

UNIVERSITÉ DE LIMOGES
FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1994



Thèse n° 62

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 12 décembre 1994

par

Florence CHARRIERAS

née le 5 juin 1969 à BRIVE (19)

**INFLUENCE DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES SUR
LA TOXICITÉ DE QUELQUES DÉRIVÉS DU
2-BENZAMIDO-5-NITROTHIAZOLE VIS-À-VIS
D'Euglena gracilis Klebs**

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Monsieur le Professeur J.A. NICOLAS Président
Monsieur le Professeur B. PÉNICAUT Juge
Monsieur G. DREYFUSS, Maître de Conférences Juge
Monsieur D. RONDELAUD, Maître de Conférences Juge
Monsieur P. VIGNOLES, Maître de Conférences Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

- **DOYEN DE LA FACULTE** : Monsieur le Professeur **RABY Claude**
- **ASSESEURS** : Monsieur le Professeur **GHESTEM Axel**
 Monsieur **DREYFUSS Gilles**, 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 |
| HABRIOUX Gérard | Biochimie |
| LACHATRE Gérard | Toxicologie |
| LEFORT DES YLOUSES Daniel | Pharmacie Galénique |
| MOESCH Christian | Hygiène |
| LOUDART Nicole | Pharmacodynamie |
| PENICAUT Bernard | Chimie Analytique et Bromatologie |
| RABY Claude | Pharmacie Chimique et Chimie Organique |

SECRETARE 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 thèse.

Veillez y trouver l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

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 et juger ce travail.

Nous avons été très sensible à l'aide
que vous nous avez toujours apportée.

Nous vous remercions pour les
conseils que vous nous avez prodigués
pendant nos expérimentations et lors de
l'élaboration de ce document.

A notre juge

Monsieur le Professeur B. PENICAUT

Service de Chimie Analytique,

Nous vous sommes reconnaissante
pour les critiques et les conseils que vous
nous avez prodigués lors de la réalisation de
ce travail.

Nous vous remercions d'avoir eu
l'amabilité de bien vouloir juger cette thèse.

A nos juges

Monsieur le Docteur D. RONDELAUD

Maître de Conférences,

Service d'Histologie,

Faculté de Médecine,

Monsieur le Docteur P. VIGNOLES

Maître de Conférences,

Service de Biophysique-Informatique,

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 Mme R. MOUZET,

pour sa gentillesse et son aide amicale.

- à M. H. HOJA,

pour le temps passé mettre en forme ce document.

- à M. M. TRIHI,

pour son accueil chaleureux et son aide amicale.

A Vincent,

A mes parents,

A mon frère,

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

**Je leur dédie affectueusement cette
thèse.**

INTRODUCTION

Les molluscicides constituent un ensemble de produits destinés à lutter contre les mollusques vecteurs de parasitoses humaines ou animales. Ces mollusques sont des hôtes intermédiaires des parasites et jouent un rôle, à un moment donné, dans leur cycle évolutif.

Ces maladies ont des répercussions considérables en matière de pathologies humaines : d'après des enquêtes épidémiologiques menées par l'OMS, 40 % des maladies tropicales sont des bilharzioses. Elles se retrouvent aussi chez des animaux d'élevage : de nombreux ovins et bovins sont atteints par ces parasitoses. Ce fléau entraîne des conséquences économiques importantes.

Actuellement, peu de molécules sont disponibles. L'une d'entre elles est encore utilisé sur le terrain : le Niclosamide (Bayluscide[®]). Un autre produit, la N-trityl-morpholine (Frescon[®]) a très vite été abandonnée du fait de sa rémanence importante et de sa grande toxicité sur des espèces animales et végétales non cibles. Le problème avec les composés actuels réside dans leur impact qui n'est pas spécifique et qui touche à des degrés variables la faune et la flore. Il est donc intéressant de rechercher des produits plus sélectifs pour leur cible et moins toxiques pour l'environnement.

Des travaux antérieurs ont été réalisés depuis quelques années à Limoges sur le 2-benzamido-5-nitrothiazole (BNT) afin d'étudier son activité molluscicide ou antiparasitaire. Plusieurs thèses et publications décrivent l'efficacité de ce produit et d'un certain nombre de dérivés halogénés (DUFOUR, 1989 ; VIGNOLES, 1990 ; GRENAILLE, 1991 ; LACOUTURE, 1991 ; LAJUGIE, 1992 ; TARDIEU, 1994 ; VIGNOLES *et al.*, 1990, 1991, 1994). Notre étude s'inscrit dans la continuité de ces travaux car nous nous sommes proposé d'étudier l'influence des conditions expérimentales sur :

- la culture d'*Euglena gracilis*,
- la préparation des solutions de BNT ou de ses dérivés,
- l'intoxication des euglènes par l'un de ces produits.

Le plan adopté est le suivant :

- * Chapitre premier : Etude du matériel biologique : l'Euglène
- * Chapitre deuxième : Propriétés des molluscicides et incidence sur l'environnement
- * Chapitre troisième : Matériel et méthodes
- * Chapitre quatrième : Résultats
- * Chapitre cinquième : Discussion

LE MODÈLE ÉTUDIÉ : *EUGLENA GRACILIS*

Tout le règne animal et le règne végétal se sont développés phylogénétiquement à partir d'êtres vivants unicellulaires (BOURRELY, 1970). Ces derniers ont évolué jusqu'à l'heure actuelle, de la même façon que les organismes pluricellulaires.

Les euglènes sont des algues unicellulaires flagellées, très communes dans les eaux douces. Parmi elles, nous nous sommes intéressé à l'espèce *E. gracilis*. Cette dernière constitue un matériel de choix pour les études sur la physiologie cellulaire (besoins nutritifs, croissance, etc).

Dans un premier paragraphe, nous définirons la position systématique d'*E. gracilis*. Dans le second, nous présenterons la structure et la morphologie de cette algue à partir de textes généraux extraits de l'ENCYCLOPEDIA UNIVERSALIS (1988).

I. CLASSIFICATION

La littérature permet de classer *E. gracilis* de la manière suivante :

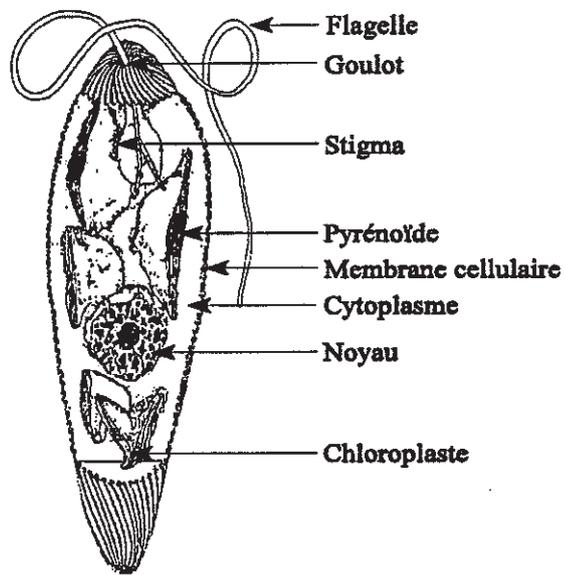


Figure 1 : Schéma d'*Euglena gracilis* d'après BOURRELY (1970)

Phylum : Chromophytes
Embranchement : Pyrrophytes
Classe : *Euglenophyceae*
Famille : *Euglenidae*
Genre : *Euglena*
Espèce : *gracilis* Klebs 1883
Variété : Z

II. DESCRIPTION

L'euglène se présente comme un organisme unicellulaire de couleur verte. Ses dimensions sont de $50 \mu\text{m} \times 12 \mu\text{m}$ lorsque l'algue est fusiforme (à pH 3,5) ; par contre, à pH 7,2, elle a une forme en bâtonnet (GORENFLOT, 1975). Parfois, elle se présente groupée en colonies. L'examen microscopique permet de distinguer un certain nombre de structures (figure 1).

A. CYTOLOGIE

1. La paroi

Les euglènes sont dépourvues d'une paroi squelettique rigide mais le corps est entouré d'un tégument souple et élastique.

Cette paroi, de nature essentiellement protéique, permet à la cellule de se déformer en s'étirant, se contractant ou se distordant. Cette membrane est appelée pellicule ou périplaste et est formée de structures cytoplasmiques associées à la membrane cellulaire.

Elle présente diverses ornementsations qui dessinent des bandelettes parallèles disposées en hélices et qui sont constituées de sillons et de crêtes. Ces dernières s'étendent de la partie antérieure de la cellule à la partie caudale. Elles sont situées sous la membrane cytoplasmique et séparées les unes des autres par des sillons plus ou moins profonds. Au moment de la division cellulaire, une nouvelle crête se développe dans chaque sillon compris entre deux crêtes préexistantes.

| Organites cytoplasmiques | Composante | Description | Observations |
|----------------------------|----------------|---|---|
| Appareil cinétique | Réservoir | Situé à l'extrémité antérieure de la cellule. Il s'ouvre à l'extérieur par le cytostome | Il contient les flagelles |
| | Flagelle court | Sa caractéristique est qu'il ne sort pas du réservoir et se fixe à l'autre flagelle au niveau du photorecepteur. | Les deux flagelles prennent naissance sur des blépharoplastes localisés auprès du réservoir. Chaque flagelle comprend un axonème avec 9 doublets périphériques, 2 doublets centraux et une gaine dilatée sur le côté. |
| | Flagelle long | Onduleux et actif. Sa partie libre est pourvue de mastigonèmes disposés en file hélicoïdale | |
| Les plastes | Structure | Disques lenticulaires de couleur vert-jaunâtre composés d'une double membrane et d'un stroma plastidial. | Composés de 50 % d'eau, de protéines (35 à 55 % du poids sec), de glucides (15 à 30 %) et de lipides (20 à 30 %). |
| | Inclusions | Composés de sacs membranaires aplatis contenant des pigments chlorophylliens et caroténoïdes. Lors de la photosynthèse, les euglènes synthétisent le paramylon (voisin de l'amidon) | Le paramylon est localisé à l'extérieur des plastes et formes des réserves glucidiques importantes. |
| | Annexes | Le pyrénioïde central | Rôle mal connu. Il interviendrait dans la synthèse des polysaccharides à poids moléculaire élevé. |
| | | Stigma (rouge en microscopie photonique) | Sensible aux radiations lumineuses. Constitué de gouttelettes lipidiques colorées par les pigments caroténoïdes. |
| Les vacuoles et inclusions | Pulsatiles | Situées dans une région déterminée du cytoplasme. Elles expulsent leur contenu à l'extérieur pour se reformer immédiatement | Régulent la pression osmotique et éliminent l'eau en excès comme les produits du métabolisme |
| | Digestives | L'algue ingère des proies solides | - |
| | Autres | Gouttelettes lipidiques Corps mucifères | - |

Tableau I : Quelques organites cytoplasmiques d'*Euglena gracilis* et leurs principales caractéristiques (d'après ENCYCLOPEDIA UNIVERSALIS, 1988).

2. Le noyau

Placé le plus souvent au centre de la cellule, le noyau est volumineux et de forme sphérique ou allongée. Il est limité par une membrane nucléaire qui persiste au moment de la division cellulaire. Il contient un ou plusieurs endosomes ou caryosomes (nucléoles persistants pendant la division).

Les chromosomes restent à l'état condensé et demeurent visibles pendant tout le cycle nucléaire. La phase de division débute par la migration du noyau vers la région antérieure de la cellule. Lors de la division cellulaire, un faisceau de microtubules s'organise près des chromosomes. La multiplication est un phénomène asexué.

3. Autres constituants cellulaires

Le tableau I répertorie les principaux organites et précise quelques unes de leur caractéristiques.

Mais il existe d'autres constituants. Parmi ces derniers, il est intéressant de considérer :

- Le chondriome : il est formé d'un réticulum ramifié et grêle. Sa morphologie est encore mal connue, cependant on sait qu'il dessine des mailles irrégulières autour des chloroplastes, du noyau et du réservoir. Ce chondriome semble être formé d'une multitude de petites mitochondries, sphériques ou en bâtonnets dispersées dans toute la cellule.

Comme tous les organismes eucaryotes, la cellule renferme aussi des ribosomes et un réticulum endoplasmique. Ce dernier s'étend en une nappe sous-pelliculaire dans toute la cellule.

- L'appareil de Golgi, formé de dictyosomes épais, est constitué par l'empilement de saccules. Certains sont associés à la vacuole pulsatile. Il a une activité hypersécrétoire au début de la division cellulaire.

B. BIOCHIMIE

Chez l'euglène, on peut caractériser deux grands points du métabolisme : les éléments responsables des réactions biochimiques et ceux issus de ces transformations (GORENFLOT, 1975). Nous nous sommes intéressé, dans le premier cas, aux seules structures permettant de capter l'énergie lumineuse (les pigments) et, dans le deuxième cas, aux polysaccharides synthétisés.

1. Pigments des plastes

Parmi ces pigments, on peut distinguer deux familles : les chlorophylles et les dérivés caroténoïdes.

a. Les chlorophylles

Ces pigments sont obtenus à l'état brut par broyage et macération d'algues dans l'alcool ou l'acétone. Les cellules contiennent deux types de chlorophylle. La chlorophylle a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) est la plus fréquente. Ce pigment est responsable de la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique. On la trouve dans toutes les algues. La chlorophylle b ($C_{55}H_{72}O_6N_4Mg$) existe dans les cellules en plus petite quantité que la précédente.

b. Les pigments caroténoïdes

Chez les algues, Les pigments caroténoïdes sont toujours associés aux chlorophylles. Ils sont composés de carotènes ($C_{40}H_{56}$) et de leurs dérivés oxygénés : les xanthophylles. On trouve surtout, dans les chloroplastes des algues, le carotène β et des xanthophylles plus riches en oxygène que celles des plantes supérieures.

Ces pigments sont présents dans les cellules mobiles, animées de phototactisme.

2. Produits issus du métabolisme

Les chromophytes sont caractérisées par leur incapacité à synthétiser l'amidon. Ainsi les euglénophycées contiennent le paramylon. Les gouttelettes lipidiques peuvent, elles aussi, être des produits du métabolisme. Elles constituent le produit de la photosynthèse le plus facile à mettre en évidence.

C. BIOLOGIE

A partir de textes généraux, nous allons présenter la biologie d'*E. gracilis*. Nous examinerons successivement la reproduction de cette algue, sa mobilité et son comportement nutritionnel.

1. Reproduction

La reproduction asexuée se fait par scissiparité longitudinale de la cellule. Elle est précédée par la duplication de la cinétide. Cette division cellulaire se poursuit au niveau du réservoir et s'étend vers l'extrémité caudale en suivant des interbandes cuticulaires. L'appareil pharyngien disparaît en début de la mitose et se reforme par la suite dans chaque cellule fille. Chaque cellule reçoit la moitié des bandes cuticulaires ; de nouvelles crêtes se formeront au cours de la croissance. Pendant la division, il y a partage du matériel génétique entre les deux cellules filles.

La reproduction sexuée n'a pas été mise en évidence chez *E. gracilis*.

2. Mobilité

Chez les euglènes, la progression est une nage selon une trajectoire hélicoïdale. Les différents mouvements qui animent les algues sont dus à des déformations des bandes cuticulaires. Dans des conditions défavorables, les euglènes cessent tout mouvement, s'arrondissent et s'entourent d'une épaisse couche de mucilage formant une enveloppe kystique. Il faut noter que le pH est un facteur important car il conditionne la mobilité de l'algue : à pH 3,5, les cellules

présentent une mobilité réduite au début de l'expérience alors qu'à pH 7,2, les cellules sont très mobiles.

3. Nutrition

Les euglènes peuvent être phototrophes, hétérotrophes, phagotrophes (OUTIFRAKH, 1984).

Toutes sont photo-auxotrophes et ont besoin de vitamines pour croître (B_1 , B_{12}). Bien qu'*E. gracilis* possède de nombreux chloroplastes contenant de la chlorophylle et des pigments caroténoïdes permettant une activité photosynthétique en présence de radiations lumineuses, elle est hétérotrophe facultatif. En effet, les euglènes sont capables de se développer à l'obscurité si le milieu est enrichi de substances organiques.

Cultivées à l'obscurité, les euglènes s'étiolent. Elles perdent alors leurs chloroplastes qui se transforment en proplastides par perte de la structure lamellaire et des pigments.

Remises à la lumière, les algues reprennent leur métabolisme initial : elles régénèrent les lamelles et resynthétisent de la chlorophylle. Cette reprise a lieu après une phase de latence de 3 à 12 h. La transformation est donc réversible. Cependant, les algues restent définitivement incolores lorsqu'elles subissent l'action de divers facteurs physiques (rayons ultraviolets, températures extrêmes) ou chimiques (antibiotiques). Ces traitements sont donc capables d'inhiber la multiplication des plastides. Les cellules deviennent alors hétérotrophes strictes aplastidiées.

4. Écologie

Les besoins nutritifs des euglènes expliquent leur abondance dans les eaux riches en substances organiques. Elles sont nombreuses dans les étangs, les mares, les fossés, sur les fonds boueux ou sur la terre humide. De plus, elles peuvent supporter des variations de pH importantes (de 3,5 à 9).

Soumis à un rythme régulier d'éclairement, *E. gracilis* présente une très bonne synchronisation naturelle due au fait que la plupart des synthèses ont lieu au moment de la période

lumineuse. Si la durée de la photopériode est bien choisie, les divisions cellulaires se font en période nocturne.

Les euglènes sont de bons indicateurs de pollution, en raison de leur sensibilité aux agents physiques et chimiques. Elles apparaissent donc un matériau biologique intéressant dans le cadre de l'étude que nous avons entreprise.

PROPRIÉTÉS DES MOLLUSCICIDES ET INCIDENCE SUR L'ENVIRONNEMENT

Dans ce chapitre, nous rappèlerons des généralités concernant les molluscicides en nous appuyant sur les résultats parus dans la littérature. La première partie présentera successivement l'intérêt de l'utilisation des molluscicides, les parasitoses concernées et la lutte contre ces dernières. Dans le second paragraphe, nous étudierons les différents types de molluscicides en précisant notamment leur origine. Nous terminerons ce chapitre en montrant l'importance de l'impact des molluscicides sur l'environnement.

I. GÉNÉRALITÉS

A. POURQUOI UTILISER CES MOLÉCULES ?

Les mollusques jouent un rôle de première importance dans la transmission de certaines maladies parasitaires. Le contrôle des populations de mollusques, hôtes intermédiaires, est donc un moyen de lutter contre de nombreuses parasitoses : en interrompant le cycle évolutif des

parasites, on supprime le risque d'infestation de l'homme et la lutte molluscicide peut se révéler être un procédé prophylactique très intéressant.

A l'heure actuelle, le marché des molluscicides est très limité en raison de leur absence de sélectivité vis-à-vis des espèces cibles. Comme il n'existe pas de molluscicides que l'on puisse utiliser dans toutes les situations épidémiologiques, le produit à employer sera donc choisi en fonction de certaines caractéristiques : la cible, l'incidence sur la faune et la flore, et le coût de son utilisation.

B. QUELS SONT LES PARASITES CONCERNÉS ?

Les mollusques interviennent très souvent dans le cycle biologique de parasites. Ce sont des hôtes intermédiaires alors que l'homme et les animaux domestiques sont les hôtes définitifs. Deux grandes familles de parasites ayant des mollusques comme hôtes intermédiaires sont bien connues :

1. Les douves

Plusieurs espèces sont responsables de ces maladies parasitaires.

La grande Douve (*Fasciola hepatica*) est un parasite cosmopolite qui se rencontre chez les herbivores domestiques. Elle provoque la distomatose hépatobiliaire qui est une maladie caractérisée par un affaiblissement et une cachexie. Cette parasitose doit donc être systématiquement dépistée et traitée pour des raisons économiques. Il est exceptionnel que l'homme s'insère dans le cycle parasitaire en consommant du cresson sauvage pollué par les déjections des animaux contaminés. L'hôte intermédiaire de *F. hepatica* est le mollusque *Lymnaea truncatula* (EUZEBY, 1971).

On peut citer aussi la petite Douve (*Dicrocoelium dendriticum*). Ce parasite est fréquent dans les voies biliaires des Mammifères herbivores et il est responsable, lui aussi, de la distomatose. Le cycle de développement de ce parasite fait intervenir deux hôtes intermédiaires : un Mollusque et un Insecte. Le premier est un Pulmoné terrestre appartenant au genre *Cochlicopa*, *Helicella* ou *Zebrina*. L'autre est une fourmi.

| <i>Schistosoma</i> | Maladie | Localisation géographique | Mollusque hôte |
|---------------------|-----------------------------|---|--|
| <i>haematobium</i> | Bilharziose vésicale | Afrique, Moyen-Orient, Inde | Bulins, souvent <i>Bulinus truncatus</i> |
| <i>intercalatum</i> | Bilharziose rectale | Afrique centrale | Bulins |
| <i>japonicum</i> | Bilharziose artérioveineuse | Extrême-Orient | <i>Oncomelania sp</i> |
| <i>mansoni</i> | Bilharziose intestinale | Antilles, Amérique du Sud, Afrique, Proche- et Moyen-Orient | <i>Biomphalaria sp</i> |

Tableau II : les quatre types de bilharzioses.

2. Les schistosomes

Ce sont des Vers appartenant au genre *Schistosoma*. Ces parasites provoquent des bilharzioses qui sont très fréquentes en pays tropicaux. Cette maladie, dont l'évolution est lente, est due à la pénétration transcutanée du parasite. Ces parasitoses atteignent 200 à 300 millions d'individus et occupent, après le paludisme, le second rang des grandes endémies tropicales et subtropicales. Leur répartition géographique est en relation directe avec la présence de mollusques hôtes intermédiaires.

Le tableau II répertorie les quatre espèces de *Schistosoma* qui sont reconnues chez l'homme et qui ont des hôtes intermédiaires différents.

La lutte contre les mollusques hôtes constitue donc un des éléments essentiels dans le contrôle des maladies parasitaires.

C. QUELLES SONT LES MÉTHODES DE LUTTE ?

On peut pratiquer la lutte au moyen de substances chimiques qui tuent les mollusques et souvent aussi leurs œufs, ou bien utiliser divers procédés qui contrarient le développement et empêchent la pullulation des mollusques.

1. Lutte chimique

Les mollusques, du fait de la minceur de leurs téguments, sont très sensibles aux substances toxiques répandues dans l'eau. Par conséquent, ces produits peuvent alors agir à des concentrations très faibles. La lutte chimique est un procédé qui peut s'avérer efficace. Cependant, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de molluscicide spécifique, c'est-à-dire toxique uniquement sur une ou plusieurs espèces de mollusques cibles. De plus, ce sont des substances chimiques qui ont très souvent des effets secondaires indésirables sur la faune et la flore.

La lutte contre les parasitoses consiste aussi à limiter la dissémination des fèces de l'homme. D'autre part, il faut réduire la contamination humaine par l'éducation sanitaire et traiter les porteurs de parasitose par une chimiothérapie.

Les qualités requises d'un molluscicide idéal sont les suivantes (GAYRAL et CAVIER, 1977 ; LEVEQUE, 1990) :

- 1 être toxique pour les différentes espèces d'hôte intermédiaire des parasites humains et animaux.
- 2 être actif à faibles concentrations sur tous les stades de développement du mollusque (œuf, jeune, adulte).
- 3 être stable dans l'eau et vis-à-vis du substrat.
- 4 n'être que très peu absorbé par les végétaux aquatiques.
- 5 ne pas être toxique pour l'homme, ni pour les animaux domestiques aux concentrations molluscicides.
- 6 ne pas donner de résidus toxiques dans les cultures.
- 7 ne pas être toxique pour la flore et la faune des collections d'eau où vivent les mollusques à détruire.
- 8 être de manipulation facile et sans danger.
- 9 être bon marché et de bonne conservation.
- 10 ne pas induire à long terme un déséquilibre des écosystèmes dans les conditions normales d'application.

Actuellement, la destruction des mollusques est souvent obtenue par une association de molluscicides et de mesures physiques visant à modifier le milieu pour le rendre inhospitalier aux mollusques. Mais la pollution du milieu, le remplacement par une autre population de mollusques plus envahissante et le déséquilibre de l'écosystème sont les principaux facteurs à redouter.

Toutes ces caractéristiques idéales ne se retrouvent pas simultanément dans les molluscicides actuels. C'est pourquoi les chercheurs continuent à évaluer l'activité molluscicide des produits nouvellement synthétisés.

Aussi, des travaux effectués sur le terrain comme ceux de RONDELAUD (1986, 1988 a, 1988 b) ont permis de mettre en évidence ces différents points. Par épandage d'un molluscicide choisi (chlorure de cuivre) et par introduction, dans le milieu, de mollusques prédateurs, l'auteur a défini l'impact de la lutte chimique et de la lutte biologique sur une population de Limnées tronquées au cours du temps.

2. Lutte biologique

La fréquence d'apparition des mollusques dépend de plusieurs facteurs dont :

- Les caractères physico-chimiques de l'eau où ils vivent, sa teneur en composés organiques ou son débit.
- La végétation aquatique dont la présence favorise l'alimentation et sert de support aux pontes.

Aussi, des procédés agissant sur ces différents paramètres sont-ils utilisés pour rendre la vie des mollusques impossible et diminuer leur nombre :

- Les mares et les marais servant de gîtes aux mollusques peuvent être desséchés. Les canaux d'irrigation et de drainage doivent être conçus et installés de façon à empêcher le développement des mollusques. La solution idéale serait d'établir un réseau souterrain : cette méthode présente le double avantage d'éliminer à coup sûr les hôtes vecteurs et de soustraire le réseau à la pollution. L'inconvénient reste le prix élevé de l'installation.
- On peut aussi planter des végétaux toxiques pour les mollusques le long des canaux. C'est le cas de *Balanites aegyptiaca* qui contient un principe toxique. La chute spontanée de ses fruits dans l'eau pourrait suffire à tuer les mollusques mais aussi les poissons.
- Des animaux destructeurs de mollusques tels que certains Oiseaux aquatiques, des Poissons ou des Crustacés peuvent être acclimater dans les gîtes.
- Même si elles ne sont pas modifiables, les conditions climatiques (éclairage, température, précipitations) jouent également un rôle important sur la croissance de la population des mollusques. L'activité humaine peut aussi favoriser ou limiter la pullulation des mollusques.

Si des moyens mécaniques sont parfois utilisables pour lutter contre certaines parasitoses, dans beaucoup de cas, le contrôle des vecteurs par l'utilisation de pesticides est le seul moyen d'interrompre la transmission.

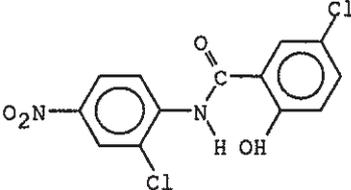
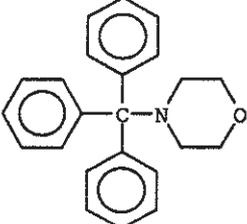
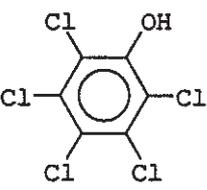
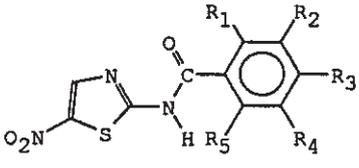
| Produits | Propriétés et mécanisme d'action |
|--|---|
| <p>Niclosamide</p>  | <ul style="list-style-type: none"> - insoluble dans l'eau ; - transfère les protons à travers la membrane interne de la mitochondrie ce qui provoque l'inhibition de la synthèse d'ATP ; - très toxique pour les mollusques et leurs oeufs ; - 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). - ténicide très actif. |
| <p>N-trityl-morpholine</p>  | <ul style="list-style-type: none"> - insoluble dans l'eau ; - stable aux différents facteurs de l'environnement : lumière solaire, végétation, boues ; - non actif en milieu acide car il s'hydrolyse en dérivés inactifs ; - effet rémanent de l'ordre de 3 semaines dans les milieux favorables ; - 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 ; - actif sur les mollusques jeunes et adultes mais pas sur les oeufs. |
| <p>Phénols halogénés</p>  | <ul style="list-style-type: none"> - Ils inhibent la synthèse d'ATP (CORBETT, 1974) : mécanisme d'action identique à celui du niclosamide au niveau de la membrane interne de la mitochondrie en raison de l'existence de la fonction phénol ; - les substituants halogénés, éléments électro-attracteurs, permettent d'augmenter l'acidité de cette fonction ; - le cycle benzénique assure, quant à lui, la lipophilie nécessaire à la molécule pour la diffusion membranaire ; - ils sont sensibles à la lumière, peu rémanents et non sélectifs. |
| <p>Dérivés métalliques : Cu²⁺, Fe²⁺</p> | <ul style="list-style-type: none"> - poisons respiratoires actifs car ils inhibent les enzymes du cycle de Krebs ; - 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. |
| <p>Dérivés du BNT</p>  | <ul style="list-style-type: none"> - toxicité renforcée par la présence d'atomes d'halogènes sur le cycle benzénique ; - activité molluscicide plus marquée sur les sujets jeunes que sur les sujets adultes. |

Tableau III : Les principaux molluscicides et leurs propriétés (d'après MOUKRIM, 1987, modifié par VIGNOLES, 1990)

II. DIFFÉRENTS TYPES DE MOLLUSCICIDES

A. MOLLUSCICIDES D'ORIGINE CHIMIQUE

Il existe cinq classes de molluscicides d'origine chimique (GAYRAL et CAVIER, 1977) mais, actuellement, seuls deux produits sont commercialisés (le Niclosamide et le Frescon®). Les principales classes de molluscicides ainsi que leurs propriétés sont répertoriées dans le tableau III.

- Les dérivés du salicylanilide

Le principal représentant de cette famille est le Niclosamide. Ce dernier est rarement employé à l'état pur. Il est souvent utilisé sous forme de sel d'éthanolamine. On en distingue trois formes : en poudre mouillable à 60 % de principe actif (Mollutox®), en poudre mouillable à 70 % de principe actif (Bayluscide®) et en concentré émulsionnable à 25 % de principe actif (Clonitralide®).

- Les dérivés du triphényl-méthane

On trouve la N-trityl-morpholine (ou N-triphénylméthyl-morpholine) plus connue sous le nom Frescon®. Comme le Niclosamide, le Frescon® encore appelé Trifenmorph, est l'un des seuls molluscicides organiques à être utilisé sur le terrain. Il est insoluble dans l'eau. Les différentes formes du commerce comportent 16,5 % de principe actif.

- Les phénols halogénés

Ils ont une activité toxique vis-à-vis des mollusques et un mode d'action semblable à celui du niclosamide. Habituellement, on utilise le pentachlorophénate de sodium en raison de son faible coût et de sa grande solubilité dans l'eau.

- Les sels métalliques

Ils se révèlent être de bons molluscicides en raison de leur pouvoir inhibiteur sur certaines enzymes intervenant dans le cycle de Krebs. Les produits les plus efficaces se présentent sous forme de sulfates (sulfate de cuivre) et de chlorures (chlorure de fer, chlorure de cuivre). Ces derniers, de manipulation aisée, se solubilisent relativement bien dans l'eau, ce qui rend leur épandage très facile. Ils sont totalement ionisés en solution aqueuse permettant ainsi la libération du principe actif sous forme d'un cation bivalent.

- Les dérivés du 2-benzamido-5-nitrothiazole

Ils ont été synthétisés à la fin des années 1970 afin de fournir une alternative au Niclosamide sur le marché des molluscicides. Depuis, ces molécules ont fait l'objet de plusieurs études au laboratoire. Elles seront traitées plus en détail dans un paragraphe ultérieur.

B. MOLLUSCICIDES D'ORIGINE VÉGÉTALE

Certains végétaux ont la capacité de synthétiser des substances possédant des propriétés molluscicides (TAURISSON, 1991). Parmi ces végétaux, nous pouvons distinguer par exemple *Phytolacca dodecandra* (Phytolaccacées), *Swartzia madagascariensis* (Papilionacées). Ces produits sont moins coûteux que les molluscicides synthétiques et dans l'ensemble beaucoup moins toxiques pour l'environnement.

La sélection des plantes utilisables n'est cependant pas toujours facile. En effet, le choix d'une plante se fait selon des conditions bien particulières, si bien que malgré le nombre important de nouvelles plantes étudiées, très peu offrent les critères de choix pour une application à grande échelle.

Plusieurs auteurs ont défini les conditions à remplir par une plante pour être utilisée comme molluscicide (KLOOS et Mc CULLOUGH, 1982 ; MARSTON et HOSTETTMANN, 1985) :

- 1 Les plantes molluscicides doivent pousser en abondance dans la région d'endémie et doivent être adaptées aux conditions climatiques de la région.
- 2 Le type de plante : on préfère les plantes vivaces aux plantes annuelles. Leur taux de propagation doit être élevé. Leur culture doit nécessiter un minimum de travail et un coût faible.
- 3 Les parties de plante : la plus grande quantité de principe actif molluscicide doit se trouver dans des parties de plantes régénératrices (baies, fleurs, fruits, feuilles...).
- 4 Le rendement : on doit obtenir un rendement élevé de matériel molluscicide par plante et par unité de surface cultivée.
- 5 Le stockage : les plantes produites de manière saisonnière ne doivent pas perdre de leur pouvoir molluscicide pendant un stockage d'au moins un an.

- 6 L'extraction : les principes actifs doivent être extractibles à l'aide d'un appareillage simple et ceci afin que les populations locales puissent effectuer aisément cette opération.
- 7 L'application : les procédés d'application doivent être simples et sans danger pour l'opérateur.
- 8 L'activité molluscicide : elle doit être élevée. Il est intéressant aussi d'utiliser des produits détruisant également les oeufs des mollusques.
- 9 La stabilité physicochimique : l'activité molluscicide doit être conservée lors de variations diverses (pH, luminosité, température, pollution...).
- 10 La toxicité : elle doit être élevée pour les organismes cibles (mollusques) mais faible ou nulle pour la faune et la flore non visées.
- 11 Des utilisations complémentaires : il est intéressant que ces mêmes parties de plantes conviennent pour d'autres emplois locaux, domestiques ou industriels.

Parmi les classes de composés chimiques étudiés, les saponines semblent être les substances molluscicides les plus prometteuses. Il existe de nombreuses plantes à saponines telles que *Agave sisalana* (famille des Agavacées) et *Cornus florida* (famille des Cornacées). Elles ont une activité molluscicide importante et équivalente à celle des molécules de synthèse. De plus, elles sont présentes en grande quantité dans les plantes (PARIS et HURABIELLE, 1981).

Les tanins, eux aussi, représentent une grande classe de composés molluscicides en dépit d'une toxicité nettement inférieure à celle des saponines. Ils sont présents dans de nombreuses espèces d'acacias tels que *Acacia nilotica* ou arbre Sunt (AYOUB et YANKOV, 1987). Ce dernier est très commun dans l'Est et l'Ouest du Soudan ainsi qu'en Afrique occidentale. Cette plante est riche en tanins qui ont des propriétés astringentes, cicatrisantes et hémostatiques.

III. INCIDENCE DES MOLLUSCICIDES SUR L'ENVIRONNEMENT

A. MODALITÉS DE L'ÉTUDE D'IMPACT

L'écotoxicité d'une substance chimique est difficile à mettre en évidence et à apprécier. En effet, tous les produits pesticides possèdent en commun plusieurs caractéristiques qui conditionnent les particularités des perturbations écologiques qu'elles entraînent :

- un spectre de toxicité étendu sur la faune et la flore.
- l'utilisation de ces substances sur une espèce cible.
- des quantités utilisées souvent supérieures à celles qui seraient nécessaires.
- la persistance à long terme dans les sols et les eaux de résidus (rémanence).
- des surfaces exposées aux épandages souvent trop importantes.

Les études effectuées sur le terrain ou à la suite d'enquêtes épidémiologiques doivent être précédées par des essais en laboratoire reproduisant les écosystèmes à traiter. L'intérêt de ces essais est de déterminer dans des conditions opératoires définies (milieu, pH, température, concentrations, solvant, voie d'absorption, durée d'exposition) l'activité d'une substance chimique au sein d'une population homogène appelée réactif biologique.

Pour réaliser ces expériences, on utilise deux lots d'organismes :

- un lot soumis à des doses ou des concentrations croissantes de solutions contenant le produit toxique.
- un lot placé dans une solution sans toxique : c'est le lot témoin.

Ces essais préliminaires permettent alors de déterminer soit par le calcul soit graphiquement :

- la dose ou la concentration de la substance étudiée responsable des effets cytostatiques, cytotoxiques ou létaux. On peut, par exemple, déterminer une concentration ou une dose provoquant la mort de 50 % des individus de la population (CL_{50} , DL_{50}).
- le pourcentage de la population ayant réagi à l'effet toxique.
- la durée de l'exposition.

Ces essais sont très utiles pour réaliser une comparaison entre des composés nouveaux et un produit de référence. Cependant, ils ne peuvent pas être le reflet parfait des événements qui risquent de se produire dans l'environnement du fait :

- des conditions opératoires choisies arbitrairement.
- des possibilités multiples d'interprétation des résultats.
- de la multiplicité des organismes concernés.

Il s'agit cependant d'une étape préliminaire indispensable avant toute application de produits toxiques à grande échelle dans l'environnement.

B. L'IMPACT DES MOLLUSCICIDES

De nombreux pesticides sont systématiquement évalués sur les mollusques qui sont les principales cibles, mais aussi sur l'environnement en étudiant leurs effets sur les algues, les poissons et les crustacés.

1. Sur les Algues

a. Rôle de ces plantes

Elles jouent un rôle très important dans l'environnement et interviennent dans divers domaines (GORENFLOT, 1975). Les algues sont notamment capables, dans les milieux aquatiques, de libérer par l'intermédiaire de la photosynthèse de grandes quantités d'oxygène. Cet oxygène est utilisé par les microorganismes hétérotrophes aérobies et permet, par des réactions d'oxydation, la dégradation des matières organiques. Elles constituent aussi un élément indispensable dans les chaînes alimentaires.

Parmi celles-ci, *E. gracilis* constitue un réactif biologique intéressant à utiliser en laboratoire pour l'étude de la toxicité des produits vis-à-vis des végétaux (CABRIDENC, 1977). Ces algues sont faciles à cultiver *in vitro* et leur temps de multiplication est court. De plus, on peut obtenir des populations homogènes présentant une bonne sensibilité aux pesticides. Les algues se développent sur un milieu nutritif approprié dont la composition est décrite dans l'annexe 1. Grâce à leur capacité d'adaptation à une large gamme de pH, nous avons réalisé nos expériences à deux pH. A pH 3,5, elles sont fusiforme et se multiplient rapidement. A pH 7,2, elles ont une forme en bâtonnet et leur croissance est moins importante.

b. Evaluation de la toxicité sur les algues

Plusieurs essais utilisant les euglènes comme modèle ont été décrits dans la littérature.

- Des études visant à montrer les effets des ions métalliques (fer, cuivre, ...) sur l'intensité respiratoire d'*E. gracilis* ont été réalisées par EDJLALI et CALVAYRAC (1991). Elles ont montré une augmentation des échanges gazeux (dégagement d'O₂ et fixation de CO₂) chez ces algues lorsqu'elles étaient en présence de l'un de ces ions.

- Un travail sur l'influence d'un herbicide, le C.I.P.C. (chloro-isopropyl-phényl-carbamate), sur l'euglène révèle que cette molécule a une action inhibitrice sur la croissance des algues ainsi que sur la synthèse des pigments et la photosynthèse (ROUX, 1984). Cette sensibilité augmente avec la dose d'herbicide.

- D'autres recherches ont permis d'étudier l'action du cadmium sur des cellules d'*E. gracilis* (BONALY-CANTAREL, 1988). Les courbes de multiplication montrent que le taux de croissance et la densité cellulaire sont fonction de la concentration en ion cadmium dans le milieu. Cependant, ces algues peuvent acquérir, au cours du temps, une résistance vis-à-vis du métal : cette dernière apparaît comme définitivement acquise.

- Enfin, les euglènes sont sensibles aux dérivés du BNT (DUFOUR, 1989 ; GRENAILLE, 1991 ; LACOUTURE, 1991). Cette sensibilité se manifeste notamment par une inhibition de la croissance. Les résultats montrent qu'aux doses utiles pour avoir des effets molluscicides, ces molécules ne sont pas toxiques pour l'euglène et stimuleraient même la multiplication des cellules.

2. Sur les Poissons et les Crustacés

Plusieurs études ont été réalisées sur ces animaux en raison de leur position terminale dans les chaînes alimentaires. En effet, ces derniers peuvent concentrer les résidus des pesticides.

- Une étude a montré que le Niclosamide (BAYER, 1970), utilisé à dose molluscicide, est toxique pour les Poissons et les grenouilles. Cependant, il reste utilisé car il ne s'accumule pas dans le sol.

- Le sulfate de cuivre est, lui aussi, toxique pour les poissons (GAYRAL et CAVIER, 1977).
- Des travaux concernant un macrocrustacé de la faune associée appelé *Gammarus pulex* ont été effectués (RENAUDIN, 1987 ; VIGNOLES, 1990). Cet Invertébré est souvent utilisé dans les tests de toxicité.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

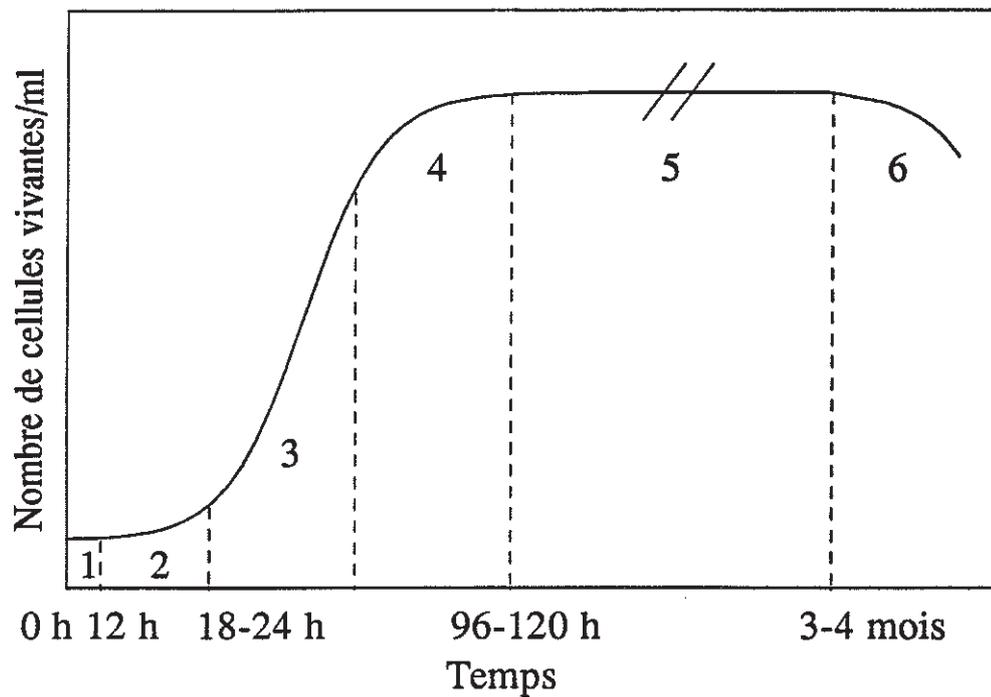
Ce chapitre présente les dérivés du BNT étudiés ainsi que les protocoles expérimentaux que nous avons appliqués tout au long de nos essais.

I. MATÉRIEL BIOLOGIQUE

A. ENTRETIEN DE LA SOUCHE

La souche provient du Laboratoire de Biologie Cellulaire, de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry (Hauts-de-Seine). Elle a été fournie par Madame le Professeur Bonaly. Les euglènes sont cultivées au laboratoire dans le milieu de Schiff (GREENBLATT et SCHIFF, 1959). Elles sont entretenues dans une enceinte climatique avec des conditions constantes : température de 25 °C, culture avec un cycle d'éclairement nyctéméral de 12 heures. Ces conditions sont similaires à celles que VIGNOLES (1990) a utilisées lors d'études sur d'autres dérivés du BNT et le même matériel biologique.

Les algues poussent dans des flacons stériles en plastique type boîte de Roux (80 cm² de surface). Ce type de flacon est intéressant car le volume de milieu à utiliser est assez faible, il est



- | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 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 |

Figure 2 : Courbe de croissance théorique des euglènes (MILLET, 1984)

de manipulation facile et les risques de contamination sont réduits. De plus, la lumière passe à travers le milieu même avec une densité cellulaire importante.

La souche est repiquée chaque quinzaine de telle façon que les algues se trouvent en phase exponentielle au début de l'expérience. L'entretien des euglènes se fait sur 50 ml de milieu nutritif préalablement stérilisé à l'autoclave. Les euglènes sont ensuiteensemencées sur ce nouveau milieu par prélèvement de 1 à 2 ml de la culture précédente. Toutes ces opérations sont effectuées stérilement sous une hotte à flux laminaire pour éviter toute contamination.

B. CINÉTIQUE DE CROISSANCE

Nous maintenons la culture pendant 12 jours afin d'obtenir un cycle de croissance complet. La majorité du produit toxique est dégradée au bout de 4 jours d'où une diminution de sa concentration dans le milieu. Il faut ensuite compter 4 à 5 jours de plus pour permettre une reprise de la croissance des algues jusqu'à obtention d'un palier maximum.

D'après MILLET (1984), la cinétique de croissance d'une culture d'euglènes représentée en coordonnées semi-logarithmiques se décompose en six phases (figure 2) :

- Phase de latence : elle est brève et correspond au temps d'adaptation de l'algue à son nouveau milieu.
- Phase de démarrage : les euglènes commencent à se multiplier activement.
- Phase de croissance exponentielle : la multiplication des euglènes est optimale. Dans cette phase on observe la vitesse de croissance la plus élevée.
- Phase de ralentissement : le milieu s'appauvrit du fait d'une population cellulaire de plus en plus dense.
- Phase stationnaire : on observe un arrêt de la croissance des euglènes dû à un épuisement des ressources énergétiques du milieu de culture. Dans cette phase, la population reste constante car les cellules consomment leurs propres réserves nutritives.

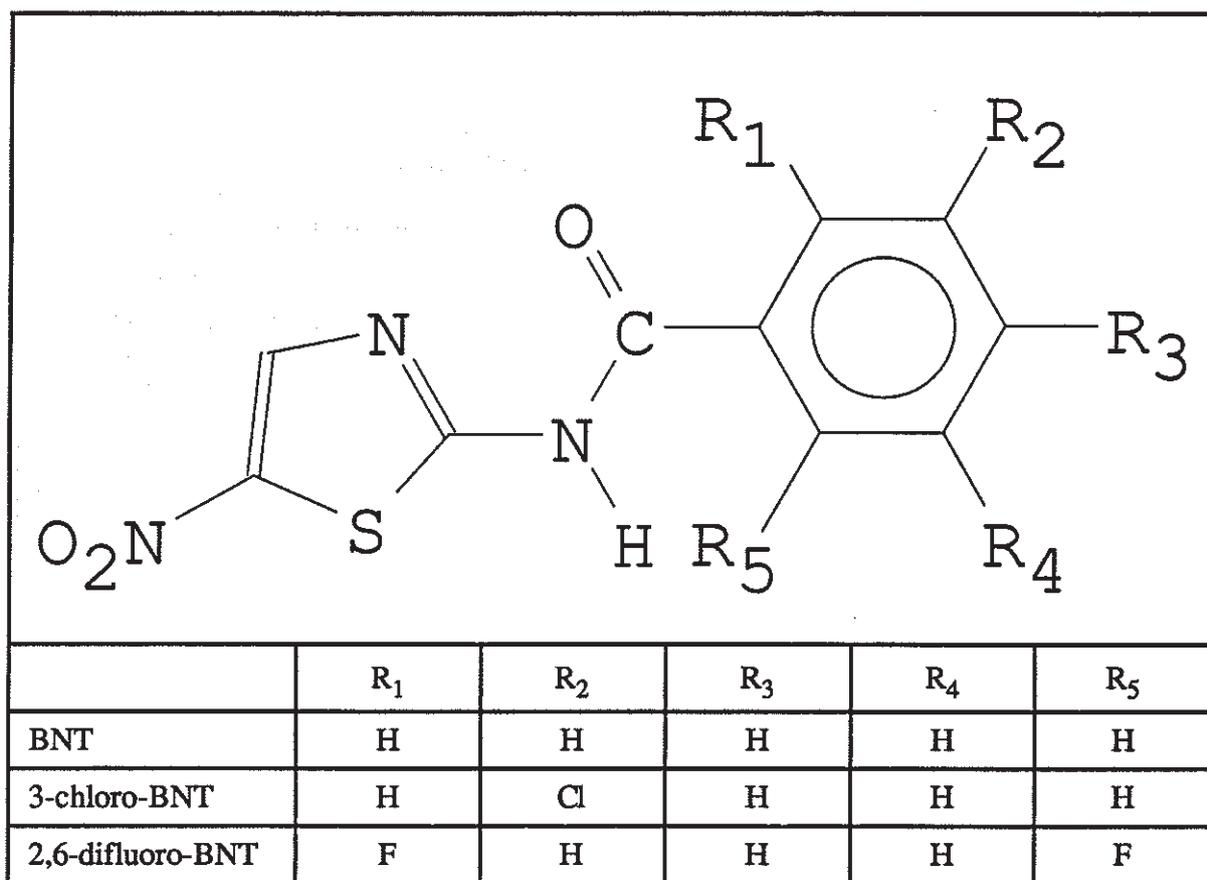


Tableau IV : Les dérivés du BNT étudiés

| Nature de l'expérience | Facteur étudié | Description | Observation |
|--|---|---|--|
| Croissance des euglènes | Nature du milieu de culture | - Milieu de Schiff - Milieu lactate | pH 3,5 |
| | Lumière | - Eclairage 12 h diurnes - Obscurité | Sur milieu de Schiff, à pH 3,5 |
| | Concentration de solvant seul (PEG 400) | - Témoin - 1 %, 2 %, 4 % ou 8 % | Sur milieu de Schiff, à pH 3,5 et 7,2 |
| Récupération du toxique (Avant et après filtration sur membrane 0,22 µm) | Concentration constante en PEG 400 (4 %) | Charge initiale de 2,6-difluoro-BNT allant de 2 à 64 mg.l ⁻¹ | Sur milieu de Schiff, à pH 3,5 |
| | Concentration croissante en PEG 400 (0,2 à 6,4 %) | Charge initiale de 2,6-difluoro-BNT allant de 2 à 64 mg.l ⁻¹ | Sur milieu de Schiff, à pH 3,5 |
| | Durée de l'expérience | Charge initiale de 2,6-difluoro-BNT ou de BNT égale à 30 mg.l ⁻¹ | Sur milieu de Schiff, à pH 3,5 et 7,2 |
| Intoxication des euglènes | Inhibition de la croissance | Détermination de la pCI ₅₀ | Sur milieu de Schiff, à pH 3,5 et 7,2 avec le 3-chloro-BNT |
| | Mortalité | Détermination de la pCL ₅₀ | |

Tableau V : les diverses expériences et leurs caractéristiques

- Phase de décroissance : toutes les réserves sont épuisées, les cellules commencent à mourir. Cette phase n'a jamais été atteinte lors des manipulations.

II. LES DÉRIVÉS DU BNT

Certains dérivés du BNT possèdent une forte activité molluscicide et antiparasitaire (CAVIER *et al.*, 1978 ; MADULO-LEBLOND *et al.*, 1981). Ils pourraient donc être employés pour lutter contre les mollusques, vecteurs de parasitoses. Une telle utilisation entraînerait la dispersion des produits dans l'eau et l'environnement, il est donc important de connaître les propriétés physico-chimiques de ces produits.

Ces composés possèdent en plus une photosensibilité et thermosensibilité : en effet, la décomposition des dérivés du BNT en solution aqueuse est activée par la lumière et la température. Le pH joue également un rôle dans la dégradation.

En plus du BNT non substitué, nous avons étudié 2 dérivés du BNT : le 2,6-difluoro-BNT, le 3-chloro-BNT. Le tableau IV résume la structure chimique de chaque dérivé.

III. PROTOCOLE D'ÉTUDE

Le tableau V présente les principales caractéristiques de nos expériences. Nous en avons réalisé trois types :

- L'action de trois facteurs sur la croissance des euglènes. L'un d'entre-eux concerne la nature du milieu de culture (à pH 3,5). Les deux autres sont l'éclairement et la concentration en PEG 400 (sur le milieu de Schiff, à pH 3,5).
- L'action de trois autres facteurs sur la récupération du toxique avant et après la filtration. Il s'agit de la concentration en PEG 400 (croissante ou constante) d'une part, de la durée de l'expérience, d'autre part, permettant d'apprécier le vieillissement du produit dans le temps.
- L'intoxication des euglènes par le 3-chloro-BNT afin de déterminer sa cytostaticité (pCI_{50}) et sa létalité (pCL_{50}).

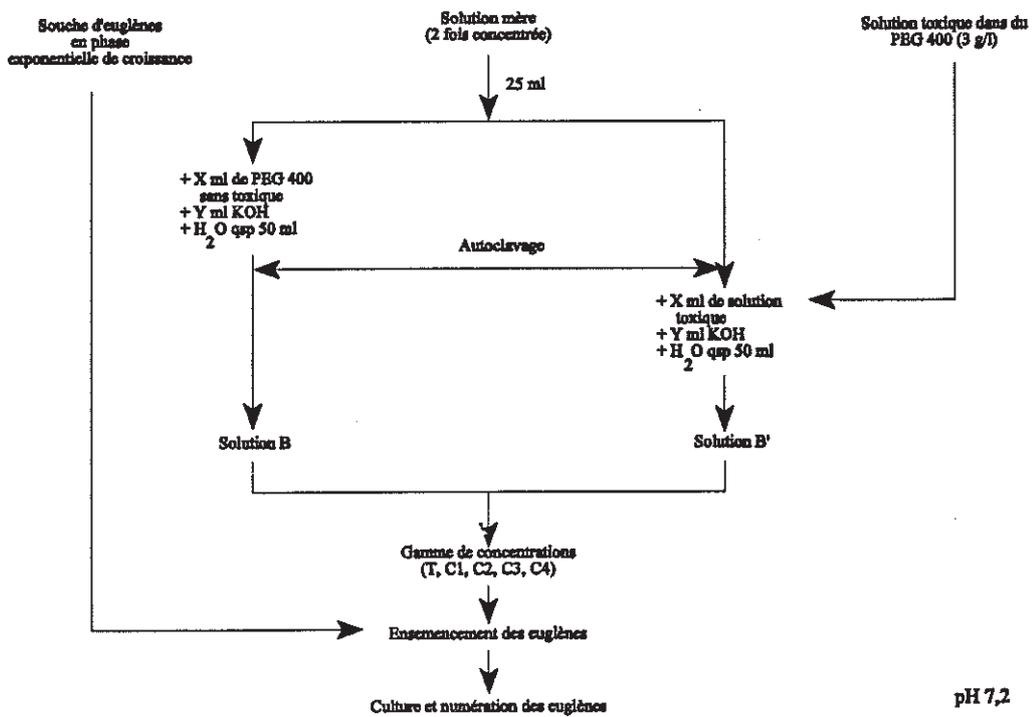
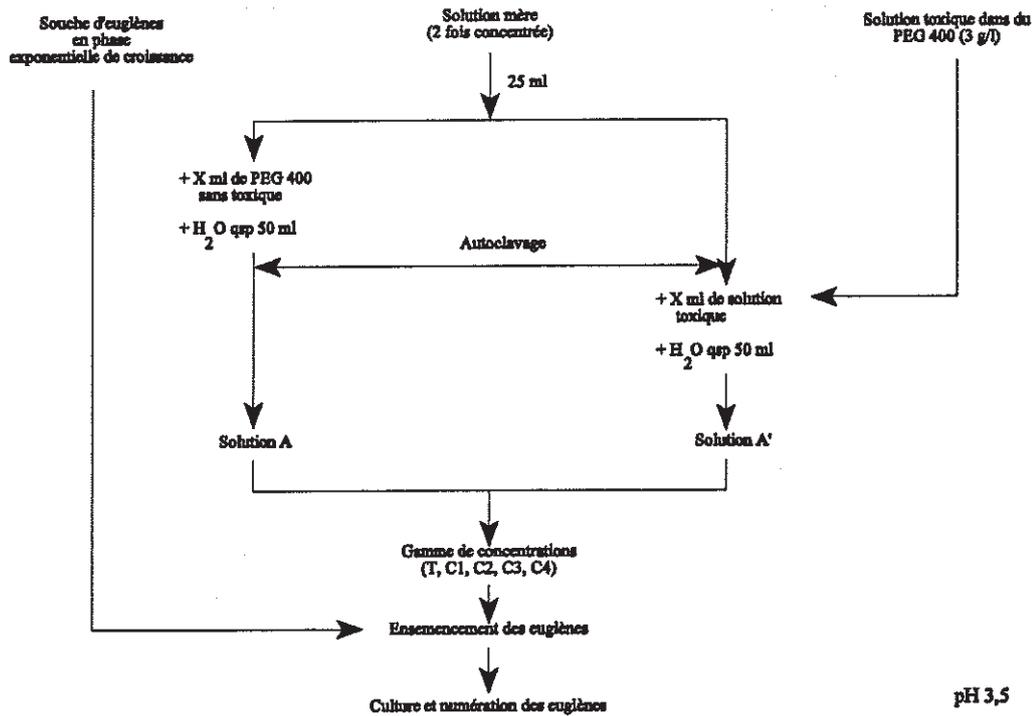


Figure 3 : Préparation de la gamme de concentrations à pH 3,5 et à pH 7,2.

IV. MÉTHODOLOGIE

A. MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS

L'un d'entre-eux est le milieu de Schiff encore appelé milieu glutamate (GREENBLATT et SCHIFF, 1959) qui apporte tous les éléments nécessaires au développement de la cellule. Il permet aux euglènes de pousser même à l'obscurité. Sa composition est indiquée dans l'annexe 1. Le milieu, que nous avons préparé, a un pH de 3,5 et correspond à une solution deux fois concentrée. De celle-ci, on prélève 25 ml auxquels on ajoute 25 ml d'eau distillée ce qui donne un milieu une fois concentré que l'on stérilise à l'autoclave. Cette préparation est utilisée pour le repiquage des euglènes.

L'autre est le milieu lactate. Sa composition est donnée dans l'annexe 2. Nous avons pu comparer la croissance des euglènes cultivées dans ce milieu avec celle que l'on obtient avec le milieu de Schiff.

B. PRÉPARATION DES SOLUTIONS ET DES MILIEUX

1. Solutions toxiques

Les produits à étudier sont insolubles en milieu aqueux, il faut donc utiliser un solvant organique pour les dissoudre comme le polyéthylène glycol 400 (PEG 400).

On prépare une solution mère à 3 g/l par dissolution de 15 mg de produit toxique dans 5 ml de PEG 400 à l'aide de l'agitateur Branson.

2. Milieux témoins et milieux contenant le toxique

Nous avons résumé les différentes étapes de la préparation des milieux dans la figure 3.

les milieux témoins sont réalisés à pH 3,5 et pH 7,2. Pour le premier pH, chaque flacon contient 25 ml de milieu glutamate deux fois concentré, x ml de PEG 400 sans toxique, et (25-x) ml d'eau distillée (milieu A). Pour le deuxième pH, nous mettons dans chaque récipient 25 ml de milieu glutamate deux fois concentré, y ml de KOH (pour amener le pH de la solution à 7,2) x ml de PEG 400 sans toxique, et (25-y) ml d'eau distillée (milieu B). Les deux types de milieux sont stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min. Ils sont ensuite conservés dans un réfrigérateur après stérilisation jusqu'à l'ensemencement.

Les milieux contenant le toxique sont également préparés, l'un à pH 3,5, l'autre à pH 7,2 mais le volume de PEG 400 sans toxique est remplacé par un même volume de solution toxique. Nous obtenons alors les solutions respectivement nommées A' et B'.

3. Répartition du milieu et ensemencement

La répartition dans les différents flacons se fait sous la hotte à flux laminaire pour éviter tout risque de contamination bactérienne qui serait préjudiciable au développement des euglènes.

Nous réalisons deux gammes de flacons, l'une à pH 3,5, l'autre à pH 7,2. Pour chaque pH, nous préparons un témoin et quatre flacons de dilution croissante de produit toxique. Chaque gamme est réalisée en mélangeant la solution A (ou B) et la solution toxique A' (ou B') dans des proportions variables de façon à avoir dans chaque flacon un volume final de 5 ml. Les vitamines sont ajoutées stérilement juste avant l'ensemencement des euglènes.

L'ensemencement des euglènes est réalisé à partir de la souche entretenue par repiquage toutes les quinze semaines. Ce repiquage est fait quelques jours avant le début de la manipulation afin que les euglènes se trouvent en phase exponentielle.

Avant la mise en culture, nous effectuons un comptage de l'inoculum. Cette numération nous permet de déterminer le volume à prélever afin d'obtenir $50 \cdot 10^3$ cellules par ml dans chaque flacon au début de l'expérience.

Les différents flacons sont ensuite placés dans l'enceinte climatique durant les 12 jours de l'expérience.



| | | 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 |

Tableau VI : Volumes utilisés en fonction du nombre de cellules par ml pour la fixation et la coloration des euglènes.

C. MÉTHODE DE COMPTAGE

Le comptage est effectué au microscope optique sur une cellule de Malassez. Cette cellule est formée par une épaisse lame de verre comportant en son centre un quadrillage gravé. Ce quadrillage est composé de 100 rectangles de 1/5 de mm de largeur, 1/4 de mm de longueur. La profondeur de la chambre est de 1/5 de mm. L'ensemble des 100 rectangles correspond donc à un volume de 1 mm^3 , soit $1 \mu\text{l}$. Les valeurs de numération obtenues sont ramenées au millilitre.

Pour chaque comptage, un double prélèvement est effectué dans chaque flacon sous la hotte à flux laminaire dans des conditions stériles :

- Le premier prélèvement auquel on ajoute une quantité définie d'acide sulfochromique à 1 % permet de déterminer le nombre de cellules totales. Cet acide fixe les cellules afin d'en faciliter le comptage. Les proportions de milieu et d'acide sulfochromique utilisées varient en fonction de la concentration cellulaire supposée dans le milieu, et ceci afin d'avoir 100 à 200 euglènes au maximum par cellule de comptage.
- Le second prélèvement permet de dénombrer les cellules mortes. Ces dernières sont colorées par une solution diluée de bleu Trypan.

Le nombre de cellules vivantes est donné par la formule suivante :

$$N_V = N_T - N_M$$

N_V : nombre de cellules vivantes
 N_T : nombre de cellules totales
 N_M : nombre de cellules mortes

Le tableau VI regroupe les volumes d'acide sulfochromique et de bleu de trypan utilisés en fonction du nombre de cellules par ml.

Le nombre N de cellules vivantes par ml est :

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

N : nombre de cellules par ml
n : nombre de cellules comptées sur la cellule de Malassez
d : dilution effectuée lors de la fixation ou de la coloration

| | Concentrations en produit toxique (mg/l) | | | | | | | | |
|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0 | 2 | 4 | 12 | 20 | 30 | 40 | 52 | 64 |
| Solution mère (μ l) | 0 | 10 | 20 | 60 | 100 | 150 | 200 | 260 | 320 |
| PEG 400 (μ l) | 400 | 390 | 380 | 340 | 300 | 250 | 200 | 140 | 80 |
| Milieu de Schiff 2 fois concentré (ml) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| H ₂ O (ml) | 4,6 | 4,6 | 4,6 | 4,6 | 4,6 | 4,6 | 4,6 | 4,6 | 4,6 |

Tableau VII : Préparation de la gamme de concentrations en 2,6-difluoro-BNT avec 4 % de PEG 400

| | Concentration en produit toxique (mg/l) | | | | | | | | |
|--|---|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 2 | 4 | 12 | 20 | 30 | 40 | 52 | 64 |
| Solution mère (μ l) | 0 | 10 | 20 | 60 | 100 | 150 | 200 | 260 | 320 |
| PEG 400 (μ l) | 0 | 10 | 20 | 60 | 100 | 150 | 200 | 260 | 320 |
| Milieu de Schiff 2 fois concentré (ml) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| H ₂ O (ml) | 5 | 4,98 | 4,96 | 4,88 | 4,80 | 4,70 | 4,60 | 4,48 | 4,36 |

Tableau VIII : Préparation de la gamme de concentrations en 2,6-difluoro-BNT avec un pourcentage croissant en PEG 400 (0 à 6,4 %).

Le rythme des numérations a été établi en fonction de la courbe de croissance des euglènes. Un dénombrement des cellules vivantes et des cellules mortes est effectué deux fois par jour pendant les trois premiers jours de l'expérience afin de bien suivre la phase exponentielle, puis une fois par jour les neuf jours suivants.

D. DOSAGES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES DES SOLUTIONS TOXIQUES

Lorsque l'on mélange au milieu la solution toxique (dérivé du BNT + PEG 400), on note une précipitation plus ou moins importante du produit toxique. Cette précipitation est telle que la filtration stérilisante entraîne un pourcentage de perte parfois élevé. Cette observation nous a conduit à stériliser le milieu de culture à l'autoclave et à ajouter par la suite la solution toxique sans la filtrer.

Le dérivé du BNT est ensuite dosé dans le milieu de culture par spectrophotométrie. Le principe de calcul est indiqué en annexe 4.

E. SUIVI DE LA DENSITÉ OPTIQUE (DO)

1. En fonction de la concentration

Dans un premier temps, nous avons préparé une solution mère de 2,6-difluoro-BNT dans du PEG 400 à 2 g/l. Dans un second temps, une gamme de concentrations a été réalisée, à pH 3,5, en utilisant la solution mère précédente en envisageant deux cas de figure :

- * Série de concentrations préparée avec un pourcentage de PEG 400 constant. Ce dernier est égal à 4 %. L'ensemble des données pour la réalisation de la gamme est regroupé dans le tableau VII. Le volume final de chaque essai est de 10 ml. Pour chacun d'entre-eux, on effectue un dosage spectrophotométrique du produit toxique avant et après filtration sur une membrane avec des pores de 0,22 µm de diamètre.
- * Série de concentrations préparée avec un pourcentage en PEG 400 variable. Le tableau VIII indique les différentes valeurs de la gamme. Comme précédemment, chaque essai a pour volume final 10 ml. Par spectrophotométrie, on dose le produit toxique avant et après filtration.

2. En fonction du temps

Les essais ont été réalisés avec le 2,6-difluoro-BNT ou le BNT. Dans chaque cas, nous avons travaillé à pH 3,5 et à pH 7,2.

A pH 3,5 :

- 1 ml de solution mère à 3 g/l (dérivé du BNT + PEG 400)
- 50 ml de milieu 2 fois concentré
- H₂O qsp 100 ml

A pH 7,2 :

- 1 ml de solution mère à 3 g/l
- 50 ml de milieu 2 fois concentré
- 7,4 ml de KOH (pour ramener le pH à 7,2)
- H₂O qsp 100 ml

A ces deux pH, un double dosage spectrophotométrique (avant et après filtration) est effectué à certaines dates entre le premier et le 14^e jour de l'expérience.

Dans cette étude, le pourcentage en PEG 400 est constant (1 %).

V. PARAMÈTRES ÉTUDIÉS

A. COURBE LOGISTIQUE

La croissance des euglènes peut être modélisée en utilisant une courbe logistique théorique à partir des points expérimentaux (annexe 5). Cette modélisation nécessite la détermination de trois paramètres : le densité des algues au début de l'expérience (N_0), la densité cellulaire en phase stationnaire (N_{\max}) et le taux de croissance (k exprimé en h^{-1}). Ce dernier paramètre reflète la vitesse de multiplication des euglènes en phase exponentielle de croissance.

B. TAUX DE MORTALITÉ

Le taux de mortalité est déterminé en effectuant le rapport entre le nombre de morts (par ml) dans l'essai à un temps donné t de l'expérience et l'effectif des cellules vivantes (par ml) dans le témoin au même instant.

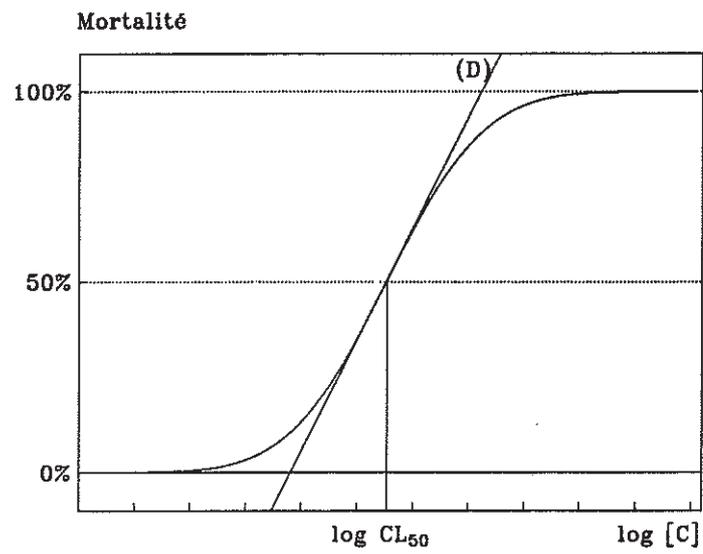


Figure 4 : Schématisation de la détermination de la pCL_{50}

C. CONCENTRATION LÉTALE À 50 % (CL₅₀)

La concentration létale à 50 % est la concentration de toxique pour laquelle le taux de mortalité des euglènes est de 50 %.

On calcule la CL₅₀ en traçant la courbe du taux de mortalité en fonction du logarithme de la concentration : les points expérimentaux compris entre 5 % et 95 % étant sensiblement alignés, on en déduit la valeur des CL₅₀ par regression linéaire. La moyenne m est égale au logarithme décimal de la CL₅₀ et l'écart-type σ traduit la dispersion des valeurs de $\log C$ autour de la moyenne.

Pour des raisons de commodité, on utilise les valeurs de pCL₅₀ telles que $pCL_{50} = -\log CL_{50}$ (CL₅₀ en mol.l⁻¹).

La figure 4 schématise le calcul de la pCL₅₀.

D. POURCENTAGE DE MODIFICATION DE CROISSANCE

Le pourcentage correspondant à la modification de la croissance des algues à l'instant t est calculé selon la relation :

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

- $x(t)$: pourcentage de modification
- $N_E(t)$: nombre de cellules par ml dans l'essai à l'instant t
- $N_T(t)$: nombre de cellules par ml dans le témoin à l'instant t
- N_{\min} : nombre minimal de cellules par ml pour l'essai

On calcule le pourcentage pour des valeurs de t égales à 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 168 h.

E. CONCENTRATION INHIBITRICE À 50 % (CI₅₀)

La CI₅₀ est la concentration de toxique réduisant de 50 % la croissance des euglènes. En pratique, on définit $pCI_{50} = -\log CI_{50}$ (CI₅₀ en mol.l⁻¹).

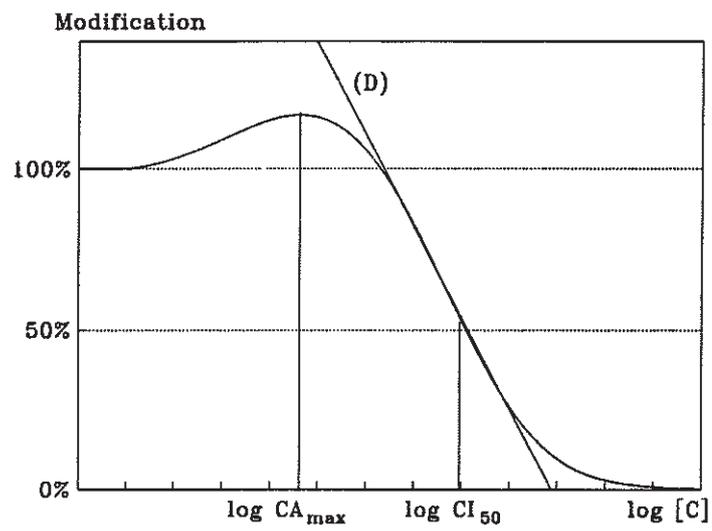


Figure 5 : Détermination des pCI_{50} et pCA_{max}

On trace $x(t)$ en fonction du logarithme décimal de la concentration en produit exprimée en mol.l^{-1} . Pour des valeurs de $x(t)$ comprises entre 15 % et 95 %, les points sont sensiblement alignés. On obtient alors la valeur de pCI_{50} par régression linéaire.

F. CONCENTRATION ACTIVATRICE MAXIMALE (CA_{MAX})

La CA_{max} est la concentration pour laquelle on obtient une activation maximale de la croissance. Ce paramètre correspond à l'abscisse du maximum de la courbe $x(t) = f(\log[C])$ à l'instant t . Nous avons, en effet, constaté que, pour certains composés et à certains temps d'exposition, la croissance de la population cellulaire soumise au produit pouvait être plus rapide que celle des euglènes témoins.

Le faible nombre de points expérimentaux pour les concentrations activatrices ne nous a pas permis de déterminer les CA_{max} pour nos produits.

La figure 5 schématise la détermination de pCI_{50} et de pCA_{max} (où $pCA_{max} = -\log CA_{max}$, avec CA_{max} en mol.l^{-1}).

RÉSULTATS

Dans un premier temps, nous décrirons quelques observations qualitatives faites sur les cellules vivantes et sur les cellules mortes lors des numérations. La deuxième partie de ce travail sera consacrée aux résultats obtenus lors de l'étude des différents facteurs agissant sur la croissance des euglènes et sur la quantité de produit récupéré. Nous terminerons, dans une troisième partie, en présentant les données obtenues, lors de l'intoxication des algues par les dérivés du BNT utilisés.

I. OBSERVATIONS QUALITATIVES

A. CELLULES VIVANTES

Lors de la numération sur cellule de Malassez, nous utilisons le grossissement x40 qui ne suffit pas pour voir tous les constituants cellulaires. Cependant nous pouvons distinguer les plastes colorés en vert, localisés en périphérie, et le stigma de couleur rouge, visible ou non selon l'incidence de la cellule. Le flagelle le plus long dépasse du goulot dans la région antérieure de la cellule et se distingue par différence de contraste.

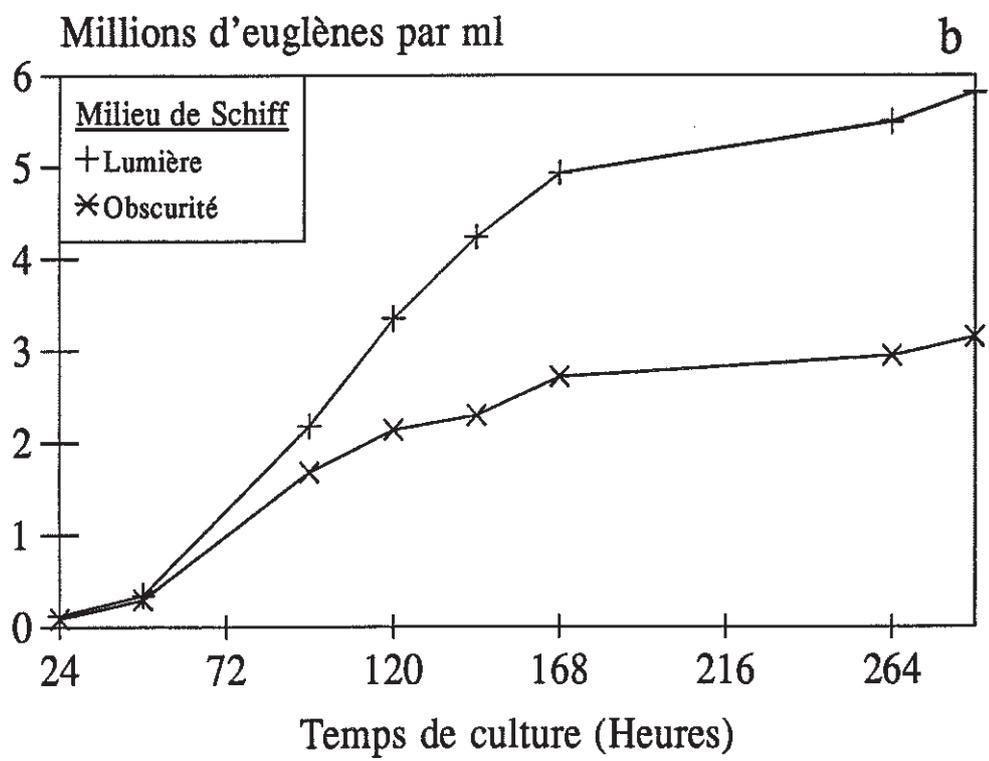
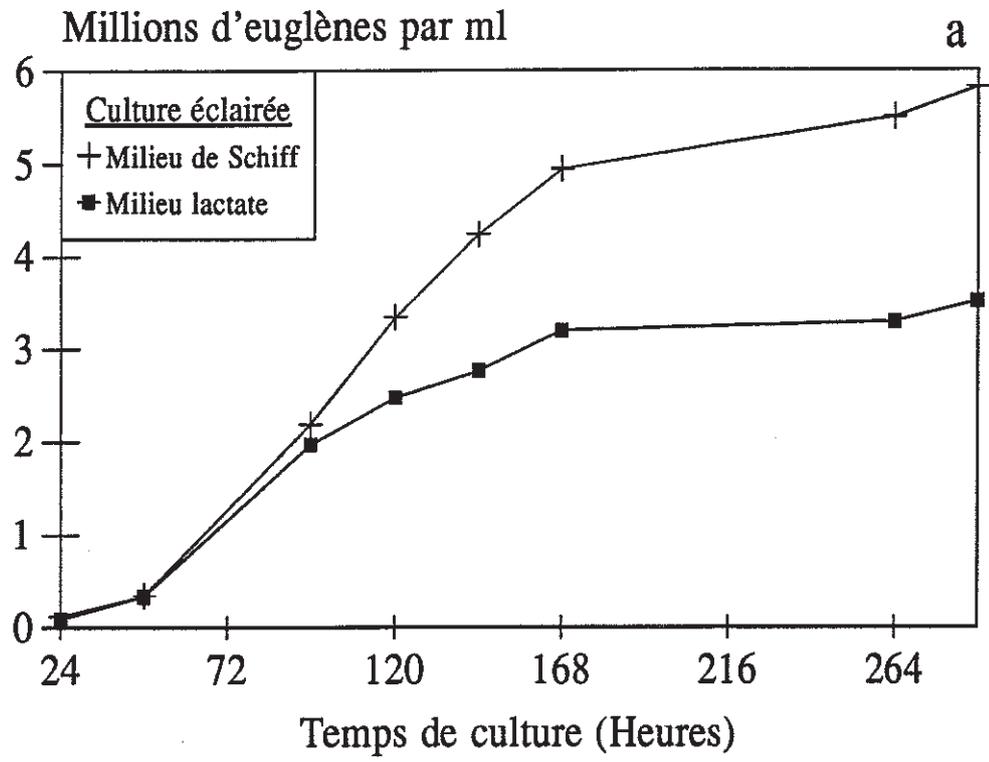


Figure 6 : Influence du milieu de culture (graphe a) et de l'éclairément (graphe b) à pH 3,5

Les algues sont fusiformes à pH 3,5 et en forme de bâtonnet à pH 7,2. Leur mobilité est variable et dépend du pH : à pH 3,5, elles ont une mobilité réduite pendant les trois premiers jours de l'expérience alors qu'à pH 7,2, les cellules sont très mobiles dès le début de l'expérience.

Elles se déplacent selon une trajectoire hélicoïdale consécutive aux battements du flagelle. Elles présentent aussi de nombreuses déformations (contractions, distorsions).

B. CELLULES MORTES

Les cellules mortes ont une forme globulaire régulière ; elles ne présentent pas de variation morphologique en fonction du pH. Parfois, nous avons pu observer des cellules mortes allongées assez semblables aux cellules vivantes. Elles sont de même longueur mais un peu plus étroites.

Dans les cellules mortes, on observe des inclusions bleues denses colorées par le bleu Trypan. Le cytoplasme a une coloration bleu-clair identique à celle du milieu environnant.

II. INFLUENCE DE FACTEURS SUR LA CROISSANCE DES EUGLÈNES

A. INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE

Nous avons représenté dans la figure 6a les courbes de croissance obtenues pour le milieu de Schiff et pour le milieu lactate.

Pendant les premiers jours de culture, les algues se multiplient indifféremment sur le milieu lactate ou sur le milieu glutamate. Le milieu lactate apparaît moins favorable au développement des euglènes à partir du 4-5^e jour de culture.

B. INFLUENCE DE L'ÉCLAIREMENT

Les cellules cultivées avec un éclairage artificiel de type fluorescent et une photophase de 12 h croissent plus vite qu'à l'obscurité. Plus le milieu nutritif s'appauvrit et plus cette différence de croissance est marquée. La figure 6b illustre ce phénomène.

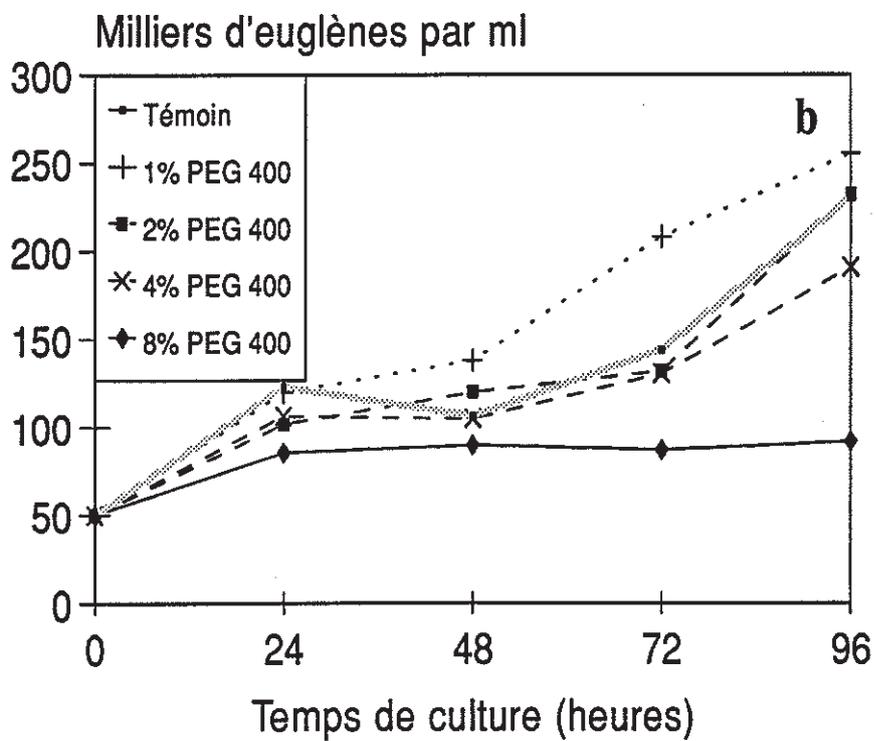
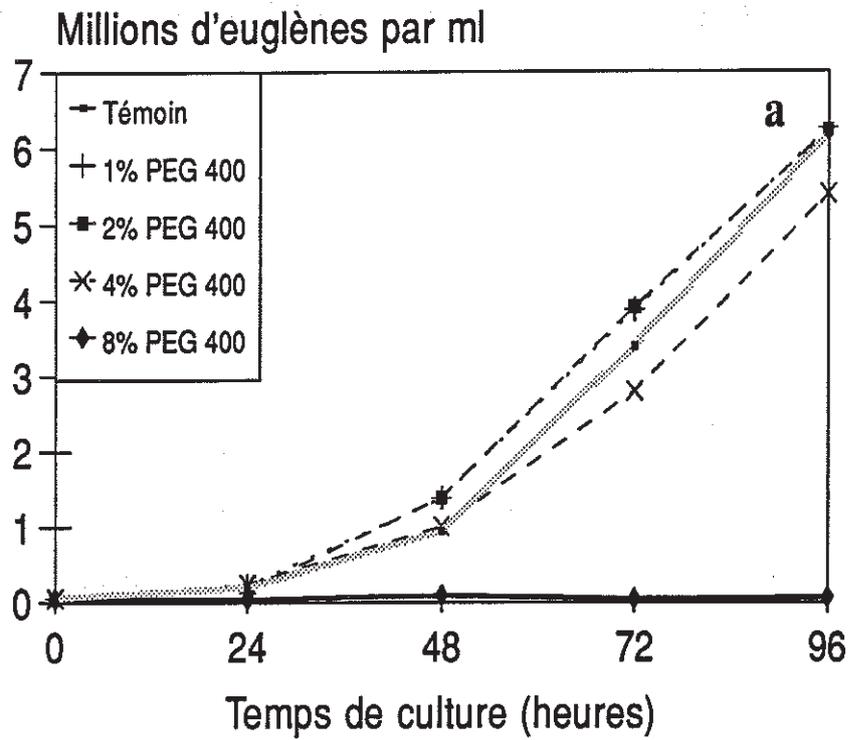


Figure 7 : Influence du PEG 400 à pH 3,5 (graphe a) et à pH 7,2 (graphe b).

C. INFLUENCE DU PEG 400

La figure 7 montre l'influence du PEG 400 sur la croissance des euglènes. Cette étude est réalisée à pH 3,5 et pH 7,2. Les algues sont soumises à des doses croissantes de PEG 400 (1 %, 2 %, 4 % et 8 %). Un témoin est constitué avec des euglènes cultivées sur un milieu de Schiff sans PEG 400.

De ces graphes, nous pouvons dégager les constatations suivantes :

- aux concentrations de 1 % et 2 %, la croissance des euglènes n'est pas ralentie, elle est même légèrement supérieure à celle du témoin.
- à 4 % de PEG 400, le graphique montre un léger ralentissement de la multiplication des cellules par rapport au témoin. Cependant, cette diminution n'est pas significative.
- à la dose de 8 %, nous notons un effet cytotatique : le produit a un effet inhibiteur sur la croissance sans pour autant entraîner une augmentation de la mortalité.

Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé un milieu contenant 1,6 % de PEG 400 ; à cette concentration, ce dernier n'a donc aucune influence sur la croissance des algues. Toute modification de la croissance des cellules ne peut mettre en cause que le produit toxique.

III. SUR LA QUANTITÉ DE PRODUIT RÉCUPÉRÉ

A. ETUDES RELATIVES AU 2,6-DIFLUORO-BNT

Elles se divisent en deux grandes parties :

- la première vise à mettre en évidence l'influence de la concentration du PEG 400 à pH 3,5.
- La seconde a pour but d'analyser l'effet du vieillissement des solutions à pH 3,5 et pH 7,2. Dans chaque étude nous effectuons des mesures avant et après filtration des solutions.

| Charge initiale (mg/l) | Avant filtration | | Après filtration | |
|---------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| | DO (344 nm) | Concentration récupérée (mg/l) | DO (344 nm) | Concentration récupérée (mg/l) |
| 2 | 0,22 | 4,02 | 0,09 | 1,55 |
| 4 | 0,22 | 4,02 | 0,08 | 1,52 |
| 12 | 0,45 | 8,22 | 0,18 | 3,29 |
| 20 | 0,53 | 9,68 | 0,15 | 2,74 |
| 30 | 0,58 | 10,59 | 0,30 | 5,48 |
| 40 | 0,57 | 10,41 | 0,30 | 5,48 |
| 52 | 0,59 | 10,78 | 0,31 | 5,66 |
| 64 | 0,57 | 10,41 | 0,46 | 8,40 |

Tableau IX : Concentration mesurée en 2,6-difluoro-BNT avant et après filtration avec 4 % de PEG 400 et à pH 3,5.

| Charge initiale (mg/l) | Avant filtration | | Après filtration | |
|---------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| | DO (344 nm) | Concentration récupérée (mg/l) | DO (344 nm) | Concentration récupérée (mg/l) |
| 2 | 0,12 | 2,14 | 0,01 | 0,14 |
| 4 | 0,20 | 3,64 | 0,02 | 0,36 |
| 12 | 0,37 | 6,72 | 0,04 | 0,88 |
| 20 | 0,30 | 5,35 | 0,07 | 1,42 |
| 30 | 0,54 | 9,95 | 0,17 | 3,17 |
| 40 | 0,72 | 13,14 | 0,23 | 4,12 |
| 52 | 0,60 | 10,98 | 0,56 | 10,16 |
| 64 | 0,59 | 10,75 | 0,29 | 5,26 |

Tableau X : Concentration mesurée en 2,6-difluoro-BNT avant et après filtration avec une concentration en PEG 400 croissante (de 0,2 à 6,4 %) et à pH 3,5.

1. Influence d'un pourcentage constant en PEG 400

Tous les flacons contiennent 4 % de PEG 400. Deux séries de dosages ont été effectuées : elles sont réalisées sur le même milieu de culture contenant le produit avec pour la première, une mesure directe alors que pour la seconde une filtration sur membrane avec des pores de $0,22 \mu\text{m}$ est effectuée au préalable. Le tableau IX récapitule les résultats des mesures pour la DO (à 344 nm) en fonction des charges initiales en produit, avant et après filtration de la solution.

Avec la première série de mesures, on constate que pour des charges initiales comprises entre 2 et 52 mg/l, les DO augmentent en fonction de la dose en produit jusqu'à un maximum (pour une charge égale à 30 mg/l, on obtient une DO égale 0,59). Au-delà de cette valeur, on note une stabilisation à une DO environ égale à 0,58. L'augmentation de la concentration en produit toxique dans le milieu n'entraîne donc plus une élévation de DO ce qui suggère qu'il y a une précipitation bien que la solution soit limpide à l'oeil nu.

Les mesures de DO de la solution après filtration constituent une expérience qui nous a paru intéressante à réaliser. En effet, nous nous sommes aperçu qu'après filtration une grande partie du produit était retenue par le filtre, or il s'agissait de la méthode appliquée pour la stérilisation de la solution toxique.

Au cours de cette étude, nous avons donc constaté que l'évolution de la DO est proportionnelle à celle des concentrations initiales. A la suite de la filtration, nous constatons que nous perdons en moyenne entre 40 et 60 % de produit. Ce dernier est retenu sur le filtre qui prend une teinte jaune à pH 7,2 révélant sa présence.

2. Influence d'un pourcentage variable en PEG 400

Le tableau X regroupe les DO mesurées pour chaque essai en fonction de la concentration initiale en 2,6-difluoro-BNT avant et après filtration pour une concentration croissante en PEG 400.

Avec un milieu non filtré, l'augmentation de la DO est proportionnelle à la concentration initiale en produit tant que cette dernière est inférieure ou égale à 40 mg.l^{-1} . Pour les valeurs supérieures à cette limite, on note le phénomène inverse.

| Temps (jours) | Avant filtration | | Après filtration | |
|---------------|------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|
| | DO (344 nm) | Concentration récupérée (mg/l) | DO (344 nm) | Concentration récupérée (mg/l) |
| 1 | 0,56 | 10,26 | 0,19 | 3,43 |
| 2 | 0,51 | 9,36 | 0,19 | 3,49 |
| 3 | 0,47 | 8,55 | 0,19 | 3,52 |
| 4 | 0,43 | 7,96 | 0,19 | 3,50 |
| 7 | 0,38 | 7,04 | 0,19 | 3,43 |
| 9 | 0,40 | 7,25 | 0,19 | 3,48 |
| 10 | 0,38 | 6,94 | 0,18 | 3,36 |
| 14 | 0,39 | 7,05 | 0,19 | 3,46 |

Tableau XI : Concentration mesurée en 2,6-difluoro-BNT avant et après filtration à pH 3,5 et en fonction du temps (PEG 400 : 1 %) pour une charge initiale égale à 30 mg.l⁻¹.

| Temps (jours) | Avant filtration | | Après filtration | |
|---------------|------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|
| | DO (400 nm) | Concentration récupérée (mg/l) | DO (400 nm) | Concentration récupérée (mg/l) |
| 1 | 1,43 | 21,79 | 0,11 | 1,70 |
| 2 | 1,44 | 21,98 | 0,15 | 2,33 |
| 3 | 1,60 | 24,55 | 0,29 | 4,39 |
| 4 | 1,93 | 29,46 | 0,26 | 3,91 |

Tableau XII : Concentration mesurée en 2,6-difluoro-BNT avant et après filtration à pH 7,2 et en fonction du temps (PEG 400 : 1 %) pour une charge initiale égale à 30 mg.l⁻¹.

Après avoir filtré le milieu, on observe le même phénomène que précédemment. Cependant, la concentration initiale limite est de 52 mg/l. De plus, nous remarquons que pour une concentration initiale, les DO avant et après filtration sont significativement différentes : le pourcentage de produit perdu à cause de la filtration varie entre 50 à 90 %. La perte est d'autant plus élevée que la concentration initiale est faible.

3. Influence du temps

Le temps représente la durée qui sépare le début de l'expérience et le moment où la mesure est effectuée. Dans ce cas, la filtration est réalisée une fois en début d'expérimentation.

L'étude a été réalisée à pH 3,5 et pH 7,2. Les solutions sont préparées avec un pourcentage en PEG 400 constant et égal à 1 %.

Avant filtration et à pH 3,5, la concentration diminue faiblement jusqu'au septième jour puis se stabilise au cours des jours suivants (tableau XI). La concentration passe de 10,26 à 7,04 mg/l entre le premier et le septième jour. Puis la concentration reste à une valeur d'environ égale à 7,25 mg/l après le septième jour.

Si on effectue la filtration au même pH, on note une diminution très importante de la concentration en produit toxique (pourcentage de perte compris entre 50 et 70 %) ; cependant on constate qu'elle reste constante dans le temps (la concentration est environ égale à 3,4 mg/l).

A pH 7,2, la DO à 400 nm augmente légèrement avec le temps lorsque la solution n'est pas filtrée : elle passe de 21,79 à 29,46 mg/l entre le premier et le quatrième jour (tableau XII).

Avec une solution filtrée, il est possible de faire la même constatation que celle effectuée à pH 3,5 après filtration : la concentration reste relativement constante au cours du temps en dépit d'une fluctuation importante des valeurs.

En résumé, on observe une insolubilisation ou une dégradation progressive du produit à pH 3,5. Par contre, à pH 7,2, il y a solubilisation progressive.

| Temps (jours) | Avant filtration | | Après filtration | |
|---------------|------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|
| | DO (344 nm) | Concentration récupérée (mg/l) | DO (344 nm) | Concentration récupérée (mg/l) |
| 1 | 0,30 | 4,58 | 0,02 | 0,34 |
| 2 | 0,27 | 4,20 | | |
| 3 | 0,28 | 4,31 | 0,03 | 0,40 |
| 6 | 0,27 | 4,18 | 0,03 | 0,40 |
| 7 | | | 0,01 | 0,14 |
| 9 | | | 0,02 | 0,32 |

Tableau XIII : Concentration mesurée en BNT avant et après filtration à pH 3,5 et en fonction du temps (PEG 400 : 1 %) pour une charge initiale égale à 30 mg.l⁻¹.

| Temps (jours) | Avant filtration | | Après filtration | |
|---------------|------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|
| | DO (420 nm) | Concentration récupérée (mg/l) | DO (420 nm) | Concentration récupérée (mg/l) |
| 1 | 0,78 | 9,59 | 0,55 | 6,75 |
| 2 | 0,77 | 9,52 | 0,59 | 7,25 |
| 3 | 0,72 | 8,89 | 0,75 | 9,32 |
| 6 | 0,71 | 8,71 | 0,67 | 8,34 |
| 7 | 0,70 | 8,65 | 0,68 | 8,37 |
| 8 | 0,66 | 8,17 | | |
| 9 | 0,66 | 8,15 | | |

Tableau XIV : Concentration mesurée en BNT avant et après filtration à pH 7,2 et en fonction du temps (PEG 400 : 1 %) pour une charge initiale égale à 30 mg.l⁻¹.

| Temps de culture (Heures) | pCl ₅₀ | |
|---------------------------|-------------------|--------|
| | pH 3,5 | pH 7,2 |
| 24 | - | - |
| 48 | 4,96 | 5,25 |
| 72 | 4,70 | 4,99 |
| 96 | 4,21 | 4,49 |
| 120 | 3,92 | 3,76 |
| 144 | 3,80 | 4,11 |
| 168 | 3,11 | 4,08 |

Tableau XV : Valeurs des pCl₅₀ en fonction du temps et du pH pour le 3-chloro-BNT

| Temps de culture (Heures) | pCL ₅₀ | |
|---------------------------|-------------------|--------|
| | pH 3,5 | pH 7,2 |
| 24 | 5,00 | 5,52 |
| 48 | 4,66 | 4,78 |
| 72 | 3,95 | 5,31 |
| 96 | - | 4,95 |
| 120 | - | 4,80 |
| 144 | - | 4,50 |

Tableau XVI : Valeurs des pCL₅₀ en fonction du temps et du pH pour le 3-chloro-BNT

B. ETUDES RELATIVES AU BNT

Le BNT ne se dégrade pas ou très peu dans le temps (tableaux XIII et XIV). Quel que soit le pH, la concentration entre le premier et le dernier jour de la manipulation n'évolue que très peu : on observe une légère diminution qui semble légèrement plus marquée à pH 7,2 qu'à pH 3,5.

La différence de concentration entre la solution avant et après filtration est beaucoup moins importante à pH 7,2 qu'à pH 3,5.

La lecture de ces tableaux montre qu'il y a une légère insolubilisation ou dégradation progressive avant filtration. Par contre, l'interprétation des résultats après filtration ne permet pas d'aboutir à une explication satisfaisante.

IV. INFLUENCE DU 3-CHLORO-BNT SUR LES EUGLÈNES

A. INHIBITION DE LA CROISSANCE

Le calcul des pCl_{50} permet de dégager les remarques suivantes (tableau XV) :

- L'inhibition de la croissance diminue au cours du temps quel que soit le pH.
- Le 3-chloro-BNT possède un effet inhibiteur plus marqué à pH 3,5 qu'à pH 7,2 lors des premières heures d'exposition. Cependant, la variation de l'effet inhibiteur est plus importante à pH 7,2.
- Les valeurs maximales des pCl_{50} se situent à la 48^e heure quel que soit le pH.

B. MORTALITÉ DES EUGLÈNES

D'après le calcul des pCL_{50} (tableau XVI), nous pouvons noter que la toxicité globale du 3-chloro-BNT diminue au cours du temps quel que soit le pH. Le produit a une toxicité un peu plus élevée à pH 3,5 qu'à pH 7,2 (à la 24^e h, $pCL_{50} = 5,52$ à pH 3,5 et $pCL_{50} = 5,00$ à pH 7,2).

A pH 7,2, l'effet toxique diminue constamment avec le temps d'exposition tandis que son évolution est plus complexe à pH 3,5.

COMMENTAIRES

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord rappeler les résultats que nous avons obtenus. Puis nous tenterons d'expliquer les raisons pour lesquelles nous observons une perte de produit par rapport à la charge initiale (concentration supposée et estimée en fonction de la quantité de produit dissous dans le solvant). Dans un troisième temps, nous comparerons nos résultats à ceux parus dans la littérature.

I. SYNTHÈSE DES RÉSULTATS

A. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Les résultats précédents nous permettent de préciser les points suivants :

- Nous avons pu remarquer que la filtration sur une membrane avec des pores de $0,22 \mu\text{m}$ de diamètre retenait une grande partie du produit. Ceci pose un problème car cette manipulation est utilisée pour stériliser la solution toxique. Nous avons donc stérilisé le milieu de culture à l'autoclave (120°C , 20 min) et nous avons ensuite rajouté le produit dans son solvant.

- Les euglènes se développent mieux à la lumière qu'à l'obscurité lorsqu'elles sont cultivées avec le milieu de Schiff.
- De plus, les algues prolifèrent d'une manière plus importante avec le milieu de Schiff qu'avec le milieu lactate. Ce dernier permettait d'obtenir une croissance de la population cellulaire équivalente à celle observée à l'obscurité avec le milieu de Schiff.
- Le PEG 400 ne modifie pas sensiblement la croissance des algues lorsque sa concentration est inférieure ou égale à 4 %. Par contre, pour des valeurs supérieures, on constate tout d'abord un phénomène cytostatique puis un phénomène cytotoxique.

B. RÉCUPÉRATION DES PRODUITS

Les points suivants résument les résultats que nous obtenus :

- On observe une précipitation du 2,6-difluoro-BNT quelle que soit la concentration en PEG 400. Toutefois, il est nécessaire de préciser que ce phénomène reste discret car la solution est limpide lors d'une observation à l'oeil nu.
- L'étude du vieillissement d'une solution de 2,6-difluoro-BNT montre qu'il y a une insolubilisation ou une dégradation progressive du produit à pH 3,5. Par contre, on note une solubilisation progressive à pH 7,2.
- L'évolution de la DO dans le cas du BNT à pH 3,5 est comparable à celle décrite pour le 2,6-difluoro-BNT. A pH 7,2, les résultats ne permettent pas de dégager une interprétation satisfaisante.

C. TOXICITÉ DU 3-CHLORO-BNT

La détermination des paramètres de toxicité (pCI_{50} , pCL_{50}) permet de dégager les points suivants :

- Les valeurs des pCI_{50} et pCL_{50} diminuent d'une manière importante au cours du temps.

- De plus, nous constatons qu'elles sont généralement toujours plus élevées à pH 7,2 qu'à pH 3,5.

II. DISCUSSION

A. *EFFET DU PEG 400*

Comme nous l'avons précisé précédemment, nous avons montré que le PEG 400 n'a aucune influence notable sur la croissance des euglènes lorsque sa concentration dans le milieu de culture est inférieure ou égale à 4 %. Ces résultats confirment ceux obtenus dans les travaux précédents.

Pour ces raisons, nous avons donc utilisé pour nos expériences un milieu contenant 1,6 % de PEG 400.

B. *RÉCUPÉRATION DU 2,6-DIFLUORO-BNT OU DU BNT*

Tout au long de nos essais, nous avons observé une perte de produit par rapport à la concentration initiale. A ce propos, nous avons émis deux hypothèses :

- La dissolution du produit dans le PEG 400 serait incomplète. En effet, lorsqu'on solubilise le dérivé du BNT dans le solvant, on effectue une agitation sonore qui a tendance à provoquer une élévation de température qui pourrait être responsable de la dégradation d'une partie du produit. Pour éviter ce phénomène, on peut rallonger le temps nécessaire à la solubilisation en interrompant régulièrement l'agitation. On arrête la sonication lorsqu'il ne reste plus de cristaux de produit visible. Ce moment est donc déterminé arbitrairement.
- On peut penser aussi que la perte de produit serait liée à une certaine dégradation de la molécule lors de son stockage. La charge initiale supposée serait supérieure à la concentration réelle de principe actif.

L'une ou l'autre hypothèse peuvent être envisagées pour tenter d'expliquer cette perte de produit. Cependant, d'autres hypothèses peuvent être formulées afin d'interpréter ce phénomène.

| | pH 3,5 | | | | pH 7,2 | | | |
|------------------|--------|------|------|------|--------|------|------|------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 24 | 48 | 72 | 96 |
| BNT | 4,96 | 5 | 5 | 5 | 4,68 | 4,74 | 4,66 | 4,3 |
| 3-bromo-BNT | 4,65 | 4,67 | 4,67 | 4,58 | 4,89 | 4,94 | 5,02 | 4,99 |
| 2,5-dichloro-BNT | 5,07 | 4,97 | 4,85 | 4,75 | 4,8 | 4,65 | 4,49 | 4,35 |
| 3,4-dichloro-BNT | 5,33 | 5,32 | 5,05 | 4,29 | 5,26 | 5,51 | 5,42 | 5,35 |
| 3,5-dichloro-BNT | 5,17 | 5,61 | 5,87 | 5,75 | 3,94 | 4,61 | 4,72 | 4,77 |

Tableau XVII : Valeurs des pCI_{50} obtenues pour les euglènes en fonction de la durée de l'expérience et du pH (d'après VIGNOLES, 1990).

| | pH 3,5 | | | | pH 7,2 | | | |
|------------------|--------|------|------|------|--------|------|------|------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 24 | 48 | 72 | 96 |
| BNT | 4,84 | 4,85 | 4,85 | 4,85 | 4,7 | 4,55 | 4,3 | 4,01 |
| 3-bromo-BNT | 4,17 | 4,28 | 4,38 | 4,43 | 5,37 | 5,2 | 5,09 | 5,03 |
| 2,5-dichloro-BNT | 5,08 | 5,04 | 4,97 | 4,86 | 4,94 | 4,73 | 4,48 | 4,34 |
| 3,4-dichloro-BNT | 5,49 | 5,37 | 5,28 | 5,23 | 5,66 | 5,11 | 3,81 | < 3 |
| 3,5-dichloro-BNT | 5,71 | 5,95 | 6,03 | 5,98 | 2,4 | 2,97 | 3,71 | 3,97 |

Tableau XVIII : Valeurs des pCL_{50} obtenues pour les euglènes en fonction de la durée de l'expérience et du pH (d'après VIGNOLES, 1990).

De plus, le phénomène de saturation observé lors de la détermination de la concentration dans le milieu peut trouver son explication dans les hypothèses précédentes. Cependant, on peut supposer également que le PEG 400 ne crée pas suffisamment de liaisons hydrogènes avec la molécule de BNT pour permettre de solubiliser et conserver une certaine proportionnalité entre la concentration initiale et la concentration mesurée.

C. TOXICITÉ DU 3-CHLORO-BNT

Nous avons estimé l'efficacité de ce produit à l'aide de deux paramètres (pCL_{50} et pCI_{50}). A titre de comparaison, nous avons fait figurer les résultats obtenus par VIGNOLES (1990) avec le BNT et quatre de ses dérivés dans les tableaux XVII et XVIII. Nous pouvons alors dégager les observations suivantes :

- Les pCI_{50} et les pCL_{50} du 3-chloro-BNT sont respectivement comparables à celles du 3-bromo-BNT quel que soit le pH, avec cependant une décroissance plus rapide de nos valeurs à pH 3,5.
- A pH 3,5, on note que les pCI_{50} et les pCL_{50} de notre produit sont toujours inférieures à celles des dérivés dichlorés.
- A pH 7,2, on constate que seul le 3,4-dichloro-BNT possède des pCI_{50} dont les valeurs sont supérieures à celles du 3-chloro-BNT quel que soit le temps de culture. Les pCL_{50} du 3,4-dichloro-BNT sont supérieures à celles de notre produit jusqu'à la 48^e h seulement. La toxicité de ce dernier serait plus durable que celle des autres produits.

Ces résultats confirment globalement ceux des relations structure-activité qualitatives où les différents auteurs précisaient que :

- Les produits les plus efficaces sont ceux qui possèdent un substituant halogéné en position *mé*ta.
- Cette efficacité est également augmentée lorsque le cycle benzénique est substitué une deuxième fois par un halogène.

Seuls les résultats des pCL_{50} à pH 7,2 des 72^e et 96^e heures ne semblent pas suivre cette règle.

| | | pH 3,5 | pH 7,2 |
|---|------|---|---|
| pCl ₅₀ (paramètres de substituant) modèles 1 | 24 h | $3,77 + 0,6 \Sigma \pi^2$ | $4,52 + 0,48 \Sigma \pi - 0,72 \Sigma \sigma_o^2$ |
| | 48 h | $4,22 + 0,23 \Sigma \pi^2 + 1,71 \Sigma \sigma_{mp}^2$ | $4,64 + 0,52 \Sigma \pi - 0,81 \Sigma \sigma_o^2$ |
| | 72 h | $4,01 + 0,28 \Sigma \pi^2 + 2,09 \Sigma \sigma_{mp}^2$ | $4,58 + 1,22 \Sigma \pi - 1,89 \Sigma \sigma_{mp} - 1,3 \Sigma \sigma_o^2$ |
| | 96 h | $4,27 + 2,78 \Sigma \sigma_{mp}^2$ | $4,51 + 1,3 \Sigma \pi - 1,97 \Sigma \sigma_{mp} - 1,4 \Sigma \sigma_o^2$ |
| pCl ₅₀ (paramètres globaux) modèles 2 | 24 h | $3,08 + 0,92 \log P$ | $3,6 + 0,61 \log P$ |
| | 48 h | $3,05 + 0,73 \log P - 0,35 \log k$ | $3,02 + 0,57 \log P - 0,52 \log k$ |
| | 72 h | $3,32 + 0,85 \log P$ | $2,77 + 0,6 \log P - 0,62 \log k$ |
| | 96 h | $3,05 + 1,02 \log P$ | $2,92 + 0,51 \log P - 0,54 \log k$ |
| pCL ₅₀ (paramètres de substituant) modèles 3 | 24 h | $3,33 + 3,13 \Sigma \sigma_{mp} + 0,99 \Sigma \sigma_o$ | $4,12 + 2,94 \Sigma \pi - 9,69 \Sigma \sigma_{mp}^2 - 2,45 \Sigma \sigma_o$ |
| | 48 h | $3,61 + 2,88 \Sigma \sigma_{mp} + 0,64 \Sigma \sigma_o$ | $4,4 + 1,99 \Sigma \pi - 7,12 \Sigma \sigma_{mp}^2 - 1,97 \Sigma \sigma_o$ |
| | 72 h | $4,1 + 2,25 \Sigma \sigma_{mp}$ | $4,34 + 1,45 \Sigma \pi - 5,39 \Sigma \sigma_{mp}^2 - 1,44 \Sigma \sigma_o$ |
| | 96 h | $4,03 + 2,28 \Sigma \sigma_{mp}$ | $4,19 + 1,6 \Sigma \pi - 4,55 \Sigma \sigma_{mp}^2 - 1,61 \Sigma \sigma_o$ |
| pCL ₅₀ (paramètres globaux) modèles 4 | 24 h | $9,55 + 0,34 \log P^2 + 3,74 \log k$ | $3,88 + 0,31 \log P^2$ |
| | 48 h | $7,59 + 0,33 \log P^2 + 2,46 \log k$ | $4,11 + 0,2 \log P^2$ |
| | 72 h | $3,99 + 0,26 \log P^2$ | $3,86 + 0,3 \log P^2$ |
| | 96 h | $3,91 + 0,27 \log P^2$ | $3,7 + 0,33 \log P^2$ |

Tableau XIX : modèles mathématiques déterminés par VIGNOLES (1990) en fonction du temps et du pH en considérant le BNT et ses dérivés comme des bases faibles.

($\Sigma \pi$: somme des paramètres de Hansch ; $\Sigma \sigma$: somme des paramètres de Hammett pour les dérivés substitués en position *mé*ta ou *para* ($\Sigma \sigma_{mp}$ d'après PERRIN *et al.*, 1981) et pour ceux substitués en position *ortho* ($\Sigma \sigma_o$ d'après SHORTER, 1982) ; P : coefficient de partage octanol/eau calculé par la méthode de LEO (1983) ; k : constante de vitesse du premier ordre en h⁻¹ pour l'hydrolyse alcaline, mesurée dans le tampon glycine/NaOH, 10 % CH₃CN, pH 10,8, 40° C).

| | pH 3,5 | | | | pH 7,2 | | | |
|--|--------|------|------|------|--------|------|------|------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 24 | 48 | 72 | 96 |
| pCl ₅₀ calculées (modèles 1) | 4,07 | 4,57 | 4,44 | 4,65 | 4,86 | 5,01 | 4,75 | 4,70 |
| pCl ₅₀ calculées (modèles 2) | 4,66 | 4,90 | 4,78 | 4,80 | 4,65 | 4,88 | 4,86 | 4,72 |
| pCL ₅₀ calculées (modèles 3) | 4,49 | 4,68 | 4,93 | 4,87 | 4,88 | 4,84 | 4,63 | 4,70 |
| pCL ₅₀ calculées (modèles 4) | 4,20 | 4,38 | 4,76 | 4,71 | 4,80 | 4,70 | 4,75 | 4,68 |

Tableau XX : Valeurs des pCl₅₀ et pCL₅₀ obtenues avec les modèles mathématiques déterminés par VIGNOLES (1990) pour chaque pH et en fonction du temps de culture.

D. RELATION STRUCTURE-ACTIVITÉ QUANTITATIVE

Nous avons cherché à savoir si les modèles mathématiques de relation structure-activité déterminés par VIGNOLES (1990) permettaient de prévoir les valeurs des pCI_{50} et des pCL_{50} pour le 3-chloro-BNT. Les tableaux XIX et XX regroupent respectivement ces modèles en fonction du temps de culture et du pH, et les valeurs des pCI_{50} et pCL_{50} calculées pour notre produit à partir des équations répertoriées.

Dans certains cas, nos données expérimentales sont proches des valeurs théoriques. Les modèles de relation structure-activité permettent donc d'estimer d'une manière relativement précise les pCI_{50} et pCL_{50} . Dans les autres cas, la différence observée entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques est très importante. Elle peut être essentiellement due aux fluctuations importantes de nos mesures.

D'une manière générale, nous pouvons néanmoins considérer que nos valeurs pouvaient être calculées par les équations précitées. Cependant, il reste de continuer à effectuer des évaluations biologiques sur d'autres dérivés afin de conforter les modèles de VIGNOLES (1990) car ces derniers ont été calculés en n'utilisant que douze produits.

CONCLUSION

Notre travail s'inscrit dans le cadre des études effectuées sur le BNT et ses dérivés. Après avoir effectué une détermination des conditions optimales, nous avons réalisé des expériences visant à mettre en évidence la toxicité du 3-chloro-BNT vis-à-vis d'*Euglena gracilis*. Nous avons choisi cette algue verte comme modèle végétal car elle présente l'avantage d'être sensible aux pesticides.

Les résultats obtenus au cours de nos essais montrent que :

- Le pourcentage en PEG 400 dans le milieu de culture n'a pas d'influence notable sur la dissolution du produit toxique.
- La dissolution du dérivé du BNT dans le solvant et sa dilution dans le milieu de culture paraissent être limitées par un seuil de saturation. Ce phénomène peut être dû soit à une mauvaise dissolution du produit dans le PEG 400, soit à une mauvaise rétention des molécules dans le solvant.
- Une perte de produit très importante a lieu lors de la filtration stérilisante. Nous avons, par conséquent, été obligée de modifier le protocole expérimental mis au point par

VIGNOLES (1990) en rajoutant le produit dissous dans le PEG 400 directement dans le milieu de culture préalablement autoclavé.

- Le PEG 400 n'a aucune influence sur la croissance d'*E. gracilis* lorsque sa concentration dans le milieu de culture est inférieure à 4 %.
- Les euglènes se multiplient d'une manière plus ou moins importante en fonction du milieu de culture. Le milieu de Schiff paraît plus favorable à une importante multiplication des cellules que le milieu lactate.
- Un éclairage artificiel avec une photophase de 12 h diurnes est plus favorable au développement des algues que l'obscurité totale.
- Les valeurs expérimentales de pCI_{50} et pCL_{50} obtenues pour le 3-chloro-BNT auraient pu être estimées à l'aide des modèles de relation structure-activité quantitative déterminés par VIGNOLES (1990).

Ces résultats s'inscrivent dans la continuité des études relatives aux dérivés du BNT. Ils permettent entre autres de confirmer la majorité des résultats précédents. De plus, ils apportent des renseignements nouveaux concernant la dissolution des produits dans le solvant et précisent aussi les conditions optimales de culture des euglènes.

Cependant, ces données restent néanmoins parcellaires et nécessitent la réalisation de manipulations complémentaires visant à expliquer précisément les raisons de la perte du produit après dilution dans le milieu de culture.

BIBLIOGRAPHIE

- BAYER (1970). Bayluscide® : molluscicide for the control of freshwater snails, vectors of bilharziasis. Documentation scientifique Bayer, 7 p.
- BERTAUX O. (1976). Etude métabolique et cytologique d'*Euglena gracilis* Z synchrone. Rôle de la vitamine B12 dans le contrôle de la division cellulaire. Thèse Doct. Univ. Paris VI, Sci. Nat., 143 p.
- 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 Cd²⁺ sur les cellules d'*Euglena gracilis* L. : cytotoxicité et acquisition d'une résistance. *C. R. Acad. Sci. Paris série D* **287** 463-466.
- BOURRELY P. (1970). Les algues d'eau douce, tome III : algues bleues et rouges. Boubée et C^{ie}, ed. Paris, 512 p.

- CABRIDENC R. (1977). Tests biologiques d'évaluation d'effets toxiques de substances chimiques dans l'environnement. Collection Recherche et Environnement, tome 5.
- CAVIER R., GAYRAL P., GUILLAUMEL J., CLAVEL J.M., DEMERSEMAN P., ROYER R. (1978). Recherches sur les dérivés nitrés d'intérêt biologique. XVI. Relations entre structures et activités protozoocides, anthelminthiques et molluscicides dans la série du benzamido-2 nitro-5 thiazole. *Eur. J. Med. Chem.* **13** 539-543.
- CLEDAT D. (1989). Influence de la structure sur la basicité, la lipophilie et la stabilité de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole. Thèse Doct. Univ. Chimie-Chimie Physique, Limoges, 83 p.
- CLEDAT D., DEBORD J., PENICAUT B. (1989). Basicité et lipophilie de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole. *Analisis* **17** 398-400.
- 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.
- 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.
- EL-GINDY H.I. (1975). Mollutox and Bayer 73 as molluscicides against *Bulinus truncatus* and *Biomphalaria alexandrina*. *Egypt. J. Bilharz.* **2** 213-220.
- ENCYCLOPEDIA UNIVERSALIS (1988). Euglenophyceae. Encyclopedia universalis éd., Paris, 522-524.
- EUZEBY J. (1971). Les maladies vermineuses et leurs incidences sur la pathologie humaine. Tome II. Maladies dues aux Plathelminthes. Fasc. 2. Trématodes. Livre 1. Généralités. Distomatoses hépato-biliaires. Masson et Cie ed., Paris, 798 p.

- FRAYSSE J.L. (1987). Basicité et hydrolyse de quelques dérivés du BNT. Thèse Doct. Pharm., Limoges, 39 p.
- FREYSSINET G., HETZMANN P., VERDIER G. (1972). Influence des conditions nutritionnelles sur la réponse à l'éclairement chez les euglènes étioilées. *Physiol. Vég.* **10** 421-442.
- GAYRAL P., CAVIER R. (1977). Actualités et perspectives d'avenir des molluscicides. In : Actualité en chimie thérapeutique, 5^e série, Société de Chimie Thérapeutique ed., Paris, 177-209.
- GORENFLOT R. (1975). Précis de Botanique. Doin ed., Paris VI, 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.
- HUSSEIN AYOUB S.M., YANKOV L.K. (1987). Molluscicidal properties of the Sudan acacias. *Fitoterapia* **58** 363-366.
- KLOOS H., Mc CULLOUGH F.S. (1982). Plant molluscicides. *Planta Med.* **46** 195-209.
- 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.
- 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. Pharm., Limoges, 145 p.
- LEO A. (1983). The octanol-water partition coefficient of aromatic solutes : effect of electronic interactions, alkyl chains, hydrogen bonds and *ortho*-substitution. *J. Chem. Perkin Trans.* **2** 825-838.
- LEVEQUE C. (1990). Impact de la lutte antivectorielle sur l'environnement aquatique. 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.
- MARSTON A., HOSTETTMANN K. (1985). Plant molluscicides. *Phytochemistry* **24** 639-652.
- 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^e cycle Sci. Pharm., Paris XI, 118 p.
- MOUKRIM A. (1987). Action de pesticides organophosphorés sur le mollusque *Lymnaea peregra ovata* Müller. Etudes biochimiques, histologiques et histochimiques. Thèse Doct. Univ. Limoges, Sci. Nat., 133 p.
- OUTIFRAKH A. (1984). Etude de l'influence de la lumière sur les euglènes étiolées. Analyses préliminaires du GADPH avec NADP. DEA Biol. Cell. Mol., Limoges, 25 p.
- PARIS M., HURABIELLE M. (1981). Abrégé de matière médicale. Masson ed., Paris, Tome I, 339 p.
- PERRIN D.D., DEMPSEY D., SERJEANT E.P. (1981). pK_a prediction for organic acids and bases. Chapman and Hall, Londres/New-York, 146 p.
- 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.
- RONDELAUD D. (1986). Le contrôle mixte et alterné de *Lymnaea truncatula* Müller par voie chimique et biologique. Premiers essais sur le terrain. *Ann. Rech. Vét.* **17** 15-20.
- RONDELAUD D. (1988 a). Les effets d'une concentration sub létale de molluscicide (CuCl₂) sur l'activité reproductrice et les déplacements du mollusque hôte *Lymnaea truncatula* Müller. *Ann. Rech. Vét.* **19** 273-278.

- RONDELAUD D. (1988 b). Le contrôle mixte et alterné de *Lymnaea truncatula* Müller : étude comparative de trois techniques pour l'épandage du molluscicide. *Ann. Rech. Vét.* **19** 279-282.
- ROUX P. (1984). Influence du CIPC sur la croissance et la morphologie plastidienne d'*Euglena gracilis*. Thèse Doct. Pharm., Limoges, 81 p.
- SHORTER J. (1982). Correlation analysis of organic reactivity with particular reference to multiple regression. Research Studies Press, Chichester, 235 p.
- TARDIEU C. (1994). Effet de l'action prolongée du 2-benzamido-5-nitrothiazole sur la croissance d'*Euglena gracilis* Klebs. Thèse Doct. Pharm., Limoges, 72 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 antivectérielle dans la distomatose à *Fasciola hepatica* L. I. Relation structure-activité quantitative de composés molluscicides sur *Lymnaea peregra ovata* Müller. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* **8** 119-125.
- VIGNOLES P., DREYFUSS G., RONDELAUD D. (1991). Activité létale du benzamido-2 nitro-5 thiazole et de ses dérivés sur *Lymnaea peregra ovata* Müller (Mollusque Pulmoné) et *Gammarus pulex pulex* L. (Crustacé Amphipode). *Ann. Rech. Vét.* **22** 359-363.
- VIGNOLES P., CLEDAT D., DREYFUSS G., RONDELAUD D., PENICAUT B. (1994). Quantitative structure-activity relationships of 2-benzamido-5-nitrothiazole molluscicidal derivatives. *Quant. Struc. Act. Relat.* (sous presse).

ANNEXES

ANNEXE 1

Composition du milieu de Schiff (GREENBLATT et SCHIFF, 1959)

Ce milieu comprend une fraction organique et une fraction minérale. La fraction organique est constituée de la manière suivante :

| | |
|-------------------------------|--------------|
| Fraction minérale | 4,0 ml |
| Acide malique | 0,8 g |
| Acide glutamique | 2,0 g |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | 0,8 g |
| KH_2PO_4 | 0,16 g |
| H_2O | qsp 200,0 ml |

Les acides et les sels de phosphore sont dissous dans 196 ml d'eau distillée tiède. On ajoute à cette solution 4 ml (2 %) de la fraction minérale qui va apporter divers oligo-éléments nécessaires au développement de la cellule. Cette fraction minérale est préparée préalablement et conservée au réfrigérateur. Elle est composée de :

| | |
|---|---------------|
| $\text{Mg SO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 12,0 g |
| $\text{CaCl}_2, 2 \text{ H}_2\text{O}$ | 0,9 g |
| $\text{FeSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 0,4 g |
| BO_3H | 0,2 g |
| EDTA Na_2 | 0,5 g |
| $\text{ZnSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 0,3 g |
| $\text{MnSO}_4, \text{ H}_2\text{O}$ | 0,1 g |
| H_2SO_4 | 10,0 ml |
| H_2O | qsp 1,0 litre |

Pour avoir une meilleure dissolution et une bonne homogénéisation, le mélange est soumis à une agitation. Les vitamines B_1 et B_{12} conservées à +4 °C, sont rajoutées seulement au moment de la mise en culture avec des quantités respectivement égales à 6 mg et à 26 µg. Elles sont à l'état de solutions concentrées, stérilisées par filtration.

ANNEXE 2

Composition du milieu lactate

Le milieu est constitué de la manière suivante :

| | |
|---|---------------|
| $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ | 0,6 g |
| CaCl_2 | 0,2 g |
| MgSO_4 | 0,5 g |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | 0,4 g |
| FeCl_3 (solution à 29 %) | 1,0 goutte |
| Acide lactique L | 3,0 ml |
| vit B ₁ (à 1 g.l ⁻¹) | 1,0 ml |
| vit B ₁₂ (à 4 mg.l ⁻¹) | 0,5 ml |
| Solution acide métallique | 10,0 ml |
| H ₂ O | qsp 1,0 litre |

La solution d'acide métallique se compose des éléments suivants :

| | |
|-------------------|---------------|
| ZnSO ₄ | 10,0 g |
| MgSO ₄ | 8,0 g |
| H ₂ O | qsp 1,0 litre |

Les différents sels sont dissous dans l'eau distillée tiède. On ajoute l'acide lactique puis la solution métallique. Les vitamines seront introduites dans le milieu seulement au moment de la mise en culture.

ANNEXE 3

Les dérivés du BNT : acide ou base ?

Jusqu'à présent, les dérivés du BNT ont toujours été considérés comme des monobases faibles en milieu aqueux. Or, des travaux récents montrent en fait qu'il s'agit d'acides faibles (CLEDAT, résultats non publiés). Cependant, cette nouvelle donnée ne change pas fondamentalement l'interprétation que l'on peut tirer des résultats : les produits peuvent exister soit sous la forme neutre soit sous une forme chargée (après départ d'un proton).

en effet, bien que le mode d'action des dérivés du BNT reste assez mal connu, il est logique de penser qu'il serait similaire à celui du Niclosamide.

Ces molécules, capables de capter ou de perdre un proton seraient responsables d'une action découplante au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales et provoqueraient des désordres cellulaires.

De plus, on peut quand même affirmer que :

- l'activité molluscicide peut être améliorée en synthétisant des composés plus lipophiles. En effet, la toxicité est due essentiellement à la lipophilie du produit pendant les 96 premières heures d'intoxication (VIGNOLES, 1990).
- la toxicité est renforcée par la présence d'halogènes sur le cycle benzénique.

Des travaux précédents (MADULO-LEBLOND *et al.*, 1981) ont montré qu'on peut augmenter les propriétés molluscicides du BNT par substitution de son cycle benzénique, en position convenable, par un ou plusieurs atomes d'halogène : du chlore ou éventuellement du brome.

Le tableau suivant regroupe les paramètres physico-chimiques des produits étudiés ainsi que ceux du BNT non-substitué (CLÉDAT, 1989). Les valeurs de ces paramètres étaient valables lorsque l'on considérait ces produits comme des bases faibles.

| composé | pK _a | log ε ₁ | log ε ₂ | log P | log k | Σ _{II} | Σσ _{mp} | Σσ _o | M.M |
|------------------|-----------------|--------------------|--------------------|-------|--------|-----------------|------------------|-----------------|--------|
| BNT | 6,58 | 4,21 | 4,40 | 0,81 | -1,74 | - | 0 | 0 | 249,3 |
| 3-chloro-BNT | 6,08 | ? | 4,39 | 1,72 | -1,7 | 0,71 | 0,37 | 0 | 283,69 |
| 4-bromo-BNT | 6,23 | ? | 4,42 | 1,87 | -1,724 | 0,86 | 0,22 | 0 | 328,2 |
| 2,6-difluoro-BNT | 5,84 | 4,20 | 4,29 | 0,81 | -1,43 | 0,28 | 0 | 1,06 | 285,22 |

où :

- K_a : constante d'acidité dans H₂O + KCl 0,1 M à 20 °C (pK_a = -log K_a)
- ε₁ : coefficient d'extinction molaire de la forme protonée en l.mol⁻¹.cm⁻¹.

- ϵ_2 : coefficient d'extinction molaire de la forme neutre en $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.
- P : coefficient de partage octanol/eau calculé par la méthode de LEO (1983).
- k : constante de vitesse du premier ordre pour l'hydrolyse alcaline en h^{-1} , valeur mesurée dans le tampon glycine/NaOH, pH 10,8 + 10 % CH_3CN , 40 °C.
- $\Sigma\pi$: somme des paramètres de HANSCH.
- $\Sigma\sigma$: somme des paramètres de HAMMETT pour les dérivés substitués en position *mé*ta ou *para* ($\Sigma\sigma_{\text{mp}}$) et pour ceux substitués en position *ortho* ($\Sigma\sigma_{\text{o}}$). σ_{mp} d'après PERRIN *et al.* (1981). σ_{o} d'après SHORTER (1982).
- M.M. : masse molaire (g.mol^{-1}).

ANNEXE 4

Détermination spectrophotométrique de la concentration en produit

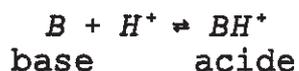
Au début de la réalisation de notre thèse, l'hypothèse selon laquelle on supposait que les dérivés du BNT étaient des bases faibles, prévalait toujours. Par conséquent, tous les calculs utilisés pour déterminer leur concentration en solution sont les suivants :

Selon la loi de Beer-Lambert , nous avons :

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

A : absorbance de la solution
 ϵ : coefficient d'absorption molaire en $l.mol^{-1}.cm^{-1}$
L : longueur du trajet optique (1 cm)
C : concentration du produit en $mol.l^{-1}$

Si le BNT et ses dérivés étaient de bases faibles, selon le pH, il faudrait tenir compte de leur équilibre acido-basique :



$$D'où : A = \epsilon_1 L [BH^+] + \epsilon_2 L [B]$$

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

A : absorbance de la solution

L : longueur du trajet optique (1 cm)

ϵ_1 : coefficient d'extinction de la forme acide $[BH^+]$ en $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

ϵ_2 : coefficient d'extinction de la forme basique $[B]$ en $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

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

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

Lorsque le pH du milieu est égal à 3,5, l'absorbance est mesurée à λ_1 nm (pic de la forme protonée), la forme neutre n'absorberait pas ($\epsilon_2 = 0$) et donc l'équation (1) deviendrait :

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

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

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

ANNEXE 5

Courbe logistique

L'équation de cette courbe est la suivante :

$$N = \frac{N_{\max}}{1 + \left(\frac{N_{\max}}{N_0} - 1 \right) \exp(-k t)} \quad (2)$$

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}

La regression non-linéaire permet de calculer les valeurs de trois paramètres N_0 , N_{\max} et k selon la méthode de Gauss-Newton. Cependant, cette équation ne permettait pas d'affiner correctement les paramètres principalement en raison de la relative petitesse de N_0 devant N_{\max} .

Par conséquent, nous avons utilisé la forme logarithmique de l'équation (2) :

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

On effectue ensuite les approximations initiales suivantes :

- N_{\max} égal à la valeur la plus élevée obtenue lors de la numération
- N_0 égal à $50 \cdot 10^3$ cellules.ml⁻¹

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

avec

t : heure de la première numération

N : nombre de cellules par ml⁻¹ au temps t

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|----|
| Introduction | 8 |
| | |
| Le modèle étudié : <i>Euglena gracilis</i> | 10 |
| I. Classification | 10 |
| II. Description | 12 |
| A. Cytologie | 12 |
| 1. La paroi | 12 |
| 2. Le noyau | 14 |
| 3. Autres constituants cellulaires | 14 |
| B. Biochimie | 15 |
| 1. Pigments des plastes | 15 |
| a. Les chlorophylles | 15 |
| b. Les pigments caroténoïdes | 15 |
| 2. Produits issus du métabolisme | 16 |
| C. Biologie | 16 |
| 1. Reproduction | 16 |
| 2. Mobilité | 16 |
| 3. Nutrition | 17 |
| 4. Écologie | 17 |
| | |
| Propriétés des molluscicides et incidence sur l'environnement | 19 |
| I. Généralités | 19 |
| A. Pourquoi utiliser ces molécules ? | 19 |
| B. Quels sont les parasites concernés ? | 20 |
| 1. Les douves | 20 |
| 2. Les schistosomes | 22 |
| C. Quelles sont les méthodes de lutte ? | 22 |
| 1. Lutte chimique | 22 |
| 2. Lutte biologique | 24 |

| | | |
|------|--|----|
| II. | Différents types de molluscicides | 26 |
| A. | Molluscicides d'origine chimique | 26 |
| B. | Molluscicides d'origine végétale | 27 |
| III. | Incidence des molluscicides sur l'environnement | 28 |
| A. | Modalités de l'étude d'impact | 28 |
| B. | L'impact des molluscicides | 30 |
| 1. | Sur les Algues | 30 |
| a. | Rôle de ces plantes | 30 |
| b. | Evaluation de la toxicité sur les algues | 31 |
| 2. | Sur les Poissons et les Crustacés | 31 |
| | Matériel et méthodes | 33 |
| I. | Matériel biologique | 33 |
| A. | Entretien de la souche | 33 |
| B. | Cinétique de croissance | 35 |
| II. | Les dérivés du BNT | 38 |
| III. | Protocole d'étude | 38 |
| IV. | Méthodologie | 40 |
| A. | Milieux de culture utilisés | 40 |
| B. | Préparation des solutions et des milieux | 40 |
| 1. | Solutions toxiques | 40 |
| 2. | Milieux témoins et milieux contenant le toxique | 40 |
| 3. | Répartition du milieu et ensemencement | 41 |
| C. | Méthode de comptage | 43 |
| D. | Dosages spectrophotométriques des solutions toxiques | 45 |
| E. | Suivi de la densité optique (DO) | 45 |
| 1. | En fonction de la concentration | 45 |
| 2. | En fonction du temps | 46 |
| V. | Paramètres étudiés | 46 |
| A. | Courbe logisitique | 46 |
| B. | Taux de mortalité | 46 |
| C. | Concentration létale à 50 % (CL ₅₀) | 48 |
| D. | Pourcentage de modification de croissance | 48 |

| | | |
|---------------------|--|-----------|
| E. | Concentration inhibitrice à 50 % (CI_{50}) | 48 |
| F. | Concentration activatrice maximale (CA_{max}) | 50 |
| Résultats | | 51 |
| I. | Observations qualitatives | 51 |
| A. | Cellules vivantes | 51 |
| B. | Cellules mortes | 53 |
| II. | Influence de facteurs sur la croissance des euglènes | 53 |
| A. | Influence du milieu de culture | 53 |
| B. | Influence de l'éclairement | 53 |
| C. | Influence du PEG 400 | 55 |
| III. | Sur la quantité de produit récupéré | 55 |
| A. | Etudes relatives au 2,6-difluoro-BNT | 55 |
| 1. | Influence d'un pourcentage constant en PEG 400 | 57 |
| 2. | Influence d'un pourcentage variable en PEG 400 | 57 |
| 3. | Influence du temps | 59 |
| B. | Etudes relatives au BNT | 62 |
| IV. | Influence du 3-chloro-BNT sur les euglènes | 62 |
| A. | Inhibition de la croissance | 62 |
| B. | Mortalité des euglènes | 62 |
| Commentaires | | 63 |
| I. | Synthèse des résultats | 63 |
| A. | Conditions expérimentales | 63 |
| B. | Récupération des produits | 64 |
| C. | Toxicité du 3-chloro-BNT | 64 |
| II. | Discussion | 65 |
| A. | Effet du PEG 400 | 65 |
| B. | Récupération du 2,6-difluoro-BNT ou du BNT | 65 |
| C. | Toxicité du 3-chloro-BNT | 67 |
| D. | Relation structure-activité quantitative | 69 |
| Conclusion | | 70 |

| | |
|---------------------|----|
| Bibliographie | 72 |
| Annexe 1 | 78 |
| Annexe 2 | 79 |
| Annexe 3 | 80 |
| Annexe 4 | 82 |
| Annexe 5 | 84 |



Titre : INFLUENCE DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES SUR LA TOXICITÉ DE QUELQUES DÉRIVÉS DU 2-BENZAMIDO-5-NITROTHIAZOLE VIS-À-VIS D'*Euglena gracilis* Klebs. par Florence CHARRIERAS.

Trois points ont été abordés au cours de ce travail sur la toxicité du 2-benzamido-5-nitrothiazole (BNT) ou de deux dérivés sur la culture d'*Euglena gracilis* Klebs.

Le but du premier point est de déterminer les conditions optimales pour la culture d'*Euglena gracilis*. Pour cette étude, nous avons fait varier trois paramètres : la nature du milieu de culture, l'éclairage et le solvant du produit toxique (le polyéthylène glycol 400 ou PEG 400). Les euglènes se multiplient d'une manière plus ou moins importante en fonction du milieu de culture. Le milieu de Schiff paraît plus favorable à une importante multiplication des cellules que le milieu lactate. Un éclairage artificiel avec une photophase de 12 h diurnes est plus favorable au développement des algues que l'obscurité totale. Le PEG 400 n'a aucune influence sur la croissance d'*E. gracilis* lorsque sa concentration dans le milieu de culture est inférieure à 4 %.

La solubilité du 2-benzamido-5-nitrothiazole (BNT) et du 2,6-difluoro-BNT a été analysée dans un deuxième temps lorsque ces derniers se trouvent en solution dans le milieu de culture des algues. Une perte de produit très importante a lieu lors de la filtration stérilisante. Nous avons, par conséquent, été obligée de modifier le protocole expérimental initial. Le pourcentage en PEG 400 dans le milieu de culture n'a pas d'influence notable sur la dissolution du produit toxique. La dissolution du dérivé du BNT dans le solvant et sa dilution dans le milieu de culture paraissent être limitées par un seuil de saturation. Ce phénomène peut être dû soit à une mauvaise dissolution du produit dans le PEG 400, soit à une mauvaise rétention des molécules dans le solvant.

Enfin, la toxicité du 3-chloro-BNT sur d'*E. gracilis* a été déterminée en calculant les CI_{50} (concentration inhibant la croissance de 50 % des algues) et la CL_{50} (concentration provoquant la mort de 50 % des euglènes). Les valeurs expérimentales de ces paramètres sont proches des valeurs théoriques déterminées à l'aide de modèles de relation structure-activité quantitative.

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