée mais appartenant à la même gamme de concentrations.

Les euglènes cultivées à une dose donnée et repiquées dans les mêmes conditions ne présentent pas de modification significative de leur croissance.

Les cultures effectuées initialement à une concentration égale à  $17,4 \mu\text{mol.l}^{-1}$  et repiquées la semaine suivante à une dose supérieure ne présentent généralement pas de différence significative dans leur croissance lorsque la dernière dose utilisée est inférieure à  $43,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Par contre, lorsque les cellules sont cultivées et repiquées en utilisant une concentration égale à  $43,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  comme dernière dose, on constate une modification significative dans la croissance des euglènes.

Cette dernière donnée suggère que les algues pourraient développer une certaine résistance au produit.

Mots clés : Ecotoxicologie, *Euglena gracilis*, Molluscicide, Pollution.