

UNIVERSITÉ DE LIMOGES



FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1994

Thèse n° 38

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 7 Juillet 1994

par

Valérie FIALIP

née le 8 avril 1969 à Brive (Corrèze)

**ÉTUDE DE LA TOXICITÉ *in vitro* ET DES CONSÉQUENCES
HISTOPATHOLOGIQUES INDUITES PAR TROIS DÉRIVÉS DU
2-BENZAMIDO-5-NITROTHIAZOLE SUR *Gammarus pulex pulex* L.**

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Monsieur NICOLAS, Professeur Président
Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences Juge
Monsieur RONDELAUD, Maître de Conférences Juge
Monsieur VIGNOLES, Maître de Conférences Juge
Monsieur VINCENT, Maître de Conférences Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

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

- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur **GHESTEM**

Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences

Personnel enseignant :

*** PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

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

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

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 vous remercions pour votre accueil
dans votre laboratoire et pour votre aide
à de nombreuses reprises*

A nos Juges

Monsieur le Docteur D. RONDELAUD,
Maître de Conférences,

Service d'Histologie,
Faculté de Médecine,

Monsieur le Docteur Ph. VIGNOLES,
Maître de Conférences,

Service de Biophysique-Informatique,
Faculté de Pharmacie.

Monsieur le Dr. M. VINCENT,
Maître de Conférences,

Service de Biologie Animale,
Faculté des Sciences de Limoges.

Chargé de cours à la Faculté
de Pharmacie de Limoges.

*Nous vous sommes très reconnaissante
d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Nous vous remercions pour votre aide,
vos conseils et vos critiques tout au long
de la réalisation pratique de ce mémoire.*

A ma famille et mes amis.

INTRODUCTION

Plusieurs pesticides ont été proposés dans la littérature pour lutter contre la propagation de certaines trématodoses qui affectent l'homme et l'animal. Le développement de ces parasites nécessite le passage par un ou plusieurs hôtes intermédiaires. La lutte contre ces maladies consistera donc à interrompre le cycle parasitaire à ce stade intermédiaire par la destruction de l'organisme vecteur. La plupart des hôtes intermédiaires sont des mollusques et leur contrôle peut se faire avec l'emploi de molluscicides (McCULLOUGH *et al.*, 1981).

Or l'emploi de pesticides peut présenter un danger pour le milieu environnant. C'est pourquoi ces produits doivent faire l'objet d'études toxicologiques afin d'éliminer tout risque de pollution. Des essais de toxicité sont donc réalisés sur des organismes représentatifs de la faune et de la flore. Les critères de sélection de ces organismes reposent sur leur capacité à être à la fois une bonne espèce-test et un bon indicateur de pollution.

Dans le cas présent, nous nous intéresserons uniquement à l'impact de quelques produits sur une espèce animale représentative des eaux douces : *Gammarus pulex pulex*, plus communément appelé gammare. Notre objectif est double :

- dans un premier temps, nous nous proposons de déterminer la toxicité de trois nouveaux molluscicides, dérivés du 2-benzamido 5-nitrothiazole, sur *G. p. pulex*. Cette étude se fera par le calcul des concentrations létales qui tuent 50 % des animaux (CL₅₀).
- dans un deuxième temps, nous étudierons l'impact de ces trois produits à dose sublétales sur les différents tissus de *G. p. pulex*.

Le plan adopté est le suivant :

- Le premier chapitre est consacré à des rappels généraux sur les différents essais de toxicité, les espèces cibles comme le gammare et le comportement de ces derniers en présence de molluscicide.
- Le deuxième chapitre concerne l'expérimentation réalisée au laboratoire et décrit le matériel et les méthodes utilisés.
- Le troisième chapitre traite des résultats obtenus avec chaque produit au niveau toxicologique et au niveau histologique.
- Le quatrième chapitre comprend une discussion des résultats obtenus.

RAPPELS GENERAUX

Ce chapitre est une synthèse bibliographique. Nous y avons d'abord indiqué les raisons pour lesquelles il est nécessaire de tester de nouveaux produits. Les différents tests de toxicité utilisés et les espèces animales qui sont employées lors de ces essais sont précisés dans un deuxième temps. Un dernier paragraphe sera consacré au comportement des gammarès en présence de pesticides.

I. - LES ESSAIS DE TOXICITE SUR UNE ESPECE CIBLE.

Les données présentées dans ce paragraphe proviennent de l'analyse de plusieurs documents : VINCENT (1971); REBIERE (1985); RENAUDIN (1987); VIGNOLES (1990); LAJUGIE (1992); LECLERC et DIVE (1982).

A. POURQUOI FAUT-IL EVALUER DE NOUVEAUX PRODUITS ?

L'utilisation de molluscicides pour lutter contre certaines maladies parasitaires telles que la bilharziose et la distomatose peut aboutir à une pollution du milieu environnant.

En effet, le manque de sélectivité de ces produits peut entraîner un phénomène de toxicité immédiate pour la faune et la flore aquatiques, ce qui peut provoquer à long terme une modification dans la répartition des différentes espèces en raison de leur plus ou moins grande résistance au toxique.

De plus, la possible accumulation de ces substances dans les chaînes trophiques peut aboutir à la destruction de tout un écosystème. C'est pourquoi il est nécessaire de tester de nouveaux produits afin de découvrir la molécule qui a la toxicité la plus sélective et qui présente une rémanence de courte durée dans le milieu.

GAYRAL et CAVIER (1977), LEVEQUE (1990) ont établi un ensemble de critères pour la sélection des meilleurs molluscicides. Ces paramètres sont :

- le produit doit être totalement efficace vis-à-vis de l'espèce cible.
- il ne doit pas être toxique pour l'homme et pour les Vertébrés supérieurs.
- son prix de revient doit être attractif et son utilisation aisée dans les conditions opérationnelles.
- les produits de dégradation doivent être non toxiques et de faible rémanence pour éviter leur accumulation dans les chaînes trophiques.
- le produit doit être le moins toxique possible vis-à-vis de la faune et de la flore associées.
- il ne doit pas induire, à long terme, un déséquilibre des écosystèmes dans les conditions normales d'application.

B. QUE FAUT-IL UTILISER COMME ESPECE-CIBLE ?

Une espèce est considérée comme espèce-cible si les organismes qui la représentent sont à la fois de bons indicateurs de pollution et de bons animaux-tests.

Un bon indicateur de pollution est un stade intermédiaire entre les espèces tolérantes qui seront peu affectées par le toxique, et les espèces non tolérantes qui disparaîtront ou bien qui seront présentes en si petit nombre que leur cycle de vie ne pourra pas être étudié.

Un bon animal-test doit répondre à certains critères de sélection qui sont :

- ubiquité.
- être représentatif de la faune locale.
- de maniement facile
- à cycle de vie court.
- (donc de petite taille).
- présents en grande quantité.
- d'élevage aisé.
- disponible toute l'année.

Tous ces impératifs sont nécessaires pour obtenir une sensibilité et un comportement constants des populations soumises à l'essai afin d'avoir des résultats cohérents qui garantissent une bonne reproductibilité.

Les principales espèces cibles utilisées sont :

- les bactéries,
- les algues comme *Scenedesmus subspicatus*,
- les Protozoaires comme *Colpidium campylum*,
- les Rotifères comme *Philodina acuticarnis*,
- les Plathelminthes comme *Polycelis felina*,
- les Némathelminthes,
- les Polychètes comme *Nereis caudata*,
- les Mollusques comme les limnées,
- les Crustacés comme *Daphnia magna*
- les larves d'Insectes (Ephéméroptères, Plécoptères, Trichoptères, Diptères).
- les Poissons comme *Brachydanio rerio*.

Ces différentes espèces présentent des avantages car elles nécessitent peu de place pour leur stabulation. De plus, leur manipulation s'effectue avec un appareillage peu coûteux et des volumes restreints d'eau.

C. COMMENT PROCEDE-T-ON AUX ESSAIS ?

1. LES DIFFERENTS TYPES :

On distingue les essais réalisés sous des conditions contrôlées et ceux qui sont effectués dans le milieu naturel.

a) Au laboratoire :

On en distingue deux types :

- Les essais statiques. Les animaux sont placés dans des récipients contenant la solution de toxique. Cette dernière n'est pas renouvelée pendant toute l'expérience. Ce premier type permet de déterminer l'incidence de divers facteurs sur le degré de résistance des organismes étudiés.

Ces tests se rapprochent davantage de la réalité car les concentrations des polluants éventuels déclinent dans les eaux naturelles comme le font les concentrations dans les tests statiques (FERGUSSON *et al.*, 1965).

- Les essais dynamiques. Le milieu expérimental est renouvelé en permanence par un flux continu, ce qui permet de maintenir constante la teneur en toxique dans le milieu.

Ils sont simples et rapides tout en étant facilement reproductibles et de bonne fiabilité. On peut apprécier la toxicité aiguë d'un produit. Cependant, ils donnent peu d'indication sur les conséquences à long terme.

b) Sur le terrain :

Les animaux sont placés dans des nasses ou dans des enceintes de divers types dont les dimensions dépendent de la taille des animaux. Ces dernières sont introduites dans l'eau polluée.

Cette méthode présente deux avantages. D'une part, elle permet d'apprécier la résistance des organismes testés dans les conditions variables d'un milieu (pH, température, nourriture, lumière) et, d'autre part, on peut quantifier sur place le type de pollution.

2. EXPRESSION DES RESULTATS :

Les résultats sont exprimés principalement sous forme de concentration létale 50 (CL₅₀) avec des temps de contact pouvant aller de 24 à 96 heures. La CL₅₀ est la concentration de toxique pour laquelle la mortalité des animaux est de 50 %. Elle s'exprime en g/l ou en mol/l.

D. COMMENT PEUT-ON RENOUVELER LES ESSAIS ?

1. PRINCIPE DE L'EXPERIENCE STANDARD :

Avant le début de l'expérimentation, il est nécessaire de bien définir le protocole opératoire et les critères de létalité. En effet, la technique doit être normalisée afin d'éliminer le plus possible les causes de variation qui peuvent intervenir dans les résultats.

Les résultats obtenus peuvent largement varier selon les conditions opératoires. L'absence de standardisation conduirait à l'impossibilité de comparer les résultats.

2. FACTEURS POUVANT INFLUENCER LES RESULTATS :

On peut distinguer deux types de facteurs, à savoir ceux qui sont propres au matériel animal et ceux qui relèvent du milieu environnant.

a) Facteurs propres au matériel animal :

Ils sont multiples.

- Origine des sujets : il est nécessaire d'utiliser des organismes qui proviennent du même lieu de récolte.
- Saison de récolte des animaux : il pourrait y avoir des différences de sensibilité en fonction de la saison.
- Age : les formes jeunes présentent une plus grande sensibilité aux toxiques.
- Sexe : il est préférable d'utiliser des individus de même sexe.
- Etat physiologique : les organismes en période de mue sont plus sensibles lorsqu'ils présentent une croissance avec ce processus.
- Temps d'acclimatation : avant chaque expérience, il est indispensable de respecter une période d'acclimatation afin que les animaux puissent s'habituer aux conditions expérimentales, notamment à la température du milieu.

b) Facteurs propres au milieu environnant :

Il s'agit de :

- la température de l'eau : le plus souvent, la vitesse de l'intoxication augmente avec la température.
- la luminosité : il est nécessaire de débiter chaque série d'expérience à la même heure afin d'avoir le même temps d'éclairement.
- la teneur en oxygène de l'eau : la résistance des animaux s'accroît dans certains cas lorsque le milieu est bien oxygéné.
- le pH de l'eau : il peut entraîner une modification de la structure moléculaire du toxique.

- l'absence de nourriture : durant l'expérience, les animaux ne sont pas nourris afin d'éviter une fixation des toxiques sur les végétaux.

II. - LE GAMMARE, ESPECE CIBLE.

Les données présentées dans ce paragraphe proviennent des mêmes sources précitées auxquelles il faut ajouter l'ouvrage de GRASSE *et al.* (1970).

A. LES DIFFERENTES ESPECES DULCAQUICOLES.

Le gammare aussi appelé "crevette d'eau douce " est un petit Crustacé de 12 à 20 mm de long, assez commun dans les ruisseaux et les mares. Il entre dans l'alimentation des poissons carnivores de nos cours d'eau. Il est responsable, par ses pigments caroténoïdes, de la pigmentation de la chair chez les truites sauvages.

Il existe également des espèces marines mais nous nous intéressons ici exclusivement aux espèces dulçaquicoles et, plus particulièrement, à *G. p. pulex*.

Deux auteurs, SCHELLENBERG (1925) et PACAUD (1945) admettent dans l'espèce *G. pulex*, l'existence de deux sous-espèces. Il s'agit de :

- *G. (Rivulogammarus) pulex fossarum* Kock 1835,
- *G. (Rivulogammarus) pulex pulex* Linné 1758.

Cependant, ROUX (1967) montre que ces deux sous-espèces doivent être séparées et élevées au rang d'espèce dans le sens morphologique et génétique du terme. Ainsi, l'auteur distingue *G. (Rivulogammarus) fossarum* et *G. (Rivulogammarus) pulex pulex*. Il conserve pour cette dernière espèce, la dénomination de *pulex pulex* afin de la distinguer d'une autre sous-espèce : *G. (Rivulogammarus) pulex gallicus* Karaman 1931. Celle-ci est localisée dans la région méditerranéenne et diffère morphologiquement de *G. pulex pulex* bien qu'elle puisse se croiser avec elle.

La forme rencontrée dans notre région correspond à *G. p. pulex* Linné. Elle est caractérisée par ses antennes A 2 et ses uropodes III.

Dans les ruisseaux du Sud-Ouest, *G. p. pulex* cohabite fréquemment avec une autre espèce de gammares : *Echinogammarus berilloni catta*. Toutefois, il est assez facile de

différencier ces deux espèces en raison de l'abdomen qui est garni de soies raides en bouquets chez *Echinogammarus*, et de sa couleur d'un brun verdâtre.

B. *Gammarus pulex pulex* :

1. POSITION SYSTEMATIQUE :

- Embranchement : *Arthropoda*,
- Classe : *Crustacea*,
- Super-ordre : *Malacostracea*,
- Ordre : *Peracarida*,
- Famille : *Gammaridae*,
- Genre : *Gammarus*,
- Espèce : *pulex* Linné 1758.

2. MORPHOLOGIE GENERALE.

Les gammares ont un corps marron, aplati latéralement. Ils présentent¹ :

- une région céphalique ou tête qui porte les yeux, les antennules A1, les antennes A2, les pièces buccales.
- un mésosome formé de sept segments portant chacun une paire de péréiopodes.
- un métasome formé de trois segments portant chacun une paire de pléopodes.
- un urosome constitué de trois segments pourvus chacun d'une paire d'uropodes.

L'urosome se termine par le telson, très court (figure 1, page suivante).

Parmi les péréiopodes, les paires 1, 2, 3 et 4 sont dirigées en avant et sont utilisées pour la préhension. Les paires 5, 6 et 7, orientées vers l'arrière, sont locomotrices. Les péréiopodes ont un coxopodite dilaté extérieurement en une plaque coxale qui continue le corps sur le côté et lui donne un aspect comprimé. Les six dernières paires de péréiopodes portent, sur la face interne des coxopodites, des épipodites branchiaux vésiculeux ou lamelleux.

¹ - La figure 1 présente des schémas de *Gammarus marinus*. L'espèce est certes différente de *G. p. pulex* mais nous avons conservé ces dessins pour illustrer la morphologie générale d'un gammare.

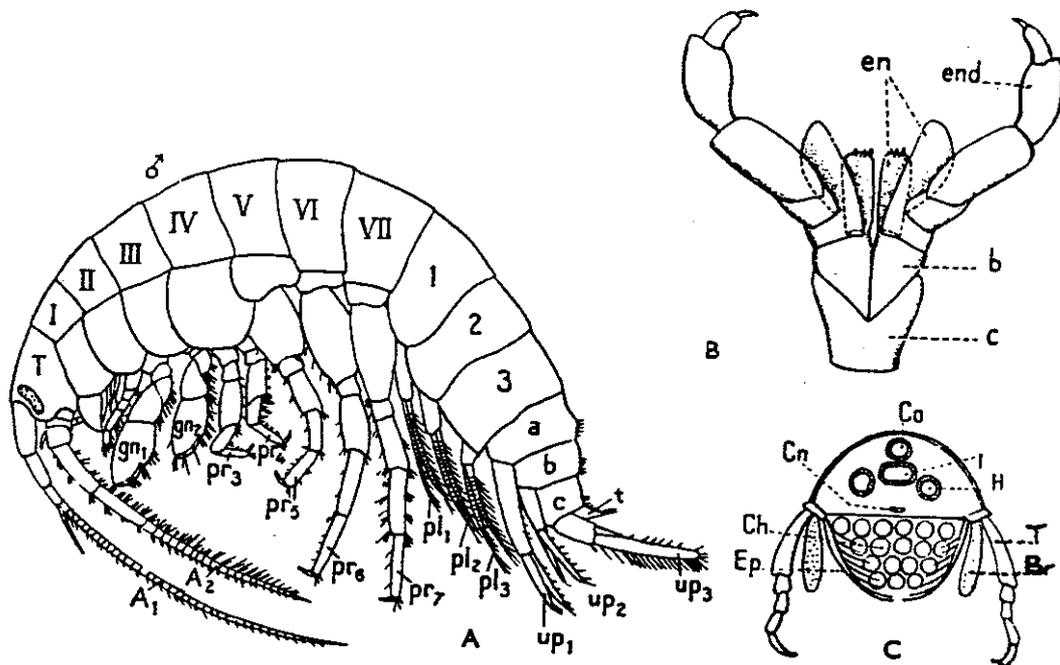


Figure 1.
Morphologie générale d'un Amphipode.
(d'après GRASSE *et al.*, 1970).

- A, *Gammarus marinus* : A_1 , antenne supérieure; A_2 , antenne inférieure
Mésosome: I à VII; gn_1 , gn_2 , gnathopodes; pr_3 , pr_4 , pr_5 , pr_6 , pr_7 , péréiopodes; 1 à 3, métrasome;
 pl_1 , pl_2 , pl_3 , pleopodes; a à c, urosome; up_1 , up_2 , up_3 , uropodes; t, telson; T, tête.
- B, maxillipèdes de *Gammarus*; en, lobes internes et externes;
end, endopodite (palpe); b, basis; c, coxa.
- C, coupe transversale du thorax d'un Amphipode. Br, branchie; Ch, chambre incubatrice
pleine d'oeufs; Cn, chaîne nerveuse; Co, coeur; Ep, dépendances des appendices thoraciques
formant la chambre incubatrice (oostégites); H, caecum hépatique; I, intestin; T, patte thoracique

Les pléopodes sont natatoires, en perpétuel mouvement ce qui réalise une circulation d'eau autour des lobes branchiaux situés à la base des péréiopodes.

L'urosome constitue un battant natatoire qui permet à l'amphipode de se déplacer par saccades.

L'antennule A1 est constituée d'un pédoncule de trois segments, d'un flagelle principal et d'un flagelle accessoire. L'antenne A2 est constituée d'un pédoncule à cinq articles et d'un flagelle (figure 1).

3. CARACTERES PROPRES A *G. p. pulex*.

Cette espèce se distingue par :

- les antennes A2 dont le cinquième article du pédoncule est égal ou inférieur au quatrième. Les soies portées par ces deux articles sont groupées en trois ou quatre points. Le flagelle est formé d'articles proximaux courts et d'articles distaux nettement plus allongés chez le mâle : les soies portées par les flagelles forment une brosse dense.
- l'uropode III, caractérisé par la valeur du rapport entre la longueur de l'endopodite et celle du premier article de l'exopodite. WAUTIER et ROUX (in VINCENT, 1971) ont montré que ce rapport est égal à $0,75 \pm 0,09$. Ce critère est l'un des plus sûrs et des plus faciles à vérifier pour caractériser *G. p. pulex*.

4. DONNEES BIOLOGIQUES :

C'est une espèce ubiquiste. On la trouve partout dans le Centre-ouest de la France aussi bien sur des sols cristallins que dans des zones sédimentaires.

Elle s'adapte aux conditions les plus défavorables : en effet, on peut le trouver dans les eaux les plus pauvres en sels (de 7 à 15 mg/l d'ions calcium en solution dans le département de la Haute-Vienne) et dans les zones climatiques les plus froides en hiver.

On rencontre ce gammare en forte densité dans les ruisseaux peu profonds, de courant modéré et riche en végétaux. Ce sont des détritivores, des phytophages et des carnivores.

Leur cycle vital s'étale sur deux années, la durée de vie moyenne ne dépassant pas un an. Ils se reproduisent même en hiver mais à un rythme plus lent. Ils sont matures en trois

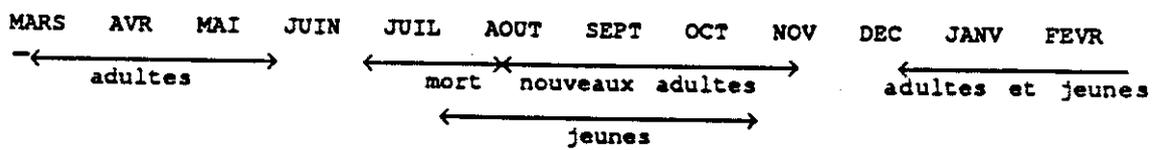


Figure 2.
 Cycle de développement normal de *G. p. pulex*
 (d'après LAJUGIE, 1992).

à quatre mois en été et sept mois en hiver. Le cycle d'évolution normal de *G. p. pulex*, établi par HOBROUGH (1973), est présenté sur la figure 2.

C. MAINTENANCE AU LABORATOIRE :

Les gammares sont répartis dans des bacs de quarante litres sous une faible épaisseur d'eau (10 cm). Ces bacs sont stockés dans une pièce maintenue en permanence à 18°C. Cette pièce est munie d'un programmeur avec un éclairage de 12 heures diurnes. L'eau des bacs est oxygénée à l'aide d'un bulleur. Les animaux sont nourris de feuilles mortes et de cresson.

L'eau des bacs est changée tous les trois jours : un tiers de l'eau précédente est gardée à laquelle on rajoute de l'eau du ruisseau d'origine (à 100 mg/l d'ions calcium en solution) diluée de moitié par une eau oligocalcique limousine (à 15 mg/l d'ions calcium). Cette dilution est nécessaire car les ions calcium, qui sont présents en grande quantité dans l'eau d'origine, pourraient précipiter sous forme de cristaux de carbonates de calcium et se déposer à la surface des gammares, diminuant de ce fait leur capacité respiratoire.

Chaque jour, les animaux morts sont éliminés pour éviter une pollution de l'eau.

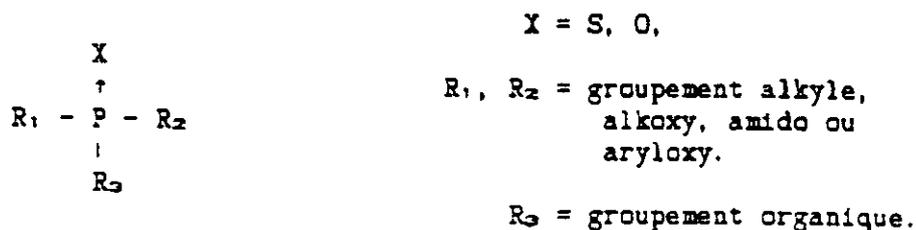
Avant de commencer les expériences, il est nécessaire de respecter un délai de quinze jours correspondant à l'acclimatation des gammares aux conditions du laboratoire.

III. - LE COMPORTEMENT DU GAMMARE EN PRESENCE DE PESTICIDES.

A. EN PRESENCE D'ORGANOPHOSPHORES :

Les organophosphorés sont parmi les insecticides de synthèse les plus toxiques et les plus utilisés.

Leur formule chimique est la suivante :



Ils agissent en inhibant la dégradation de l'acétylcholine.

Ils sont très toxiques pour les gammars, notamment le méthyl-parathion pour lequel la CL_{50} est de 46 nmol/l au bout de 96 heures (RENAUDIN, 1987).

Lorsqu'ils sont placés dans des solutions de méthyl-parathion (entre 38 et 190 nmol/l), les gammars changent de comportement. Ils se déplacent d'abord très rapidement puis les déplacements vont se raréfiant, la mobilité de leurs pattes diminue et on observe une augmentation des excréments.

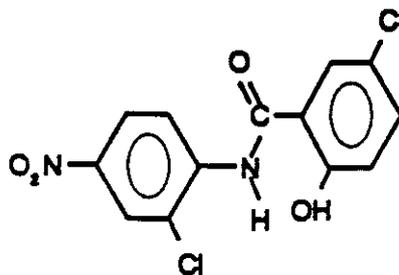
La toxicité augmente avec la concentration du méthyl-parathion. A la dose de 215 nmol/l, 50 % des animaux sont décimés en 24 heures. Le tableau suivant montre que la CL_{50} est à peu près inversement proportionnelle au temps d'exposition (RENAUDIN, 1987).

Temps d'exposition (h)	24	48	72	96
CL_{50} (nmol/l)	215	85	67	46

B. EN PRESENCE DE NICLOSAMIDE :

A l'heure actuelle, c'est un des molluscicides les plus utilisés, en particulier dans la lutte contre la bilharziose.

C'est un dérivé du salicylanide. Sa formule est la suivante :



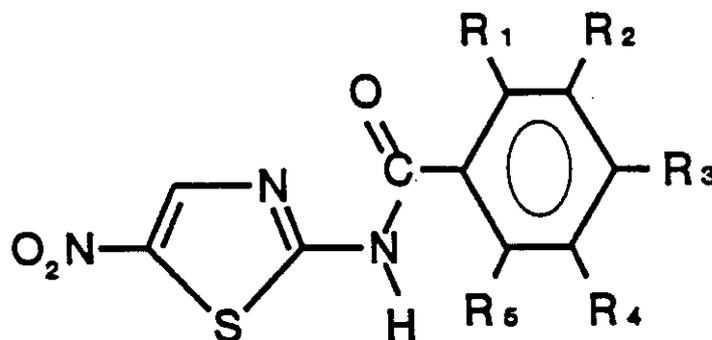
Il agit en inhibant la synthèse d'ATP. Il possède une toxicité moyenne pour le gammare. Les valeurs de la CL₅₀ sont présentées dans le tableau ci-dessous (LAJUGIE 1992) et l'on constate qu'au bout de 96 heures d'exposition, elle s'élève à 1,49 µmol/l.

Temps d'exposition (h)	24	48	72	96
CL ₅₀ (µmol/l)	4,65	3,21	2,06	1,49

C. EN PRESENCE DU BNT ET DE SES DERIVES HALOGENES :

Ces produits ne sont pas encore commercialisés. En effet, leur efficacité sur le terrain en tant que molluscicide et les conséquences à long terme de leur emploi n'ont pas encore été déterminés.

Leur formule chimique est la suivante :



Leur mode d'action n'est pas encore connu. DEBORD (1988) émet l'hypothèse qu'il est similaire à celui du Niclosamide avec une action sur la synthèse de l'ATP.

Des études expérimentales ont démontré que ces produits avaient une activité molluscicide et antiparasitaire (CAVIER *et al.*, 1978; MADULO-LEBLOND *et al.*, 1981) mais qu'ils ne semblaient pas avoir de spécificité. Les produits les plus actifs ne sont pas forcément les plus toxiques pour la faune associée et c'est notamment le cas du 3,4-dichloro-BNT (CAVIER *et al.*, 1978).

La létalité de ces produits sur les gammarès augmente avec le temps d'exposition. Toutefois les produits les plus actifs à la 96^e heure d'exposition ne sont pas forcément les plus toxiques à la 24^e heure (exemple du 2,5-dichloro-BNT). L'exposition des gammarès à de faibles concentrations de BNT se traduit par une diminution dans l'amplitude des déplacements (LAJUGIE, 1992).

Les études de VIGNOLES (1990) et LAJUGIE (1992) ont montré que les produits les plus efficaces ont un substituant halogéné en position *mé*ta et qu'ils sont généralement bisubstitués. L'activité molluscicide du BNT est voisine de celle du Niclosamide, produit considéré comme la substance de référence.

MATERIEL ET METHODES

Ce chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisées au cours de cette étude.

I. - MATERIEL ANIMAL : *Gammarus pulex pulex*

La population de gammares provient du ruisseau de la Charraud, affluent de la Charente. Cette station est située à 500 mètres en amont du village de Torsac, département de la Charente, à 110 mètres d'altitude. Une photographie est présentée sur la page suivante.

La récolte des gammares s'effectue à l'aide d'un filet troubleau disposé à contre-courant. On racle le fond du ruisseau afin de chasser les gammares cachés sous les pierres ou sous les végétaux. Un premier tri est effectué au niveau de la récolte afin d'éliminer les végétaux, les pierres, les mollusques ou les poissons.

Les Crustacés sont ensuite répartis dans des bocaux de deux litres à raison de 150 gammares environ par bocal. Quelques brins de cresson sont ajoutés pour servir de support aux animaux lors du voyage. Chaque récipient est complètement rempli d'eau afin de diminuer l'agitation de l'eau dans le bocal et de limiter les chocs pour les gammares. Les bocaux sont alors placés dans des caissons isothermes permettant ainsi de maintenir les animaux à une température constante.



Planche A.
Vue générale du ruisseau de la Charraud,
à Torsac, département de la Charente.
La flèche indique l'endroit exact où les gammares ont été récoltés.

Il est nécessaire de respecter une durée d'acclimatation de 15 jours avant de commencer les expériences. Après ce délai, un autre tri des survivants sera fait selon les critères suivants :

- l'espèce : *G. p. pulex* peut être confondu avec *Echinogammarus berilloni catta* qui est également présent dans le ruisseau. La distinction entre ces deux espèces est assez aisée en raison de nombreux bouquets de soies sur le métasome et l'urosome d'*E. b. catta*.

- le sexe : nous avons décidé de sélectionner uniquement des mâles afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux des études précédentes.

- la taille : les animaux mesurent 15 à 20 mm afin d'avoir une population la plus homogène possible.

- l'état physiologique : les gammares ne doivent pas être parasités par des Vers. Si ces derniers sont présents, ils se voient facilement à travers le tégument sur la partie dorsale de l'animal.

II. - PRODUITS UTILISES :

Il s'agit de trois dérivés du 2-benzamido-5-nitrothiazole (BNT) : le 3-chloro-BNT, le 4-bromo-BNT et le 2,6-difluoro-BNT.

La formule de ces produits est présentée sur la figure 3.

Ces produits sont synthétisés dans le Laboratoire de M. le Prof. DEMERSEMAN, Institut Curie de Paris².

Ils se présentent sous forme d'une poudre jaunâtre, très peu soluble en milieu aqueux, plus soluble en présence d'un solvant organique. Cette différence de solubilité explique pourquoi les solutions mères sont préparées dans du polyéthylène glycol 400 (PEG 400). Ce dernier est un solvant organique liquide assez visqueux mais il n'est pas toxique pour les gammares (VIGNOLES, 1990).

Pour chaque essai, on utilise une gamme de concentrations qui va de 0,005 à 1 mg/l pour le 3-chloro-BNT et le 4-bromo-BNT, et de 0,01 à 4,5 mg/l pour le 2,6-difluoro-BNT.

² - Ces produits ont été mis à notre disposition par M. le Professeur PENICAUT, Laboratoire de Chimie Analytique à la Faculté de Pharmacie de Limoges.

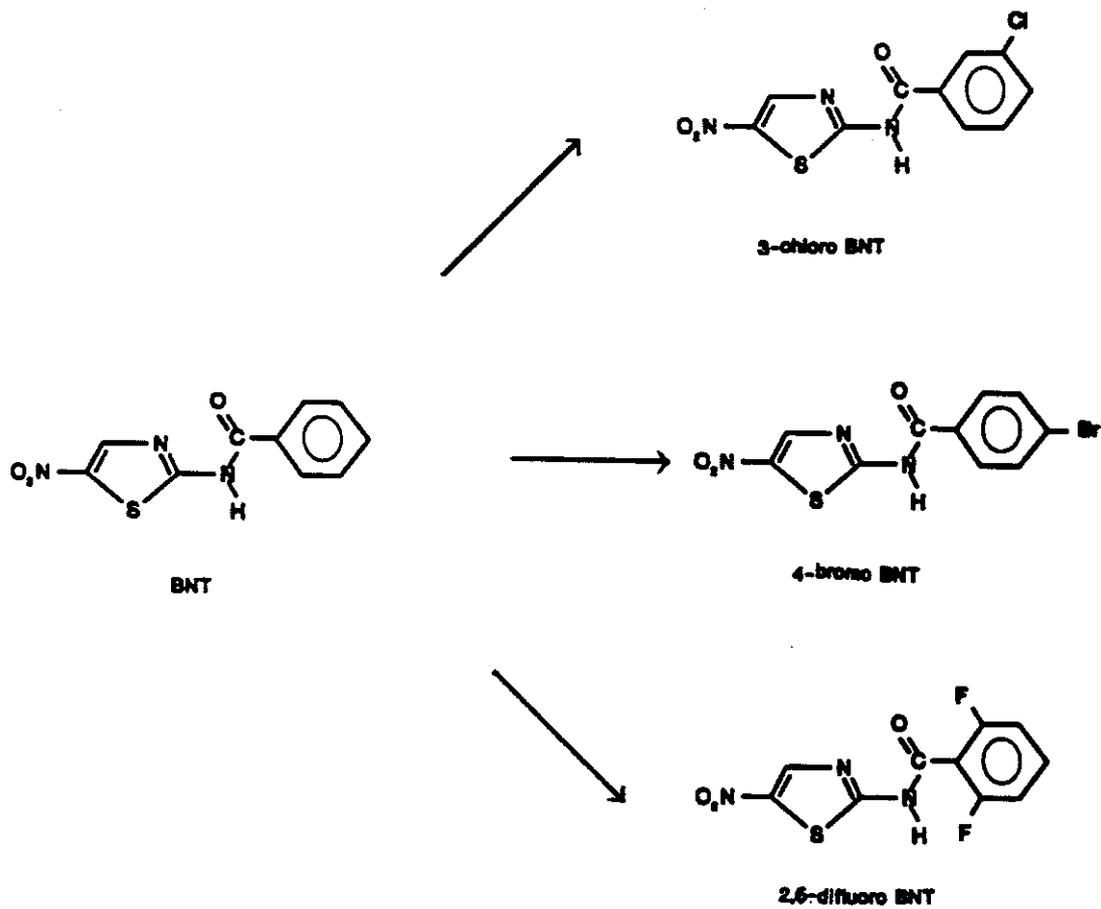


Figure 3.
La formule chimique du BNT et de ses trois dérivés.

III. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

Il diffère selon le type de l'expérience.

A. DETERMINATION DES CL₅₀ POUR CHAQUE PRODUIT.

Les animaux sélectionnés sont répartis dans des cristallisoirs à raison de 20 individus par récipient. Les gammares sont placés trois jours avant l'expérience dans un litre d'eau normale afin qu'ils s'acclimatent. Au 4^e jour, cette eau est remplacée par un litre de solution toxique.

Pour chaque produit, on utilise 12 concentrations différentes. Chaque dose est étudiée sur 40 gammares. Comme chaque cristallisoir ne peut contenir que vingt gammares sous peine d'une surmortalité, il nous faut donc deux récipients par concentration.

Des témoins ont été constitués à raison de 40 gammares répartis dans deux cristallisoirs. Ces derniers contiennent de l'eau du ruisseau. Ceci permet d'estimer la mortalité naturelle des animaux.

La durée de l'expérience est de 96 heures. Des relevés réguliers ont été réalisés deux fois par jour.

B. ETUDES HISTOPATHOLOGIQUES.

On utilise une concentration sublétale (CL₄₀) pour chaque produit, ce qui correspond à :

- 0,46 µmol/l pour le 3-chloro-BNT
- 0,73 µmol/l pour le 4-bromo-BNT
- 12,41 µmol/l pour le 2,6-difluoro-BNT.

Les animaux sont placés au contact des toxiques pendant 96 heures, ce qui correspond à une période de charge. Les survivants sont remis dans une eau non polluée pendant 14 jours (période de décharge).

Deux gammares sont prélevés pour chaque produit au 4^e et au 18^e jours d'expérience. Nous avons fixé des témoins pour chaque date.

IV. - METHODOLOGIE :

A. TECHNIQUE D'ELEVAGE DES GAMMARES :

La méthode a déjà été décrite par LAJUGIE (1992).

Pendant les trois jours d'acclimatation dans les cristallisoirs, les animaux sont nourris de feuilles mortes et de brins de cresson. Dans chaque récipient, sont rajoutés trois petites grilles en nylon de 3 cm² qui servent de support aux gammares pendant les expériences. L'oxygénation de l'eau est assurée par un bulleur.

Les récipients sont disposés sur une étagère munie d'un programmateur permettant d'avoir un éclairage artificiel de 12 heures diurnes. La température de la pièce est maintenue constante à 18°C par un conditionneur d'air.

B. PREPARATION DES SOLUTIONS :

La solution mère de toxique est obtenue en solubilisant 20 mg de produit dans 20 ml de PEG 400. Cette préparation est conservée à l'obscurité afin d'éviter une dégradation des produits à la lumière.

Les solutions à préparer le sont extemporanément par dilution de X ml de la solution mère (à 1 g/l) dans un certain volume d'eau du ruisseau pour obtenir deux litres de solution à la concentration désirée. Cette dernière est répartie par moitié dans les deux cristallisoirs comprenant vingt gammares chacun.

La figure 4 (page suivante) récapitule les différentes opérations.

C. EXPOSITION DES ANIMAUX AU TOXIQUE :

Les gammares sont plongés délicatement dans les solutions à étudier. Pendant les quatre jours qui suivent, on note à heures régulières le nombre de gammares survivants (toutes les 12 heures). Les morts sont éliminés afin d'éviter une pollution du milieu.

Durant l'expérimentation, les animaux ne sont pas nourris pour éviter une fixation du toxique sur les végétaux.

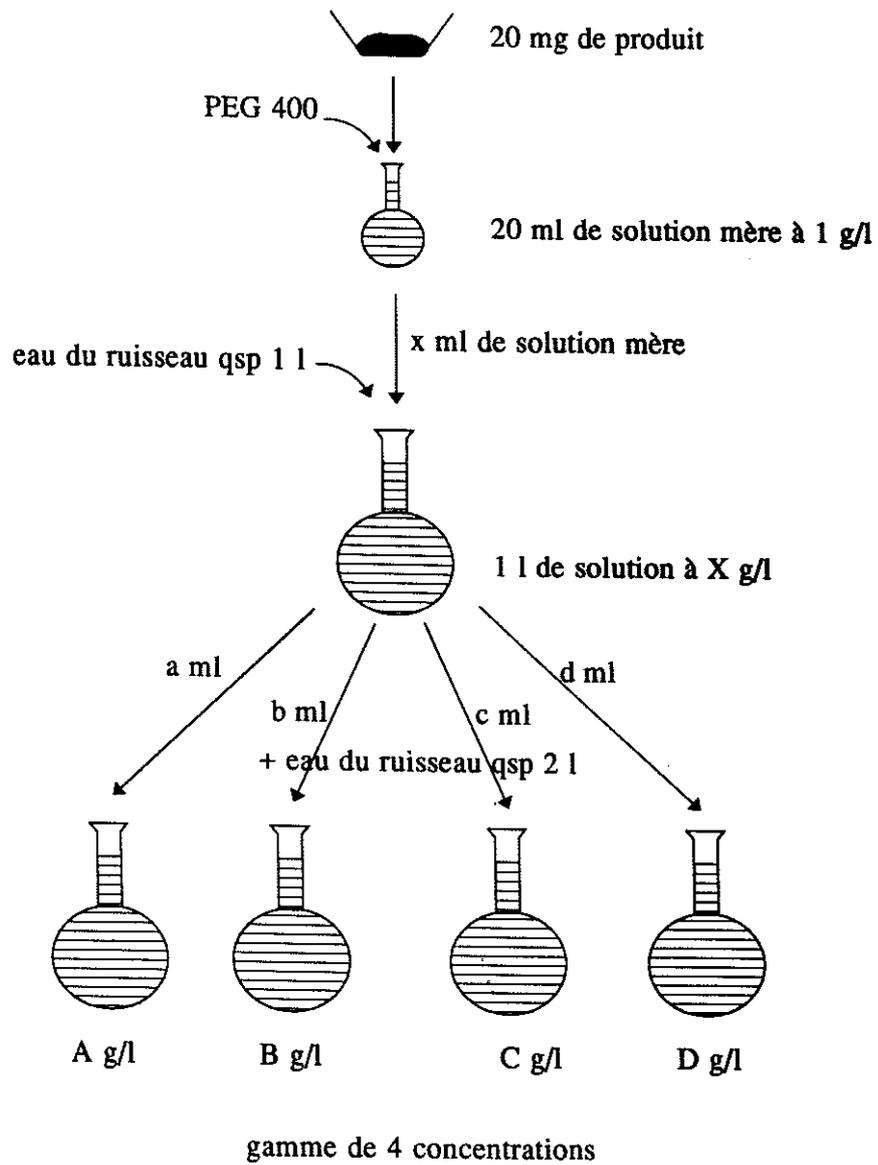


Figure 4.
Organigramme récapitulant les différentes étapes
pour la préparation des solutions.

D. SACRIFICE DES ANIMAUX :

Les gammares prélevés sont plongés dans le liquide fixateur de Bouin.

Les pattes sont alors enlevées par section de l'article qui les relie au corps. Il en est de même pour les antennes : dans ce cas, on les coupe à la moitié de leur longueur.

On tire sur la tête pour faire pénétrer le fixateur, mais sans l'enlever du corps. On fait de même pour le telson. Puis on réalise des incisions longitudinales dans la cuticule avec un scalpel.

Toutes ces opérations sont effectuées sous la loupe binoculaire. L'animal ainsi traité est mis dans un pilulier rempli d'un nouveau volume de fixateur. Sur le pilulier, on inscrit le nom du produit, la date de sacrifice et le nombre de jours d'expérience.

E. TECHNIQUE HISTOLOGIQUE :

Les gammares sont plongés dans du liquide de Bouin pendant trois à quatre jours. Les pièces sont ensuite déshydratées dans les bains suivants :

- éthanol à 70° Baumé (un bain de 24 heures),
- éthanol à 95° Baumé (deux bains de deux heures chacun),
- 2-méthyl-1-propanol (un bain de deux heures et un bain de douze heures).

Les animaux sont ensuite placés dans la cytoparaffine à 56-58° C (deux bains de deux heures avant d'être inclus dans un troisième bain. La cytoparaffine est liquide à 56-58° C et se solidifie à 20° C.

Des coupes semi-sériées, épaisses de 5 µm, sont réalisées à l'aide du microtome. Elles sont montées sur lame histologique à l'aide d'une solution aqueuse d'albumine.

Les coupes sont colorées par l'hématoxyline de Harris (colorant nucléaire) associée au trichrome de Gabe modifié (colorant de fond). Les changements sont les suivants :

- le vert FCF est remplacé par du vert lumière et sa concentration est augmentée à la concentration de 0,5g pour 100 ml de solution.
- l'azorubine S est supprimée.
- Les lames colorées sont montées avec du Depex. Cette résine se polymérise à l'air libre et remplace la lamelle classique.

V. - PARAMETRES DE TOXICITE :

La toxicité des trois produits est évaluée en déterminant le taux de mortalité et la concentration létale 50 (CL₅₀).

Le taux de mortalité correspond au nombre d'animaux qui sont morts au bout d'un temps donné t par rapport au nombre initial d'animaux.

La CL₅₀ correspond à la concentration de toxique qui entraîne la mort de 50 % des gammars. Les critères permettant d'affirmer la mort d'un gammare sont les suivants :

- immobilisation complète de l'animal.
- absence de mouvement au niveau des pléopodes, ce qui indique l'absence d'activité respiratoire.
- position en extension de l'animal.
- changement de couleur des téguments (de la couleur marron naturelle, ils passent à la couleur orange).

VI. - EXPRESSION DES RESULTATS :

Au cours des quatre jours de l'expérimentation, on note deux fois par jour le nombre de survivants pour chaque concentration. Les relevés s'effectuent aux temps suivants :

- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| - T ₀ + 11 h | - T ₀ + 59 h |
| - T ₀ + 24 h | - T ₀ + 72 h |
| - T ₀ + 35 h | - T ₀ + 83 h |
| - T ₀ + 48 h | - T ₀ + 96 h |

Grâce à un traitement informatique³, on peut obtenir les CL₅₀ pour chaque produit aux différents temps d'exposition.

³ - Logiciel STATPHAR, du domaine public, par le Dr. J. DEBORD, Laboratoire de Toxicologie-Pharmacovigilance du C.H.R.U. Dupuytren à Limoges.

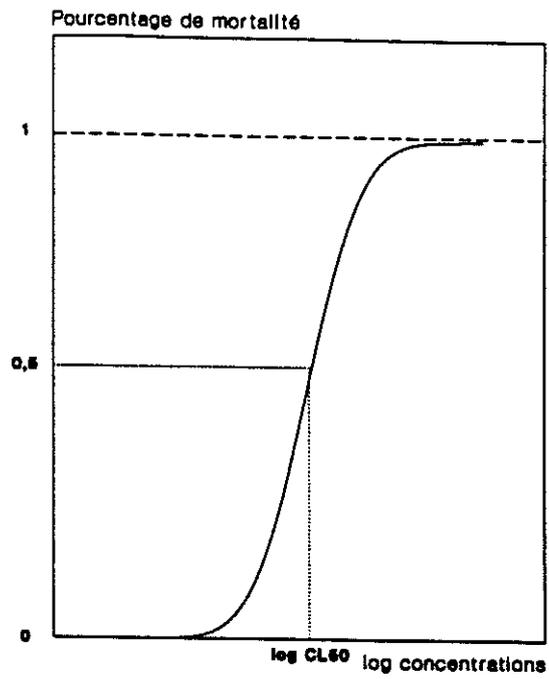


Figure 5.
Courbe théorique de mortalité lors de l'exposition d'un gammare à un toxique
(d'après LAJUGIE, 1992).

En effet, on admet que les concentrations C de toxiques nécessaires pour tuer les individus d'une population suivent une loi log-normale de moyenne m et d'écart type s . La moyenne m est égale au logarithme décimal de la CL_{50} et l'écart type s traduit la dispersion des valeurs de $\log C$ autour de la moyenne. Ces deux paramètres sont déterminés à partir du taux de mortalité en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (MACCARIO, 1978; MACCARIO *et al.*, 1980). Le calcul de ces paramètres permet de déterminer une courbe de mortalité théorique (figure 5) qui s'ajuste au plus près des points expérimentaux.

Afin d'obtenir cette courbe de mortalité, on introduit dans l'ordinateur les données suivantes :

- le nombre d'animaux à T_0 ,
- la concentration du toxique,
- le nombre de morts pour chaque concentration de produit aux différents temps d'exposition.

Le logiciel indique, par ailleurs, la présence éventuelle de points s'écartant trop de la courbe théorique et que l'on peut alors considérer comme aberrants. Ces derniers sont alors supprimés et on relance le calcul jusqu'à ce que tous les points aberrants aient disparu.

RESULTATS

Ce chapitre est consacré aux valeurs que nous avons obtenues au niveau toxicologique et aux observations que nous avons effectuées sur le plan histologique.

I. - DONNEES TOXICOLOGIQUES

A. VALEURS DES CL₅₀ (en µmol/l) :

Elles sont reportées ci-dessous :

Produits	Temps d'exposition (h)							
	11	24	35	48	59	72	83	96
3-chloro-BNT	3,21	2,13	1,68	1,13	0,81	0,65	0,62	0,60
4-bromo-BNT	1,93	1,45	1,23	1,12	1,05	0,92	0,88	0,81
2,6-difluoro-BNT	*	*	*	182,78	132,21	67,66	38,97	17,27

* Les valeurs obtenues ne figurent pas en raison de leur disparité.

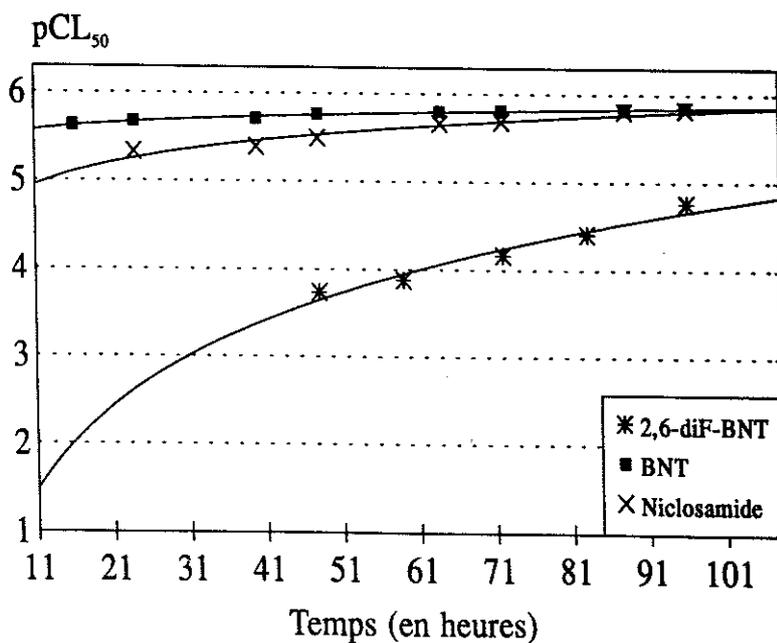
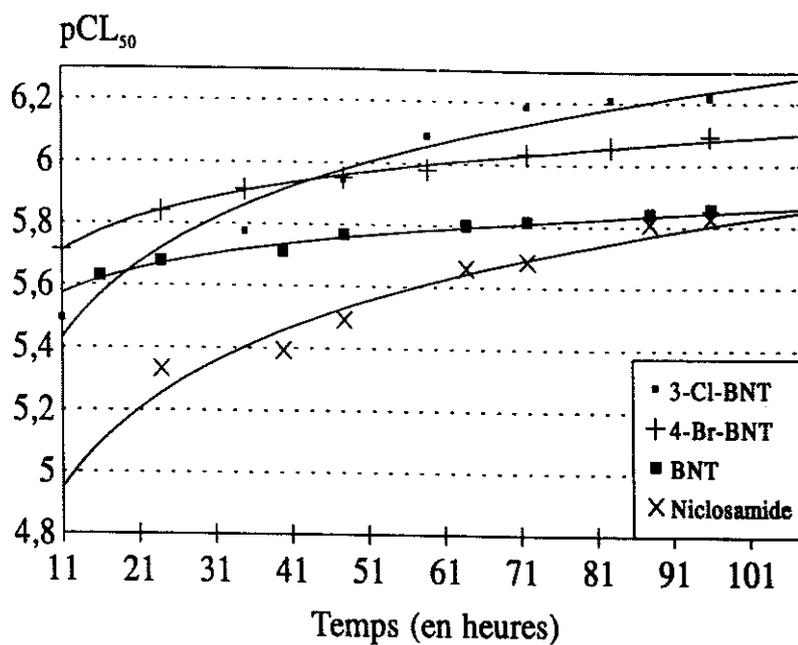


Figure 6.

Évolution des pCL₅₀ en fonction de la durée de l'expérience :

- pour le 3-chloro-BNT et le 4-bromo-BNT (6a),

- pour le 2,6-difluoro-BNT (6b)

par rapport à celles du BNT et du Niclosamide.

Les pCL₅₀ des deux derniers produits ont été empruntés à VIGNOLES (1990).

Produits	Temps en heures							
	16	24	40	48	64	72	88	96
BNT	2,34	2,09	1,94	1,70	1,58	1,53	1,44	1,39
2-bromo-BNT	4,05	3,47	2,63	2,58	2,01	1,93	1,86	1,73
3-bromo-BNT	0,53	0,45	0,39	0,37	0,34	0,33	0,32	0,31
2,5-dibromo-BNT	0,41	0,34	0,32	0,28	0,22	0,21	0,20	0,19
2,4-dichloro-BNT	0,59	0,44	0,32	0,32	0,32	0,30	0,29	0,28
2,5-dichloro-BNT	0,60	0,59	0,34	0,32	0,30	0,30	0,28	0,27
3,4-dichloro-BNT	0,36	0,33	0,30	0,30	0,28	0,30	0,26	0,25
3,5-dichloro-BNT	0,47	0,38	0,32	0,31	0,30	0,28	0,29	0,28
2-fluoro-BNT	4,30	4,15	3,41	3,30	2,98	2,91	2,67	2,44
4-fluoro-BNT	2,52	2,30	2,03	1,98	1,86	1,74	1,64	1,61
2-chloro-6-fluoro-BNT	5502,0	22,11	10,08	8,29	7,06	6,53	5,44	5,17
Niclosamide	4,77	4,65	4,03	3,21	2,18	2,06	1,55	1,49

Tableau I.
Valeurs des Cl_{50} (en $\mu\text{mol/l}$) chez *G. p. pulex*
(d'après VIGNOLES, 1990; VIGNOLES *et al.*,1990)

L'observation de ces résultats fait ressortir les points suivants :

- La toxicité des produits augmente en fonction du temps d'exposition.
- L'augmentation de la toxicité est faible pour les dérivés monosubstitués. Celle du 2,6-difluoro-BNT (dérivé bisubstitué) augmente davantage.
- Le 3-chloro-BNT est moins toxique que le 4-bromo-BNT jusqu'à la 48^e heure. Au-delà, on constate une inversion dans les valeurs des CL_{50} .
- Le 2,6-difluoro-BNT est le produit le moins actif.

La figure 6 montre l'évolution des pCL_{50}^4 pour nos trois produits. Dans un but de comparaison, nous y avons indiqué également celles du BNT et du Niclosamide (d'après VIGNOLES, 1990).

Le graphe 6a montre que le 3-chloro-BNT et le 4-bromo-BNT sont plus toxiques pour les gammarés que le Niclosamide et le BNT non substitué.

B. COMPARAISON AVEC D'AUTRES DERIVES DU BNT :

Nous avons répertorié dans le tableau I les valeurs des CL_{50} que VIGNOLES (1990) a rapportées pour *G. p. pulex* lorsque les animaux sont au contact du BNT ou de ses dérivés. Nous y avons indiqué, en plus, celle du Niclosamide.

L'examen de nos résultats et du tableau conduit aux remarques suivantes :

1. COMPARAISON AVEC LES DERIVES CHLORES :

Notre 3-chloro-BNT est moins toxique que les dérivés bisubstitués.

VIGNOLES (1990), LAJUGIE (1992) rapportent que la substitution en position *ortho* serait défavorable : en effet, le 2,4-dichloro-BNT et le 2,5-dichloro-BNT sont moins toxiques que le 3,4-dichloro-BNT et le 3,5-dichloro-BNT qui sont respectivement substitués en *méta* et *para* ou en *méta* et *méta*).

⁴ - La pCL_{50} correspond au cologarithme de la concentration létale qui tue 50 % des animaux ($pCL_{50} = - \log CL_{50}$).

2. COMPARAISON AVEC LES DERIVES BROMES :

Notre 4-bromo-BNT présente une toxicité supérieure à celle du 2-bromo-BNT mais qui reste inférieure à celle du 3-bromo-BNT. On peut donc conclure que la toxicité d'un dérivé bromé diminue lorsque la substitution est en position *ortho*. D'après VIGNOLES (1990), on note un processus inverse lorsque la substitution se fait en *méta*; par contre, la substitution en *para* n'aurait pas beaucoup d'influence sur la toxicité (toutefois, le 4-bromo-BNT est plus toxique que le BNT non substitué).

Le tableau montre que le produit bisubstitué (2,5-dibromo-BNT) est le plus toxique.

3. COMPARAISON AVEC LES DERIVES FLUORES :

Notre 2,6-difluoro-BNT (bisubstitué en *ortho*) est moins toxique que les composés monosubstitués.

D'après VIGNOLES (1990), les dérivés substitués en position *para* sont plus toxiques que ceux substitués en *méta*.

4. COMPARAISON EN FONCTION DU SUBSTITUANT HALOGENE POUR UNE MEME POSITION:

Elle montre :

- que le 3-chloro-BNT présente une toxicité inférieure à celle du 3-bromo-BNT.
- que le 4-bromo-BNT est deux fois plus actif que le 4-fluoro-BNT.
- que le 2,6-difluoro-BNT est nettement moins toxique que le 2-chloro-6-fluoro-BNT.

Ces observations permettent de dire qu'une substitution par un atome de brome contribue à une augmentation de la toxicité alors que le remplacement par un fluor se traduit par une diminution de celle-ci.

VIGNOLES (1990) explique ces résultats en indiquant que l'élément fluor est plus électronégatif que le chlore, lui-même plus électronégatif que le brome. Le premier élément a donc un effet électroattracteur plus important, ce qui entraîne une modification dans la distribution des charges au sein de la molécule et aboutit à une perte d'activité.

5. AUTRES REMARQUES :

On remarque que les composés bisubstitués sont plus toxiques que les mono-substitués, à l'exception du 2,6-difluoro-BNT et du 2-chloro-6-fluoro-BNT qui sont les produits les moins toxiques. Comme ces deux produits sont bisubstitués en position *ortho*, ce fait appuie l'hypothèse de VIGNOLES (1990) selon laquelle la substitution en *ortho* se traduirait par une diminution de la toxicité.

II. - OBSERVATIONS HISTOPATHOLOGIQUES :

Ce paragraphe commence par une description sommaire sur l'anatomie interne du gammare. Dans un deuxième temps, nous précisons la structure normale des viscères chez les témoins. La description des lésions sera réalisée dans la troisième subdivision et nous terminerons cet exposé par un tableau récapitulatif de l'évolution chronologique de la pathologie en fonction des deux dates de relevés (4^e et 18^e jour).

A. RAPPELS SUR L'ANATOMIE INTERNE DU GAMMARE :

Les données proviennent de l'analyse des deux documents suivants : GRAF, 1969; GRASSE *et al.*, 1970.

Le tube digestif comprend un estomac, un intestin et deux paires de longs caecums hépatopancréatiques antérieurs.

Dans la partie postérieure de l'animal, à côté de la jonction entre l'intestin moyen et le proctodeum, s'ouvrent une paire de caecums postérieurs. Ces derniers sont donc présents avec les quatre caecums hépatopancréatiques dans la partie moyenne de l'animal. Nous les désignerons par leur nom respectif dans la suite de ce travail pour éviter toute confusion.

Le coeur s'étend dans le péréion du deuxième au septième somite. Il comporte trois paires d'ostioles et donne naissance à une aorte antérieure qui se divise en deux branches pour irriguer le cerveau. Un grand sinus ventral envoie le sang aux branchies.

Le système nerveux comprend un cerveau bilobé, un ganglion sous-oesophagien, sept ganglions dans le péréion et quatre ganglions dans le pléon. Le dernier ganglion du pléon correspond en réalité à la fusion des trois dernières paires de ganglions. De plus, chaque

Planche B.

Quelques viscères chez les gammares témoins.

- Premier cliché (1) :

**Vue générale du corps sur une coupe transversale,
au niveau de l'articulation entre le péréion et le pléon.**

Grossissement : x 125.

- Deuxième cliché (2) :

**L'intestin postérieur et les deux types de caecums
à plus fort grossissement.**

Grossissement : x 500.

- Troisième cliché (3) :

Les testicules à plus fort grossissement.

**Les spermatogonies et spermatocytes de premier ordre (en brun)
se situent vers le centre. La partie la plus externe de chaque gonade
est occupée par des spermatocytes de deuxième ordre.**

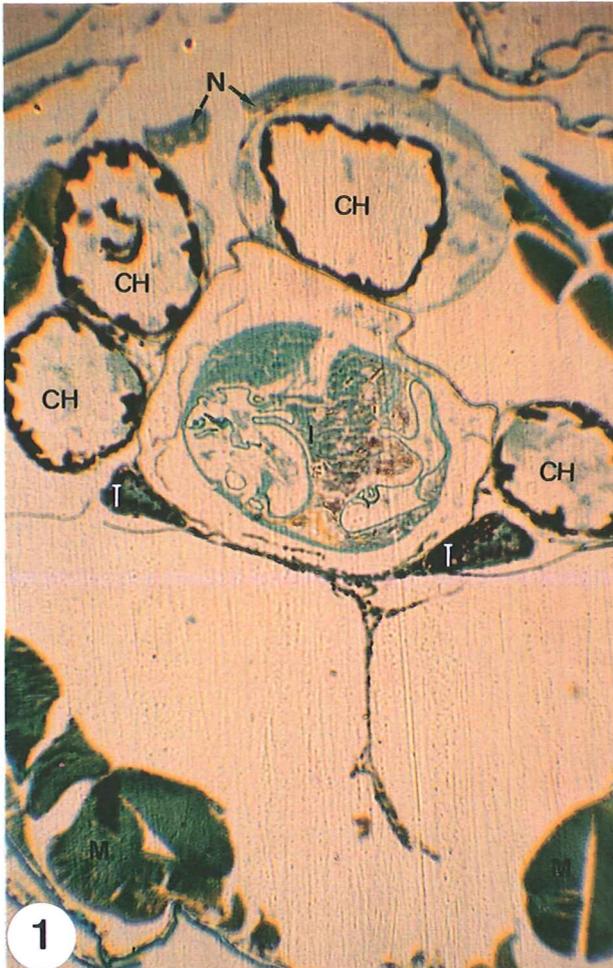
Grossissement : x 500.

- Quatrième cliché (4) :

Les branchies à un plus fort grossissement.

Grossissement : x 500.

**Abréviations : B (branchie); C (coeur); CH (caecums hépatopancréatiques
antérieurs); CP (caecums postérieurs); Cu (cuticule externe);
I (intestin); M (muscles); N (ganglion nerveux); T (testicule).**



ganglion (du 1^{er} au 7^e) résulte de la fusion des deux ganglions que l'on rencontre dans chaque segment chez les Crustacés.

L'excrétion est assurée par des glandes antennaires et les caecums postérieurs y participent également.

Les sexes sont séparés. Les testicules et les ovaires sont de simples tubes localisés dans le péréion, de chaque côté de l'intestin. Les canaux déférents se terminent par un pénis.

La respiration est assurée par des branchies insérées sur les six derniers péréiopodes, à la face interne des plaques coxales.

Une micrographie réalisée sur l'un de nos gammares témoins est présentée sur la planche B, n° 1.

Ce cliché correspond à une coupe transversale du gammare, au niveau de l'articulation entre le péréion et le pléon. On remarque en particulier l'intestin et les quatre caecums hépatopancréatiques. Les branchies se voient sous forme de longues expansions à la face inférieure de l'animal.

B. STRUCTURE DE QUELQUES VISCERES CHEZ LES TEMOINS :

1. L'INTESTIN MOYEN ET LES DEUX TYPES DE CAECUMS :

L'intestin moyen a d'abord une forme circulaire et présente une lumière de plus en plus étoilée lorsque l'on va vers le rectum. Cette cavité est recouverte d'un épithélium cilié reposant sur une lame basale ondulée. A l'extérieur, on constate des fibres musculaires peu nombreuses et cette couche augmente en épaisseur dans la zone qui touche le rectum (planche B, n° 2).

L'intestin est entouré dans la partie ventrale par quatre caecums hépatopancréatiques antérieurs qui ont tous la même taille, une forme circulaire et une lumière centrale. Ils sont bordés par un épithélium constitué par des cellules basales et une seule assise de cellules hépatopancréatiques avec des prolongements apicaux. Le tout repose sur une lame basale dépourvue de couche musculaire (n° 2).

Au dessus de l'intestin postérieur, on peut voir deux caecums postérieurs étroits, pourvus d'un épithélium pseudostratifié de type palissadique. Ces caecums jouent un rôle dans le métabolisme du calcium à l'intérieur de l'organisme (GRAF, 1969).

Organes	Gammars au 4 ^e jour		Gammars au 18 ^e jour	
	n°1	n°2	n°1	n°2
Intestin moyen	Epithélium de recouvrement simple. Lame basale peu ondulée.		Epithélium normal	
Caecums hépatopancréatiques antérieurs	Cellules hépatopancréatiques basophiles. Présence de grandes vacuoles à l'intérieur des cellules.		Présence de grandes vacuoles à l'intérieur des cellules.	
Caecums postérieurs	Aspect structural normal de type pseudostratifié.		Aspect structural normal de type pseudostratifié.	
Testicules	Activité normale. Spermatogénèse au stade spermatocytes de 1 ^e et de 2 ^e ordre; présence de spermatozoïdes en faible nombre.		Activité normale comme au 4 ^e jour.	
Canaux déférents	Non dilatés. Présence de spermatocytes de 2 ^e ordre au milieu des spermatozoïdes.	Dilatés Accumulation de spermatozoïdes.	Non dilatés.	Dilatation des canaux déférents. Accumulation des spermatozoïdes.

Tableau II.
Les aspects structuraux constatés chez les témoins au 4^e jour et au 18^e jour de l'expérience

2. LES GONADES :

Les gonades sont situées au dessus du tube digestif, dans la partie médiane de l'animal. Chaque testicule se prolonge par un canal déférent qui aboutit au pore génital.

Chaque gonade comprend une bande de spermatogonies surmontée d'une couche de spermatozytes de premier ordre et de deuxième ordre, comme le montre la planche B, n° 3. Les cellules de Sertoli se trouvent le plus souvent en périphérie.

Les spermatozoïdes sont parfois visibles. On les rencontre plus fréquemment dans le canal déférent.

3. LES BRANCHIES :

La planche B, n° 4 montre les branchies chez l'animal sain. Chaque branchie contient des sinus où circule l'hémolymphe. Des amibocytes (globules nucléés) se voient parfois dans ces cavités.

Le tableau II récapitule ces aspects chez les témoins pour les dates de sacrifice.

C. L'ACTION DES TROIS PRODUITS :

Nous présenterons d'abord une étude descriptive des lésions au niveau de trois organes (branchies, gonades, système digestif) avant de suivre leur évolution dans le temps.

1. ETUDE DESCRIPTIVE DES LESIONS :

Les lésions observées sont identiques pour les trois produits. Toutefois, elles sont moins marquées pour le 2,6-difluoro-BNT.

On constate donc :

- une atteinte de l'intestin moyen (planche C, n° 1, page suivante). On observe une disparition de l'épithélium avec une mise à nu de la lame basale et son remplacement par un épithélium de recouvrement formé de cellules aplaties.

- une atteinte des caecums hépatopancréatiques. Elle est plurifocale. Par endroits, il y a une mise à nu partielle de la lame basale avec disparition des cellules hépatopancréatiques, suivie d'une reconstitution à partir des cellules basales.

Planche C.
Quelques lésions viscérales chez les gammares
soumis à l'action des trois dérivés du BNT
à dose sub létale.

- Premier cliché (1) :

Les effets du 4-bromo-BNT sur l'intestin moyen et les caecums hépatopancréatiques.
L'épithélium intestinal a disparu et est remplacé par des cellules de recouvrement.
Celui des caecums hépatopancréatiques est atrophique.

Gammare fixé au 4^e jour.

Grossissement : x 125.

- Deuxième cliché (2) :

Les effets du 3-chloro-BNT sur les testicules de *G. p. pulex*.
Spermatocytes de 1^{er} et de 2^e ordre en nécrose (flèches).

Gammare fixé au 4^e jour.

Grossissement : x 500.

- Troisième cliché (3) :

Les effets du 2,6-difluoro-BNT sur les testicules de *G. p. pulex*
remis dans une eau non polluée. Gammare fixé au 18^e jour.
L'épithélium germinale ne présente plus de cellules en nécrose.

Grossissement : x 500.

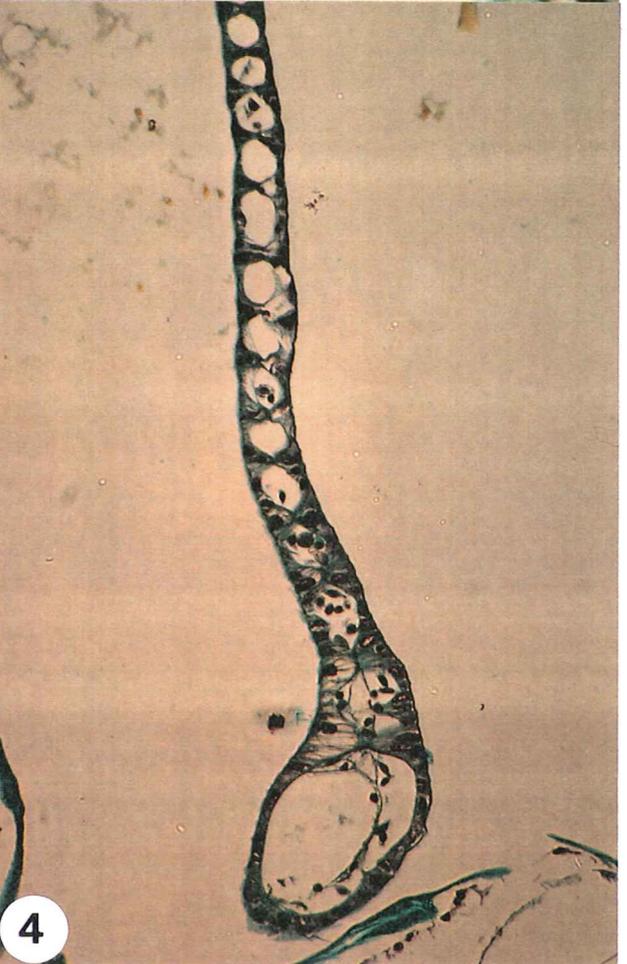
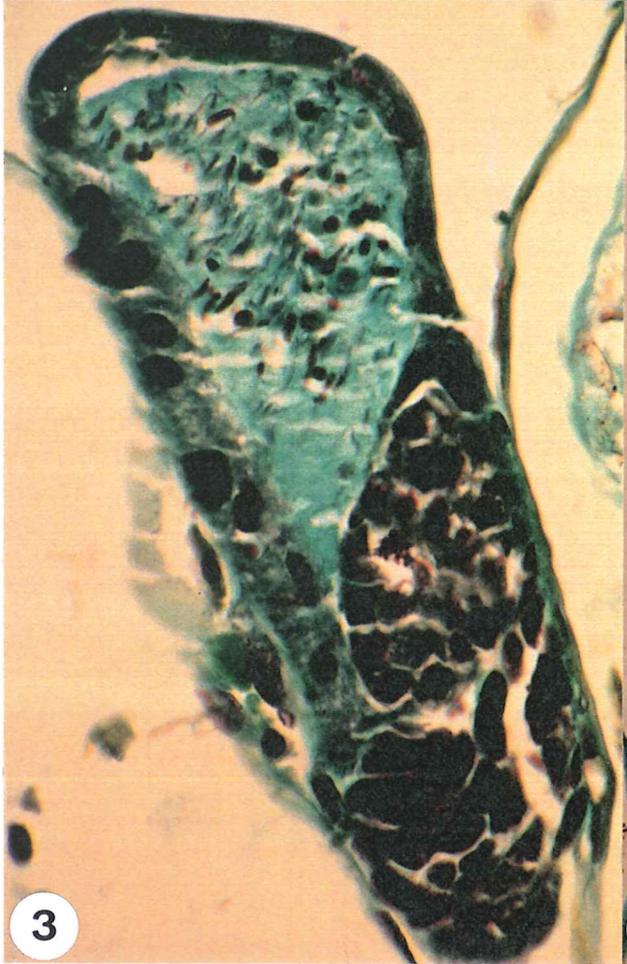
- Quatrième cliché (4) :

Les branchies à un plus fort grossissement.

Noter l'augmentation numérique des hémocytes chez un gammare
intoxiqué par le 4-bromo-BNT et fixé au 4^e jour.

Grossissement : x 500.

Abréviations : B (branchie); C (coeur); CH (caecums hépatopancréatiques
antérieurs); CP (caecums postérieurs); Cu (cuticule externe);
I (intestin); M (muscles); N (ganglion nerveux); T (testicule).



Produits	Au 4 ^e jour		Au 18 ^e jour	
	Gammare n° 1	Gammare n° 2	Gammare n° 1	Gammare n° 2
3-chloro-BNT (0,13 mg/l)	Atteinte des spermatoocytes de 2 ^e ordre.	Atteinte plus faible des spermatoocytes de 2 ^e ordre.	Spermatoocytes de 2 ^e ordre en nécrose. Augmentation de taille des canaux déférents.	
4-bromo-BNT (0,24 mg/l)	Elargissement des canaux déférents. Nécrose des spermatoocytes de 2 ^e ordre.		Dilatation des canaux déférents. Quelques spermatoocytes de 1 ^e ordre en nécrose. Spermatoocytes de 2 ^e ordre présentent quelques cellules nécrotiques dissociées.	Dilatation des canaux déférents avec des cellules en lyse à l'intérieur. Nécrose de quelques cellules de Sertoli et de quelques spermatoocytes de 2 ^e ordre.
2,6-difluoro-BNT (3,54 mg/l)	Atteinte des spermatoocytes de 2 ^e ordre. Elargissement des canaux déférents.		Pas d'atteinte des spermatoocytes. Elargissement très important des canaux déférents.	

Tableau III.
Evolution des lésions au niveau des gonades
chez les gammars sacrifiés au 4^e et au 18^e jour de l'expérience.



Produit	Au 4 ^e jour		Au 18 ^e jour	
	Gammare n° 1	Gammare n° 2	Gammare n° 1	Gammare n° 2
3-chloro-BNT (0,13 mg/l)	Nécrose de quelques cellules épithéliales dans l'intestin moyen Lambeaux d'épithélium dans la lumière des caecums hép. Vacuoles intracellulaires dans l'épithélium. Peu d'hémocytes circulants.	Identique au gammare n° 1, avec, en plus, un épithélium en lyse dans les caecums hép. et une disparition de l'épithélium intestinal.	L'épithélium de l'intestin moyen manque par endroits. Présence de vacuoles intra-épithéliales dans l'épithélium des caecums hép. et de quelques lambeaux d'épithélium dans leur lumière. Persistance d'hémocytes circulants autour des caecums hép.	
4-bromo-BNT (0,24 mg/l)	Epithélium de l'intestin moyen atrophique avec cellules en lyse. Présence de vacuoles intracellulaires dans l'épithélium des caecums hép. Présence d'hémocytes circulants à l'extérieur des caecums hép.		Intestin moyen : épithélium reconstitué avec signes d'hyperplasie. Caecums : épithélium reconstitué mais manque par endroits. Présence de vacuoles intracellulaires Quelques lambeaux d'épithélium et des hémocytes circulants sont encore présents.	
2,6-difluoro-BNT (3,54 mg/l)	Présence d'hémocytes autour des caecums hép. Présence de vacuoles intracellulaires dans l'épithélium des caecums hép.		Présence de vacuoles intracellulaires au niveau des caecums. Reconstitution épithéliale au niveau des caecums hép. de manière anarchique. Persistance d'hémocytes autour des caecums.	

Tableau IV.
Evolution des lésions au niveau du tube digestif
chez les gammares sacrifiés au 4^e et au 18^e jour de l'expérience.
Abréviation : hép. (hépatopancréatiques).

On constate la présence d'hémocytes à l'extérieur de la lame basale (chez les survivants, surtout au dix-huitième jour).

- une atteinte des gonades (planche C, n° 2 et n° 3).

Des cellules en nécrose sont présentes au milieu des spermatocytes de deuxième ordre au 4^e jour (n°2) mais ce processus disparaît chez les animaux au 18^e jour (n° 3). La lyse touche également les cellules de Sertoli au 4^e jour. Les canaux déférents sont élargis au 18^e jour.

D'autres lésions ont été observées chez ces animaux soumis à ces trois dérivés du BNT. C'est ainsi que dans les branchies, on constate une augmentation du nombre des hémocytes dans les espaces hémolymphatiques au 4^e jour (planche C, n° 4).

L'épithélium situé sous la cuticule externe présente des cellules avec des signes de souffrance cellulaire dans le cas des gammares soumis au 3-chloro-BNT. Par contre, la cuticule ne montre pas d'altérations visibles en microscopie optique.

Nous n'avons pas observé de lésion au niveau du coeur, des muscles et des ganglions.

2. EVOLUTION DES LESIONS :

Les deux tableaux III et IV montrent la succession des lésions dans les gonades (tabl. III) et le tube digestif (tabl. IV) chez des gammares fixés au 4^e et au 18^e jour.

a) Au quatrième jour :

Au niveau de l'intestin moyen, les trois produits ont provoqué une atteinte de l'épithélium. Ce dernier disparaît totalement par endroits.

Au niveau des caecums hépatopancréatiques, les vacuoles apicales délimitées par les prolongements des cellules épithéliales sont toujours présentes. Mais on constate, en plus, l'existence de vacuoles intracellulaires autour du noyau, ce qui traduit l'existence d'une souffrance cellulaire. Dans la lumière, on note la présence de lambeaux d'épithélium. Quelques hémocytes circulants sont présents autour des caecums, quel que soit le produit étudié.

L'atteinte dans les testicules porte surtout sur les spermatoocytes de deuxième ordre. Ceux de premier ordre sont peu affectés. On constate un élargissement des canaux déférents.

Quelques hémocytes circulants s'observent dans les branchies.

b) Au dix-huitième jour :

L'épithélium intestinal est en cours de reconstitution et présente une hyperplasie cellulaire.

Au niveau des caecums hépatopancréatiques, l'épithélium est également en reconstitution mais il manque par endroits. On note, comme au quatrième jour, la présence de vacuoles périnucléaires et la présence de lambeaux d'épithélium dans la lumière. Quelques hémocytes circulants sont encore présents autour des caecums.

Au niveau des gonades, on observe une nécrose de quelques cellules de Sertoli et de quelques spermatoocytes. Les canaux déférents sont très dilatés.

Les sinus hémolymphatiques des branchies apparaissent vides dans le cas du 4-bromo-BNT. Il y a toujours quelques hémocytes circulants dans le cas des deux autres produits.

DISCUSSION

Une synthèse des principaux résultats est présentée au début de ce chapitre. Les deux autres subdivisions portent sur la comparaison de nos résultats par rapport à ceux de la littérature.

I - SYNTHÈSE DES RESULTATS :

Les résultats peuvent être regroupés sous deux rubriques.

- 1) Au niveau toxicologique :

La toxicité des produits augmente en fonction du temps d'exposition. Cet accroissement est faible pour les dérivés monosubstitués; il est plus important dans le cas du 2,6-difluoro-BNT.

Le 3-chloro-BNT est moins toxique que le 4-bromo-BNT jusqu'à la 48^e heure. Au-delà, on constate une inversion dans les valeurs des pCL₅₀. Le 2,6-difluoro-BNT est le produit le moins toxique.

La comparaison de ces trois produits avec le BNT et le Niclosamide montre que le 3-chloro-BNT et le 4-bromo-BNT sont plus toxiques pour les gammars.

- 2) Au niveau histologique :

Des lésions majeures s'observent au niveau de l'intestin moyen et des caecums hétopancréatiques lorsque les gammars sont exposés aux trois toxiques à dose sublétales. D'autres

dommages touchent les testicules ou l'épithélium externe situé sous la cuticule mais ils sont moins importants.

L'intestin et les caecums hépatopancréatiques des gammares répondent à l'action des trois produits chimiques par une nécrose épithéliale visible au 4^e jour d'expérience. Une reconstitution de cet épithélium survient par la suite selon des modalités qui varient pour chaque organe.

Un nombre variable de spermatoctes de 2^e ordre sont en nécrose chez les gammares intoxiqués au 4^e jour. Cette lésion disparaît pratiquement au 18^e jour. Par contre, on assiste à un élargissement variable dans le diamètre des canaux déférents chez tous les survivants remis dans une eau normale.

II. - COMMENTAIRES SUR LA TOXICOLOGIE :

Le but de ce travail était d'étudier la toxicité de trois dérivés halogénés du BNT sur une espèce animale cible, *G. p. pulex* qui vit dans les habitats des mollusques.

Or, ces trois produits n'ont pas encore fait l'objet d'une étude comparative sur leur pouvoir molluscicide. Il est donc difficile de conclure s'ils sont de bons molluscicides.

Néanmoins, l'impact de nombreux dérivés du BNT sur l'animal cible et l'environnement a déjà été étudié par différents auteurs (VIGNOLES, 1990; LAJUGIE, 1992). Nous pouvons donc comparer nos résultats à ceux rapportés dans ces travaux. Cette comparaison peut être réalisée car le protocole expérimental et les méthodes employées sont similaires.

En effet, les gammares utilisés proviennent du même lieu de récolte. Les méthodes de récolte, de maintenance au laboratoire et d'intoxication sont identiques. Le diagnostic permettant d'affirmer la mort de l'animal repose sur les mêmes critères.

Aussi l'analyse de ces résultats nous permet-elle d'émettre plusieurs remarques :

- La toxicité des dérivés halogénés du BNT sur les gammares varie en fonction du substituant halogéné et en fonction de la position de ce substituant sur la molécule.
- Les dérivés bromés et chlorés semblent être plus toxiques que les fluorés.

- Une bisubstitution chlorée ou bromée entraîne une augmentation de la toxicité par rapport à une monosubstitution.

- La substitution en position *méta* aboutit à une augmentation de la toxicité alors qu'une substitution en *ortho* contribue à une diminution de la toxicité.

La substitution en position *para* induit une toxicité comprise entre les deux autres modes de substitution et qui est plus proche de celle en *méta* que de celle en *ortho*.

Le 2,6-difluoro BNT présente une toxicité pour les gammares nettement inférieure à tous les autres dérivés du BNT. Il serait donc intéressant de connaître la toxicité de ce produit sur les mollusques. Mais si l'on analyse les résultats obtenus par VIGNOLES (1990) et LAJUGIE (1992), il est fort probable que ce produit bifluoré ait une faible toxicité vis-à-vis des mollusques. Celle-ci pourrait être comparable à celle observée pour le 2-chloro-6-fluoro-BNT, voire inférieure. En effet, ces deux auteurs, en étudiant la relation entre l'activité des produits et leur structure à la fois sur les gammares et les mollusques, montrent que la toxicité augmente avec la lipophilie et diminue généralement avec l'effet électro-attracteur des substituants.

Comme le 2,6-difluoro-BNT comprend deux substituants fluor et que ces derniers sont très électro-attracteurs, ceci conduit à un déplacement des charges au sein de la molécule diminuant ainsi son efficacité. On peut donc supposer que si un produit est fortement toxique pour les limnées, il en sera généralement de même pour les gammares et inversement.

Toutefois, les deux auteurs précités ont montré que les produits les plus molluscicides ne sont pas systématiquement les plus toxiques pour les autres animaux.

III. - COMMENTAIRES SUR L'HISTOPATHOLOGIE :

L'interprétation de ces résultats par rapport aux données de la littérature appelle une limite car nos observations n'ont porté que sur quatre animaux par toxique : deux au quatrième jour d'expérience, deux au dix-huitième jour. Dans ces conditions, il importe d'être prudent dans nos commentaires. Deux notions importantes se dégagent cependant de ces résultats :

A. LE SITE DES LÉSIONS.

Les résultats montrent clairement que la majorité des lésions se situent dans la partie moyenne de l'intestin et des caecums hépatopancréatiques. Le choix de ces sites soulève un problème car le mode d'action du BNT ou de ses dérivés halogénés n'est pas encore connu si l'on en juge par la synthèse de VIGNOLES (1990) sur ces produits. SPARKS (1985) rapporte que le mode d'action des produits chimiques détermine la localisation des lésions viscérales. Dans ces conditions, il est possible d'émettre l'hypothèse que l'intestin et les caecums hépatopancréatiques interviennent dans le transfert et/ou le métabolisme de ces substances chez les gammars.

Les études histopathologiques sur des espèces animales intoxiquées par les dérivés du BNT sont encore peu nombreuses. Si l'on considère les observations de FRUGNAC (1994) et de GADY (1994) sur les lésions viscérales d'un mollusque, *Lymnaea glabra* au contact d'autres dérivés du BNT, on retrouve également une vague de nécrose qui touche l'épithélium des quatre organes étudiés (glande digestive, gonade, glande de l'albumine, rein), suivie d'une reconstitution épithéliale et d'une seconde vague de nécrose dans le cas du rein. Ces auteurs considèrent que ces lésions ne sont pas spécifiques aux produits utilisés dans le cadre de leurs expériences car des dommages de même type s'observent chez ces limnées lorsqu'elles sont parasitées par un Trématode comme *Fasciola hepatica* (BOUIX-BUSSON *et al.*, 1985a, b).

Au vu de ces données, nous pensons, de même, que les lésions observées chez nos gammars ne seraient pas spécifiques des dérivés du BNT. Notre hypothèse s'appuie en particulier sur les observations de LIGHTNER (1978) sur une crevette, *Penaeus stylirostris* lorsque cette dernière ingère une algue, *Spirulina subsalsa* dans la partie nord du golfe de Californie. Cette algue est connue pour sécréter des toxines et, dans ces conditions, l'auteur décrit une nécrose épithéliale au niveau de l'intestin moyen ou des caecums hépatopancréatiques, accompagnée d'une infiltration hémocytaire. Dans les cas sévères, l'épithélium de recouvrement est totalement dénudé et remplacé par de nombreux hémocytes en masse sur tout le trajet de l'intestin moyen. Cette nécrose n'est pas suivie d'une reconstitution épithéliale car la mortalité touche 60 à 85 % des crevettes en l'absence de traitement. La comparaison des observations sur *P. stylirostris* avec les résultats de notre propre étude permet de dire que l'intestin moyen des Amphipodes et les caecums hépatopancréatiques sont des organes "cibles" lorsqu'ils sont soumis à une agression par voie chimique.

B. L'INTENSITE DES LESIONS.

Nos observations ont été réalisées avec trois toxiques utilisés à dose sub létale. Dans ces conditions, nous avons constaté une nécrose épithéliale importante dans l'intestin moyen et les caecums, allant même jusqu'à la dénudation de la membrane basale dans le cas du 3-chloro-BNT (à 0,41 $\mu\text{mol/l}$). Chez les gammares remis dans une eau normale, on constate une reconstitution variable, parfois atypique qui manque par endroits et l'on observe des lambeaux d'épithélium nécrosés dans la lumière.

Les auteurs qui ont travaillé sur *Lymnaea glabra* (FRUGNAC, 1994; GADY, 1994) n'ont pas noté la persistance de la nécrose épithéliale (première vague) au dix-neuvième jour d'expérience (à 20°C) chez leurs limnées intoxiquées lorsqu'elles sont remises dans une eau normale, dépourvue de toxique. Leurs animaux montrent un épithélium en cours de reconstitution.

La persistance de la nécrose épithéliale dans le cas de nos gammares mérite une interprétation. Deux hypothèses, probablement complémentaires, peuvent être émises pour expliquer ce fait :

- Comme tous les Amphipodes maintenus en captivité, les gammares dévorent leurs congénères morts. En effet, nous avons constaté, à maintes reprises, la présence de fragments de cuticule dans l'intestin des gammares fixés pour l'étude histologique et cette chitine, qui se colore en jaune vif par le jaune naphthol, indique que les survivants avaient prélevé des fragments sur les cadavres de leurs congénères pour se nourrir, malgré la présence de nourriture végétale dans le milieu d'expérience. Il est donc logique de penser que l'apport de ces aliments intoxiqués augmenterait la période de charge pour les survivants, permettant ainsi un contact prolongé de leur intestin et des caecums avec le toxique. Nous considérons cette première supposition comme la plus valable pour expliquer la persistance de la nécrose.

- La seconde hypothèse invoque l'action prolongée de nos trois produits au dix-huitième jour d'expérience sur les organes cibles des gammares, même si les animaux sont remis dans une eau normale et peuvent s'alimenter normalement. Bien qu'ils soient à dose sub létale, les trois dérivés halogénés du BNT seraient capables de rester dans le corps des gammares pendant un temps de 14 jours au moins après la fin de la période de charge, ce qui indique que leur élimination serait lente malgré les processus de détoxification qui sont

probablement présents chez *G. p. pulex*.

Des expériences complémentaires sont encore nécessaires pour vérifier le bien fondé de ces deux hypothèses en expérimentant avec la même population de gammares dans les mêmes conditions expérimentales sur une plus longue période (30 jours au moins) et en éliminant toutes les 12 heures les gammares morts du milieu d'expérience.

RESUME ET CONCLUSIONS

Les études présentées dans ce mémoire ont permis de déterminer la toxicité *in vitro* de trois dérivés halogénés du BNT (3-chloro-BNT, 4-bromo-BNT et 2,6-difluoro-BNT) et d'analyser leurs conséquences histopathologiques sur une espèce animale représentative de la faune aquatique : *G. p. pulex*.

Les résultats peuvent être regroupés sous deux rubriques :

1. Toxicité des trois produits sur *G. p. pulex* :

La détermination de la CL₅₀ a été réalisée pour chaque produit. La valeur de ce paramètre diminue progressivement lorsque la durée de l'exposition s'accroît.

Les dérivés bromé et chloré ont une toxicité voisine; le dérivé bifluoré présente une toxicité nettement inférieure.

La comparaison de nos résultats avec ceux des auteurs confirme leurs interprétations. Les produits les plus toxiques possèdent un substituant en position *méta* et sont généralement bisubstitués. Toutefois une substitution par un ou plusieurs atomes de fluor entraîne une diminution de la toxicité et cela est probablement dû à la forte électronégativité de ce substituant.

Le 3-chloro-BNT et le 4-bromo-BNT sont plus toxiques pour les gammares que le Niclosamide et le BNT.

2. Action des trois produits au niveau des tissus :

Après un contact de 4 jours à une dose sub létale de produit, l'intestin moyen et les caecums hépatopancréatiques des gammares présentent une nécrose partielle ou totale de l'épithélium. La nécrose cellulaire est moins intense au niveau de l'appareil génital et de l'épithélium externe.

Lorsque les survivants sont remis dans une eau normale, une reconstitution épithéliale survient selon des modalités qui varient pour chaque organe.

Nos recherches n'ont porté que sur quatre animaux par toxique et sur une période assez courte (18 jours). Il serait donc nécessaire d'effectuer des recherches complémentaires avec un nombre de gammares plus important et sur une plus longue durée afin de confirmer les résultats obtenus.

BIBLIOGRAPHIE

- BOUIX-BUSSON, D., RONDELAUD, D., BARTHE, D., 1985.- L'infestation de *Lymnaea glabra* Müller par *Fasciola hepatica* L. I. Etude des lésions de la glande digestive et du rein chez de jeunes Mollusques. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **60**, 571-585.
- BOUIX-BUSSON, D., RONDELAUD, D., BARTHE, D., 1985.- L'infestation de *Lymnaea glabra* Müller par *Fasciola hepatica* L. II. Etude comparative des lésions présentées par la gonade et la glande de l'albumine chez de jeunes Mollusques. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **60**, 587-599.
- 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.
- DEBORD, J., 1988.- Relation structure chimique-activité biologique pour quelques phosphoramides et benzamides. Thèse Doct. Univ. Poitiers, Chimie Organique, n° 192, 123 p.

- FERGUSON, D.E, LUDKE, J.L., WOOD, J.P., PRATHER, J.W., 1965.- The effect of mud on the bioactivity of pesticides on fishes. *J. Mississippi Acad. Sci.*, **11**, 219-228.
- FRUGNAC, C., 1994.- Étude comparative du Niclosamide et du 3,5-dichloro-2-benzamido-5-nitrothiazole. Activité molluscicide et conséquences histopathologiques. Thèse Doct. Pharmacie, Limoges, 78 p.
- GADY, S., 1994.- Activité molluscicide et conséquences histopathologiques du 3,4-dichloro-2-benzamido-5-nitrothiazole. Étude comparative avec le Niclosamide. Thèse Doct. Pharmacie, Limoges, 75 p.
- GAYRAL, P., CAVIER, R., 1977.- Actualités et perspectives d'avenir des molluscicides. 177-209. In : "Activités en chimie thérapeutique". 5^e série. Société de Chimie Thérapeutique éd., Paris.
- GRAF, F., 1969.- Le stockage de calcium avant la mue chez les Crustacés Amphipodes *Orchestia* (Talitridé) et *Niphargus* (Gammaride hypogé). Thèse Doct. ès-Sci. Nat., Dijon, n° 105, 216 p.
- GRASSE, P.P, POISSON, R.A., TUZET, O., 1970.- Précis de Zoologie. I. Invertébrés. Masson et Cie, Paris, 935 p.
- HOBROUGH, J.E., 1973.- The effects of pollution on *Gammarus pulex* (L.) subsp. *pulex* (Schellenberg) in the inlet streams of Rostherne Mere, Chershire. *Hydrobiologia*, **41**, 13-35.
- LAJUGIE, J.P., 1992.- Impact *in vitro* de l'utilisation de quelques dérivés molluscicides du 2-benzamido-5-nitrothiazole sur un Amphipode dulçaquicole *Gammarus pulex pulex* L. Thèse Doct. Pharmacie, Limoges, n° 317, 145 p.
- LECLERC, H., DIVE, D., 1982.- Les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique. Méthodologie. Standardisation. Interprétation. Colloque I.N.S.E.R.M., Lille, n° 106, 600 p.

- LEVEQUE, C., 1990.- Impact de la lutte antivectorielle sur l'environnement aquatique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **65**, Suppl. 1, 119-124.
- LIGHTNER, D.V., 1978.- Possible toxic effects of the marine blue-green alga, *Spirulina subsalsa*, on the blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. *J. Invert. Pathol.*, **32**, 139-150.
- MACCARIO, J., 1978.- Sur le traitement statistiques des courbes doses-réponses dans le cas des réponses "tout ou rien". Thèse Doct. ès. Sci. Pharm., Univ. Paris-Sud, n° 77, 119 p.
- MACCARIO, J., DIDRY, J.R., AUGET, J.L., 1980.- Méthode de comparaison des courbes doses-réponses dans le cas où les paramètres ne sont pas estimables. *Rev. Stat. Appl.*, **28**, 51-61.
- MADULO-LEBLOND, G., GAYRAL, P., GUILLAUMEL, J., CLAVEL, J.M., DEMERSEMAN, P., ROYER, R., 1981.- Recherches sur les dérivés nitrés d'intérêt biologique. XXIII. Nouvelles données relatives aux propriétés molluscicides des dérivés halogénés du benzamido-2 nitro-5 thiazole. *Eur. J. Med. Chem.*, **16**, 267-270.
- McCULLOUGH, F.S., GAYRAL, P., DUNCAN, J., CHRISTIE, J.D., 1981.- Les molluscicides dans la lutte contre la schistosomiase. *Bull. O.M.S.*, **59**, 17-26.
- PACAUD, A., 1945.- Données d'ensemble sur la répartition géographique des Gammarés dans les eaux continentales françaises. *C. R. Sci. Soc. Biogéogr.*, **190**, 1-7.
- REBIERE, H., 1985.- Toxicité comparée de l'action de quatre sels métalliques ($ZnCl_2$, $BaCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_3$) et d'un composé organique de synthèse, le Frescon® sur deux Mollusques Gastéropodes (*Lymnaea glabra*, *Potamopyrgus jenkinsi*) et deux Crustacés Amphipodes (*Gammarus pulex*, *Echinogammarus berilloni*) d'eau douce. Thèse Doct. Pharmacie, Limoges, n° 4, 212 p.

- RENAUDIN, M.C., 1987.- Action d'un insecticide organosphoré, le méthyl-parathion, sur un Crustacé Amphipode, *Gammarus pulex*. Thèse Doct. Pharmacie, Limoges, n° 325, 86 p.
- ROUX, A., 1967.- Les Gammares du groupe *pulex* (Crustacés Amphipodes). Essai de systématique biologique. Thèse Doct. ès-Sci. Nat., Lyon, n° 447, 135 p.
- SCHELLENBERG, A., 1925.- *Echinogammarus berilloni* Catta, ein bewohner dentscher Geuraesser. *Zool. Anz.*, **62**, 327-328.
- SPARKS, A.K., 1985.- Synopsis of invertebrate pathology exclusive of insects. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam-Oxford-New York, 423 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* Koch. Relations structure-activité quantitative. Thèse Doct. Univ. Limoges, Sci. Nat., n° 46, 129 p.
- VIGNOLES, P., DREYFUSS, G., LAJUGIE, J.P., PENICAUT, B., RONDELAUD, D., VINCENT, M., 1990.- Lutte antivectorielle dans la distomatose à *Fasciola hepatica* L. II. Toxicité *in vitro* de quelques dérivés molluscicides du benzamido-2 nitro-5 thiazole sur *Gammarus pulex pulex* L. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, **8**, 271-276.
- VINCENT, M., 1971.- Ecologie et écophysiologie des Gammarides épigés du Centre-ouest. Thèse Doct. ès-Sci. Nat., Limoges, n° 712, 131 p.

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE PREMIER : Rappels généraux	3
I. - Les essais de toxicité sur une espèce cible	3
A. Pourquoi faut-il évaluer de nouveaux produits ?	3
B. Que faut-il utiliser comme espèce-cible ?	4
C. Comment procède-t-on aux essais ?	5
1. Les différents types d'essais	5
a) Essais en laboratoire	5
b) Essais sur le terrain	6
2. Expression des résultats	6
D. Comment peut-on renouveler les essais ?	6
1. Principe de l'expérience standard	6
2. Facteurs pouvant influencer les résultats	7
a) Facteurs propres au matériel animal	7
b) Facteurs propres au milieu environnant	7

	Pages
II. - Le gammare, espèce cible	8
A. Les différentes espèces dulçaquicoles	8
B. <i>Gammarus pulex pulex</i>	9
1. Position systématique	9
2. Morphologie générale	9
3. Caractères propres à <i>G. p. pulex</i>	11
4. Données biologiques	11
C. Maintenance au laboratoire	13
III. - Le comportement du gammare en présence de pesticides	13
A. En présence d'organophosphorés	13
B. En présence de Niclosamide	14
C. En présence du BNT et de ses dérivés halogénés	15
CHAPITRE DEUXIEME : Matériel et méthodes	17
I. - Matériel animal : <i>Gammarus pulex pulex</i>	17
II. - Produits utilisés	19
III. - Protocole expérimental	21
A. Détermination des CL ₅₀ pour chaque produit	21
B. Etudes histopathologiques	21
IV. - Méthodologie	22
A. Technique d'élevage des gammares	22
B. Préparation des solutions	22
C. Exposition des animaux au toxique	22
D. Sacrifice des animaux	24
E. Technique histologique	24
V. - Paramètres de toxicité	25
VI. - Expression des résultats	25
CHAPITRE TROISIEME : Résultats	28
I. - Données toxicologiques	28
A. Valeurs des CL ₅₀ (en µmol/l)	28

	Pages
B. Comparaison avec d'autres dérivés du BNT	31
1. Comparaison avec les dérivés chlorés	31
2. Comparaison avec les dérivés bromés	32
3. Comparaison avec les dérivés fluorés	32
4. Comparaison en fonction du substituant halogéné pour une même position	32
5. Autres remarques	33
II. - Observations histopathologiques	33
A. Rappels sur l'anatomie interne du gammare	33
B. Structure de quelques viscères chez les témoins	36
1. L'intestin moyen et les deux types de caecums	36
2. Les gonades	38
3. Les branchies	38
C. L'action des trois produits	38
1. Etude descriptive des lésions	38
2. Evolution des lésions	43
a) Au quatrième jour	43
b) Au dix-huitième jour	44
CHAPITRE QUATRIEME : Discussion	45
I. - Synthèse des résultats	45
II. - Commentaires sur la toxicologie	46
III. - Commentaires sur l'histopathologie	47
A. Le site des lésions	48
B. L'intensité des lésions	49
Résumé et conclusions	51
Bibliographie	53
Sommaire	57

-oOo-



Titre : ETUDE DE LA TOXICITE *in vitro* ET DES CONSEQUENCES HISTOPATHOLOGIQUES INDUITES PAR TROIS DERIVES DU 2-BENZAMIDO-5-NITRO-THIAZOLE SUR *Gammarus pulex pulex* L. Par Valérie FIALIP.

Les études présentées dans ce mémoire ont permis de déterminer la toxicité *in vitro* de trois dérivés halogénés du 2-benzamido-5-nitrothiazole (3-chloro-BNT, 4-bromo-BNT, 2,6-difluoro-BNT) et d'analyser leurs conséquences histopathologiques sur une espèce animale représentative de la faune aquatique : *G. p. pulex*.

La détermination de la CL₅₀ a été réalisée pour chaque produit. La valeur de ce paramètre diminue progressivement lorsque la durée de l'exposition s'accroît.

Les dérivés bromé et chloré ont une toxicité voisine; le dérivé bifluoré présente une toxicité nettement inférieure.

La comparaison de nos résultats a été réalisée avec les données des auteurs qui ont étudié la toxicité d'autres dérivés du BNT chez *G. p. pulex*. Elle confirme leurs interprétations. Les produits les plus toxiques possèdent un substituant en position *méta* et sont généralement bisubstitués. Toutefois une substitution par un ou plusieurs atomes de fluor entraîne une diminution de la toxicité et cela est probablement dû à la forte électronégativité de ce substituant.

Le 3-chloro-BNT et le 4-bromo-BNT sont plus toxiques pour les gammares que le Niclosamide et le BNT non substitué.

L'étude histopathologique montre qu'après un contact de 4 jours à une dose sub létale de produit, l'intestin moyen et les caecums hépatopancréatiques des gammares présentent une nécrose partielle ou totale de l'épithélium. La nécrose cellulaire est moins intense au niveau de l'appareil génital et de l'épithélium externe.

Lorsque les survivants sont remis dans une eau normale, une reconstitution épithéliale survient selon des modalités qui varient pour chaque organe.

Mots clés : Amphipode. 2-benzamido-5-nitrothiazole. Crustacé. *Gammarus pulex*. Histopathologie. Toxicologie.