

LA TOXICITÉ DES α -, β -, γ - ET δ -HEXACHLOROCYCLOHEXANES
VIS-À-VIS DE

GLAUCOMA PIRIFORMIS (TETRAHYMENA GELEII)

par

P. CHAIX, L. LACROIX ET C. FROMAGEOT

Laboratoire de Chimie biologique, Institut de Chimie de l'Université, Lyon (France)

La toxicité des différents isomères de l'hexachlorocyclohexane vis-à-vis de divers insectes a fait l'objet de nombreuses investigations qui, toutes, ont montré que, des cinq isomères prévus et connus*, l'isomère γ ou gammexane, présente une activité toujours très supérieure à celle des isomères α et δ souvent encore notable, alors que l'activité de l'isomère β est ou faible, ou nulle. La structure stéréochimique joue donc ici un rôle important**. Pour expliquer cette spécificité de l'action du gammexane, SLADE^{1, 2} a émis l'hypothèse que le gammexane, dont la structure serait analogue à celle du mésoinositol, exerce son action toxique en déplaçant le mésoinositol de ses combinaisons biologiques. Le gammexane agirait ainsi en antagoniste du mésoinositol. Cette hypothèse semble avoir reçu un appui avec les résultats de KIRKWOOD et PHILLIPS³, d'après lesquels, alors que le gammexane inhibe la croissance d'une race de levures déterminée, le mésoinositol diminue considérablement cette action inhibitrice du gammexane, sans d'ailleurs la supprimer entièrement.

L'action du gammexane vis-à-vis d'animaux unicellulaires a été étudiée jusqu'ici, semble-t-il, seulement dans le cas de *Paramecium caudatum*. LLOYD⁴, travaillant avec ce protozoaire, a montré d'une part que le gammexane, à des doses de $1 \cdot 10^{-5}$ à $1 \cdot 10^{-6}$, tue les cellules après en avoir arrêté la division, et d'autre part que, à des doses comprises entre $1 \cdot 10^{-6}$ et $5 \cdot 10^{-7}$, le gammexane produit des cellules hypertrophiées ou ramifiées, selon les cas. LLOYD n'indique d'ailleurs pas sous quelle forme est introduit le gammexane, non plus qu'il ne compare l'action éventuelle des autres isomères à celle de l'isomère γ , ni qu'il ne recherche si le mésoinositol empêche l'action du gammexane.

Pour préciser le mécanisme de l'action biologique du gammexane, nous avons étudié sa toxicité vis-à-vis d'un autre animal monocellulaire, le cilié *Glaucoma piriformis*; nous avons comparé cette toxicité à celle des autres isomères de l'hexachlorocyclohexane, et nous avons observé les influences que pourraient exercer, sur cette toxicité, des substances comme, soit le mésoinositol, dont on pouvait a priori penser qu'il protégerait l'animal contre toute action toxique du gammexane, soit des émulsifiants, dont on pouvait a priori penser qu'ils augmenteraient au contraire son action toxique. C'est cette étude qui fait l'objet du présent travail.

* Deux de ces isomères, isomères „optiques”, n'ont été étudiés jusqu'ici qu'en mélange, sous forme du racémique d.l. D'après SLADE², ce racémique correspondrait à l'isomère α .

** Des modèles représentant cette structure ont été donnés par SLADE².

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Organismes

Glaucoma piriformis représente un matériel d'étude particulièrement commode^{5, 6}. Comme dans nos travaux précédents, la souche utilisée ici provient de la collection de M. A. LWOFF que nous sommes heureux de remercier ici. Les cellules de ce cilié sont généralement employées en suspension dans leur milieu de culture ordinaire („eau de moelle") obtenu en autoclavant $\frac{1}{2}$ heure à 120° 1 cm³ de moelle de boeuf dans 10 ml d'eau distillée. Nous avons d'ailleurs vérifié que les résultats obtenus avec ce milieu se retrouvent sans changement lorsque les cellules sont en suspension soit dans un milieu de culture à l'eau peptonée, soit dans une solution saline tamponnée au phosphate⁸.

La quantité de cellules de *Glaucoma piriformis* présentes dans un volume donné est déterminée par numération directe.

Substances actives

Les isomères de l'hexachlorocyclohexane utilisés ici ont été préparés par cristallisation fractionnée dans les solvants appropriés, à partir de l'hexachlorocyclohexane industriel brut, jusqu'à points de fusion constants. Ces points de fusion sont les suivants:

Isomère	Point de fusion (cor.)	Isomère	Point de fusion (cor.)
α β	160° se sublime au-dessus de 220° (en tube scellé 307°)	γ δ	$112^{\circ}5$ 138°

Pour les dissoudre, nous avons choisi deux solvants, l'alcool éthylique et l'acétone, dont l'action propre, lorsqu'ils sont purs en solution aqueuse, est négligeable sur *Glaucoma piriformis*, à des concentrations bien supérieures encore à celles utilisées ici (Tableau I). Ce sont ces solutions, alcooliques ou acétoniques, qui sont introduites dans le liquide physiologique où se trouvent, en suspension, les cellules de *Glaucoma piriformis*. La teneur en substances dissoutes de ces solutions et le volume sous lequel elles sont introduites, sont indiqués dans les tableaux qui suivent. Quelques instants après cette introduction, on assiste dans certains cas, particulièrement dans le cas du gammexane en solution alcoolique, à une cristallisation de la substance; on verra plus loin l'importance de ce phénomène dans la toxicité de la substance en question vis à vis des cellules du cilié.

TABLEAU I
ACTION DES SOLVANTS PURS (ALCOOL ET ACÉTONE) ET DES TWEENS SUR LA MOTILITÉ
ET LA STRUCTURE DE *Glaucoma piriformis*

Nombre de cellules par μ l	Nature et concentration % du solvant ou du tween	Action biologique
<i>Alcool éthylique à 95°</i>		
180-200	1	Nulle
30	2	Nulle
3-4	3	Nulle
3-4	4	Mort, suivie d'une lyse lente
<i>Acétone</i>		
30	4	Nulle
30	5	Mort et lyse de quelques cellules
<i>Tween 20 ou Tween 80</i>		
30	10	Nulle
30	15	Nulle
30	20	Cellules immobiles, non lysées
30	50	Cellules immobiles, non lysées

D'autre part, nous inspirant des expériences de SAUTET *et Col.*⁷ avec le D.D.T., nous avons préparé des suspensions aqueuses de gammexane à l'aide des ultrasons, en utilisant la technique de Bibliographie p. 63.

GRABAR⁸. 0.3 ml d'une solution alcoolique contenant 20 mg/ml de gammexane sont introduits dans 30 ml d'eau distillée, celle-ci étant soumise déjà aux ultrasons (fréquence 960 kilocycles, puissance émise au niveau du quartz piézoélectrique 6.8 W au cm²). Cette action est maintenue pendant les 30 minutes qui suivent l'introduction de la solution alcoolique dans l'eau, sans que la température de l'ensemble du système dépasse 20°. On obtient ainsi une suspension microcristalline de gammexane, stable pendant plusieurs jours, contenant 200 µg/ml de gammexane.

Comme émulsifiants, nous avons utilisé les „tweens” 20 et 80, dont la structure présente tout l'intérêt que l'on sait⁹. Ces deux tweens sont eux-mêmes de bons solvants du gammexane. Ils possèdent en outre l'avantage de n'être que très peu toxiques vis-à-vis de *Glaucoma piriformis* (Tableau I).

Disposition des expériences

Dans les cas où l'on utilise une solution alcoolique ou acétonique de l'un des hexachlorocyclohexanes, on opère de la façon suivante : dans des tubes à hémolyse, on introduit d'abord la suspension des cellules de *Glaucoma piriformis*, dans l'„eau de moelle” sous un volume de 0.97 ml à 1.00 ml, puis la solution ou la suspension de l'isomère de l'hexachlorocyclohexane étudié, sous un volume variant de 0.03 ml à 0.02 ml suivant la concentration finale à obtenir. Dans tous les cas, le volume final de chaque essai est de 1.00 ml. Des prises de chacun des tubes sont prélevées à des temps déterminés, variant de quelques secondes à plusieurs heures après la mise en contact des cellules du cilié avec les isomères de l'hexachlorocyclohexane. Ces prises, placées dans des lames creuses, sont alors immédiatement examinées en ce qui concerne les modifications éventuelles survenues dans la motilité ou la structure des cellules.

Dans le cas où l'on étudie les suspensions de gammexane obtenues par ultrasons, on ajoute à ces suspensions une quantité convenable de sels minéraux destinés à les rendre aptes à maintenir l'état physiologique normal des ciliés (correspondant à la solution physiologique déjà décrite⁸), puis on y introduit les cellules de *Glaucoma piriformis* sous un volume relativement petit, que l'on prélève sur une suspension de ciliés aussi concentrée que possible.

Toutes les observations sont faites à la température ordinaire.

Toxicité comparée des différents isomères de l'hexachlorocyclohexane introduits en solution alcoolique ou en solution acétonique.

Les expériences portant sur la comparaison de la toxicité des différents isomères de l'hexachlorocyclohexane, sont faites sur des cellules de *Glaucoma piriformis* en suspension dans „eau de moelle”. La concentration finale en alcool dans les tubes varie de 0.15 à 2 % et celle de l'acétone de 0.5 à 3 %. Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau II pour les solutions alcooliques et dans le Tableau III pour les solutions acétoniques.

Avant de discuter les résultats, il convient de faire les remarques suivantes : après leur introduction dans le liquide physiologique où se trouvent les cellules vivantes, les isomères de l'hexachlorocyclohexane, antérieurement en solution dans l'alcool à 95° ou dans l'acétone pure, précipitent dans certains cas, plus ou moins complètement, et à l'état cristallisé. Les tableaux II et III indiquent pour quelles concentrations en solvants et en isomères se produisent ou ne se produisent pas de telles cristallisations. Ces cristallisations, quand elles ont lieu, n'apparaissent pas immédiatement après l'addition de la solution organique au liquide physiologique. Il s'écoule toujours un intervalle de trois minutes environ dans les conditions réalisées ici, notamment à la température ordinaire, intervalle pendant lequel le mélange présente un aspect opalescent : il est alors constitué par une émulsion instable. Dans un essai contenant 0.02 % de gammexane et 2 % d'alcool à 95°, par exemple, on peut constater que c'est uniquement au cours de cette phase précédant la cristallisation que se manifeste l'action toxique : en effet, le liquide physiologique dans lequel le gammexane a cristallisé quelques instants après, apparaît

* Nous remercions ici M. DERVICHIAN qui nous a aimablement, procuré ces substances. Les tweens résultent de l'union d'une chaîne polyoxyalkylénique avec un ester d'acide gras à longue chaîne et d'anhydride d'hexitol. Le tween 20 est un dérivé polyoxyalkylénique du monolaurate de sorbitane, et le tween 80 est un dérivé du monooléate de sorbitane.

TABLEAU II

TOXICITÉ COMPARÉE VIS-À-VIS DE *Glaucoma piriformis*, DES DIFFÉRENTS ISOMÈRES DE L'HEXACHLORO-CYCLOHEXANE INTRODUITS EN SOLUTION ALCOOLIQUE

3 à 4 cellules de *Glaucoma piriformis* par μ l

N = cellules normales

I = immobilisation rapide de tout ou partie des cellules

L = lyse de tout ou partie des cellules

S = maintien de tout l'hexachlorocyclohexane en solution

C = cristallisation de tout ou partie de l'hexachlorocyclohexane 3 minutes environ après son introduction dans le liquide physiologique.

Isomère		Concentration finale en alcool %	Action biologique	Comportement de l'hexachlorocyclohexane
Nature	Concentration finale %			
α	0.02	2	L partielle	C
α	0.01	1	N	C
β	0.03	3	N	C
γ	0.02	2	L totale	C
γ	0.01	1	I totale	C
γ	0.008	0.8	N	C
δ	0.005	0.5	L totale	C très légère
δ	0.0025	2.5	L totale	S
δ	0.0025	0.25	L totale	C très légère
δ	0.0020	0.20	I presque totale	C très légère
δ	0.0015	1.5	L partielle	S
δ	0.0015	0.15	N	C très légère

TABLEAU III

TOXICITÉ COMPARÉE VIS-À-VIS DE *Glaucoma piriformis*, DES DIFFÉRENTS ISOMÈRES DE L'HEXACHLOROCYCLOHEXANE INTRODUITS EN SOLUTION ACÉTONIQUE

3 à 4 cellules de *Glaucoma piriformis* par μ l
Nomenclature comme dans Tableau II

Isomère		Concentration finale en acétone %	Action biologique	Comportement de l'hexachlorocyclohexane
Nature	Concentration finale %			
α	0.02	2	L partielle	C
α	0.01	1	N	S
β	0.03	3	N	C
γ	0.02	2	L totale	C
γ	0.01	1	N	S
δ	0.005	0.5	L partielle	S
δ	0.0025	2.5	I totale puis L totale	S
δ	0.0015	1.5	I partielle	S

comme incapable de provoquer l'immobilisation ou la lyse de cellules de *Glaucoma* ajoutées postérieurement à cette cristallisation, et ce, soit que le liquide contienne encore les cristaux de gammexane, soit qu'il en ait été débarrassé par centrifugation. Une telle précipitation dépend de la nature du solvant organique en question, et apparaît d'autant plus que l'isomère considéré est moins soluble dans le solvant pur (Tableau IV). C'est ainsi que la cristallisation a lieu surtout dans le cas des isomères α , β , et γ introduits sous forme de solution alcoolique; l'isomère δ introduit également en solution alcoolique, reste au contraire totalement soluble aux concentrations qui nous intéressent. La solubilité des différents isomères de l'hexachlorocyclohexane dans l'acétone étant, d'une façon générale, beaucoup plus grande que dans l'alcool, leur cristallisation n'a lieu, lorsqu'ils sont introduits sous forme de solution acétonique, que pour des concentrations plus élevées. L'emploi de solutions acétoniques a donc l'avantage de permettre de mieux déterminer la concentration toxique limite des isomères en question.

TABLEAU IV
SOLUBILITÉS DES DIFFÉRENTS ISOMÈRES DE L'HEXACHLORO-
CYCLOHEXANE DANS QUELQUES SOLVANTS, EN GRAMMES POUR
100 GRAMMES DE SOLUTION A 20°

Solvants	α	β	γ	δ
Alcool éthylique ¹ .	1.8	1.1	6.4	24.2
Acétone ¹	13.9	10.3	43.5	71.1
Tween 20 ou 80 . . .	—	—	> 50	—
Eau ²	0.004	0.002	0.006	0.005

Les tableaux II et III montrent que dans les conditions expérimentales réalisées ici, les concentrations toxiques limites sont les suivantes: isomère α , 0.02 %; isomère γ 0.01 %; isomère δ 0.002 %. Dans les mêmes conditions, l'isomère β reste entièrement inactif à la concentration relativement élevée de 0.03 %.

Ainsi, contrairement à ce qui a été observé jusqu'ici chez les insectes, l'isomère δ se montre 5 fois plus toxique vis-à-vis de *Glaucoma piriformis* que l'isomère γ .

Aux concentrations toxiques limites, l'action des isomères actifs se manifeste par le fait que, après une phase de motilité normale durant quelques secondes après l'introduction des isomères, les ciliés sont animés d'un mouvement de rotation autour de leur centre; ils ont ensuite tendance à devenir sphériques; puis ils s'immobilisent et subissent éventuellement une lyse d'un caractère nettement différent de celle provoquée par l'acide linoléique⁵. Dans le cas présent, en effet, on ne constate jamais de soulèvement de la membrane avec formation de poches, dans lesquelles s'engouffrent peu à peu les micelles protoplasmiques animées de mouvement brownien; on constate seulement que la surface de la cellule s'estompe et que la totalité du protoplasma se désagrège sur place sans se disperser totalement.

On peut se demander si, dans le cas de *Glaucoma piriformis*, l'hexachlorocyclohexane agit directement par contact avec la surface du cilié ou indirectement après pénétration dans la cellule par le cytopharynx. La première supposition apparaît comme la plus vraisemblable, car les phénomènes de lyse provoqués par l'hexachlorocyclohexane ont, comme point de départ, la membrane cellulaire. Cette supposition est encore confirmée par l'action protectrice des tweens, qui est décrite plus bas.

Toxicité du gammexane en suspension obtenue par les ultrasons

Les résultats du tableau V montrent que le gammexane en suspension obtenue par les ultrasons possède vis-à-vis de *Glaucoma piriformis* une toxicité évidente à la concentration de 0.009 %, c'est-à-dire à une dose pratiquement égale à la concentration toxique limite (0.01 %, déterminée précédemment dans le cas du gammexane introduit en solution acétonique ou en solution alcoolique. Il existe cependant une différence essentielle entre l'action du gammexane introduit en solution alcoolique et celle du gammexane utilisé en suspension obtenue par les ultrasons; en effet, dans le premier cas, la préparation de gammexane donnant lieu, comme nous l'avons vu plus haut, à une cristallisation rapide après son introduction dans le liquide physiologique, n'est active que pendant les quelques minutes suivant cette introduction, alors que dans le deuxième, la suspension de gammexane reste indéfiniment active.

TABLEAU V
TOXICITÉ DU GAMMEXANE EN SUSPENSION
OBTENUE PAR LES ULTRASONS

Concentration en gammexane %	Action sur les cellules
0.018	Immobilisation immédiate
0.009	Immobilisation immédiate
0.006	Pas d'action immédiate

Influence du mésoinositol sur la toxicité du gammexane

Les expériences précédentes faites avec l'isomère γ de l'hexachlorocyclohexane, ont été répétées, les cellules de *Glaucoma piriformis* se trouvant en suspension dans l'eau de moelle" contenant du mésoinositol à différentes concentrations. Les résultats ont été qualitativement et quantitativement les mêmes; c'est-à-dire que le mésoinositol, même à une concentration double de celle du gammexane (gammexane 0.02 %, mésoinositol 0.04 % par exemple), n'exerce aucune influence nette sur la toxicité de ce dernier vis-à-vis de *Glaucoma piriformis*. Un tel résultat n'est pas en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'action du gammexane serait due à une concurrence entre celui-ci et le mésoinositol. A ce point de vue, il convient de remarquer que la toxicité de l'isomère δ , dont la structure semble, d'après SLADE², différente de celle du gammexane, ne peut être expliquée par une compétition avec le mésoinositol.

Influence des tweens sur la toxicité du gammexane

L'expérience montre que, en présence des tweens à la concentration finale de 3 %, les cellules restent complètement indifférentes à la présence du gammexane, même lorsque celui-ci atteint la concentration finale, relativement élevée, de 0.03 %. Si on précipite les cristaux de gammexane dissous dans un tween par addition de liquide physiologique („eau de moelle") ou d'eau distillée, ces cristaux décantés, lavés et redissous dans l'alcool, conservent leur propriété toxique et lysante normale vis-à-vis de *Glaucoma piriformis*. L'action protectrice du tween ne semble donc pas résulter d'une combinaison chimique entre tween et gammexane, mais plutôt d'un phénomène phy-

sique, le tween se fixant sur la membrane des cellules et formant une couche empêchant tout contact avec le gammexane.

RÉSUMÉ

Les isomères α , γ et δ de l'hexachlorocyclohexane exercent une action toxique plus ou moins marquée vis-à-vis de *Glaucoma piriiformis*. Alors que l'isomère δ provoque l'immobilisation de ce cilié pour une concentration de 0.002 %, le même effet n'est obtenu qu'avec une concentration de 0.01 % dans le cas de l'isomère γ et une concentration de 0.02 % dans le cas de l'isomère α . A la concentration relativement élevée de 0.03 %, l'isomère β n'exerce aucune action toxique. Ces résultats mettent une fois de plus en évidence le rôle de la structure stéréochimique de l'hexachlorocyclohexane dans son action toxique vis-à-vis des cellules vivantes. Ils montrent que contrairement à ce que l'on observe dans le cas des insectes, l'isomère δ est ici cinq fois plus actif environ que l'isomère γ . Ce dernier résultat et le fait que le mésoinositol n'empêche nullement l'action toxique du gammexane de se manifester, rendent peu probable la validité, dans le cas actuel, de l'hypothèse selon laquelle le gammexane agirait en antagoniste du mésoinositol.

D'autre part, la présence de tweens (tween 20 et tween 80) protège complètement les cellules de *Glaucoma piriiformis* contre l'action toxique du gammexane, même lorsque ce dernier est à la concentration relativement élevée de 0.03 %. Il s'agit ici, probablement, d'une protection physique.

SUMMARY

The α , γ and δ isomers of hexachlorocyclohexane have a more or less marked toxic action on *Glaucoma piriiformis*. While the δ isomer immobilises this ciliate at a concentration of 0.002 %, the γ isomer produces the same effect at a concentration of only 0.01 %, and the α isomer requires 0.02 %. At the relatively high concentration of 0.03 % the β isomer has no toxic effect at all. These results bring out once more the part played by the stereochemistry of hexachlorocyclohexane in its action on living cells. They show that, in contradistinction to what is observed with insects, the δ isomer is here five times more active than the γ isomer. This last result, together with the fact that meso-inositol has no inhibitory action at all on the toxicity of gammexane, casts doubt on the validity in the present case of the hypothesis that gammexane acts antagonistically to meso-inositol.

On the other hand, the presence of tweens (tween 20 and tween 80) protects the cells of *Glaucoma piriiformis* completely against the toxic action of gammexane, even when the latter is at the relatively high concentration of 0.03 %. Probably the protection here is of a physical nature.

ZUSAMMENFASSUNG

Die α , β , und δ -Isomere des Hexachlorcyclohexans üben eine mehr oder weniger starke, toxische Wirkung auf *Glaucoma piriiformis* aus. Während das δ -Isomer bei einer Konzentration von 0.002 % Unbeweglichkeit dieser Ziliat hervorruft, wird der gleiche Effekt bei dem γ -Isomer erst bei einer Konzentration von 0.01 %, und bei dem α -Isomer bei einer Konzentration von 0.02 % erhalten. Bei der relativ hohen Konzentration von 0.03 % hat das β -Isomer noch keinerlei toxische Wirkung. Diese Resultate stellen wieder einmal die Rolle der stereochemischen Struktur des Hexachlorcyclohexans bei seiner toxischen Wirkung auf lebende Zellen unter Beweis. Sie zeigen, dass im Gegensatz zu den bei Insekten gemachten Beobachtungen das δ -Isomer hier fünf mal so wirksam ist wie das γ -Isomer. Letzteres Resultat und die Tatsache, dass das Mesoinositol die toxische Wirkung des Gammexans überhaupt nicht hemmt, machen in diesem Falle die Gültigkeit der Hypothese, nach der das Gammexan als Antagonist des Mesoinositols wirke, wenig wahrscheinlich.

Andererseits schützt die Anwesenheit von „Tweens“ (Tween 20 und Tween 80) die Zellen von *Glaucoma piriiformis* vollkommen gegen die toxische Wirkung von Gammexan, sogar wenn letzteres in der relativ hohen Konzentration von 0.03 % vorhanden ist. Es handelt sich hier wahrscheinlich um einen physikalischen Schutz.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. E. SLADE, *Chem. and Ind.*, 64 (1945) 314.
- ² R. E. SLADE, *Endeavour* (éd. franç.), 4 (1945) 148.
- ³ S. KIRKWOOD ET P. H. PHILLIPS, *J. biol. Chem.*, 163 (1946) 251.
- ⁴ L. LLOYD, *Nature*, 159 (1947) 135.
- ⁵ P. CHAIX, J. CHAUVET ET CL. FROMAGEOT, *Antonie van Leeuwenhoek*, 12 (1947) 145.
- ⁶ P. CHAIX ET CH. A. BAUD, *Arch. sci. physiol.*, 1 (1947) 3.
- ⁷ J. SAUTET, A. AUDOIN, G. LEVAVASSEUR ET J. VUILLET, *C. R. Acad. Sci.*, 224 (1947) 66.
- ⁸ R. O. PRUDHOMME ET P. GRABAR, *Bull. soc. chim. biol.*, 29 (1947) 122.
- ⁹ *Spans and Tweens*, Atlas Powder Co, Wilmington, Delaware (1945).

Reçu le 27 Septembre 1947