

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

Année 1992

THÈSE N° 338

**ESSAI DE CULTURE *IN VITRO*
DES NEURONES CHEZ LE
MOLLUSQUE *Lymnaea stagnalis* L.**

THÈSE

pour le

**DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 23 septembre 1992

par

Valérie SZMIDT

née le 14 avril 1968 à Châteauroux (Indre)

Examineurs de la thèse

Monsieur le Professeur NICOLAS PRÉSIDENT
Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences JUGE
Monsieur HOURDIN, Docteur d'Université JUGE
Monsieur RONDELAUD, Maître de Conférences JUGE

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTÉ : Monsieur le Professeur **RABY**

ASSEESSEURS : Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1^{er} Assesneur)

Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences (2^e Assesneur)

PERSONNEL ENSEIGNANT :

Professeurs des Universités

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François-Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT des YLOUSES Daniel	Pharmacie Galénique
NICOLAS Jean-Albert	Bactériologie et Virologie Parasitologie
OUDARD Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SÉCRÉTAIRE GÉNÉRAL DE LA FACULTÉ

-CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS **POMMARET Maryse**

A notre Président de Jury,

M. le Professeur J.A. NICOLAS,
Service de Bactériologie-Virologie-Parasitologie,
Faculté de Pharmacie de Limoges,

*Vous nous faites l'honneur
de présider ce Jury de soutenance,*

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

A notre Directeur de Thèse,

M. le Dr. G. DREYFUSS,
Maître de conférences,
Faculté de Pharmacie de Limoges,

*Nous avons été sensible à vos conseils
et critiques au cours de la réalisation
pratique de ce travail.*

*Vous nous avez guidée avec tact et
gentillesse au cours de ces deux années
de recherche.*

*Nous vous assurons de notre gratitude
respectueuse.*

A nos Juges,

M. le Dr. D. RONDELAUD,
Maître de conférences,
Faculté de Médecine de Limoges,

M. le Dr. Ph. HOURDIN,
Faculté de Pharmacie de Limoges,

*Nous avons été sensible à votre grande
disponibilité au cours de ce travail.*

*Vous nous avez conseillée à maintes
reprises dans un emploi du temps
toujours chargé.*

*Nous vous sommes reconnaissante pour
la lecture du pré-document.*

Nous adressons nos remerciements les plus vifs à:

M. le Professeur B. PENICAUT,
Laboratoire de Chimie Analytique,
Faculté de Pharmacie de Limoges,

*Vous avez mis à notre disposition
le matériel pour la mesure des pH.*

M. le Dr. P. SINDOU,
Laboratoire d'Histologie,
Faculté de Médecine de Limoges,

pour vos conseils avisés.

M. le Dr. Ph. VIGNOLES,
Maître de Conférences,
Laboratoire de Biophysique-Informatique,
Faculté de Pharmacie de Limoges,

*Vous nous avez été d'un grand secours
à de nombreuses reprises.*

*Veillez trouver ici nos remerciements
les plus sincères.*

Nous adressons nos remerciements les plus sincères à :

- Mmes les Dr. R. et S. BEAULATON
de Saint Gaultier (Indre)
de l'Université de Montpellier I,

*Vous nous avez aidée au cours
de ces années d'étude.*

Soyez assurées de notre reconnaissance.

A mes grands-parents,

A mes parents,

A toute ma famille,

*Pour votre soutien, votre patience
et votre contribution à l'élaboration de ce travail,*

Avec toute mon affection.

A Crespin,

Avec toute ma tendresse.

A Nathalie,

A Stéphane,

Avec toute mon amitié.

PLAN

- INTRODUCTION GÉNÉRALE
- CHAPITRE PREMIER : Etat actuel de la question sur les molluscicides
- CHAPITRE DEUXIEME : Cultures cellulaires de mollusques pulmonés
- CHAPITRE TROISIEME : Le Système Nerveux de *Lymnaea stagnalis*
- CHAPITRE QUATRIEME : La Culture des Neurones chez *L. stagnalis*
- CONCLUSIONS GÉNÉRALES
- BIBLIOGRAPHIE
- TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE

Les méthodes prophylactiques utilisées contre les maladies parasitaires dues à des Trématodes comportent le contrôle des mollusques qui interviennent comme hôtes intermédiaires dans le cycle de développement de ces parasites. Ces maladies sont des anthro-zoonoses d'une importance considérable en pathologie humaine et animale (EUZEBY, 1971). Les méthodes utilisées pour éliminer les mollusques sont de divers types. Elles comportent des techniques agronomiques, chimiques et biologiques (EUZEBY, 1971) et sont parfois mixtes comme le concept de la lutte intégrée contre la fasciolose (MAGE *et al.*, 1989).

L'emploi des molluscicides est basé sur l'application de substances chimiques qui se révèlent toxiques pour les mollusques. Ces techniques sont déjà anciennes puisque certaines reposent sur l'emploi du sulfate de cuivre CuSO_4 . Développées au cours des décennies 1950-1970, ces méthodes ont subi une évolution qui tient compte a) de l'apparition de nouvelles molécules minérales ou organiques, et b) des problèmes soulevés par l'utilisation des premiers produits au cours des années 1970 (XIMENES, 1991).

Les critères pour sélectionner un molluscicide idéal ont été redéfinis par LEVEQUE (1990):

- "être totalement efficace contre la cible,
- ne pas être toxique pour l'homme et les Vertébrés supérieurs,
- être d'un prix attractif et d'un emploi aisé dans les conditions opérationnelles.

Par rapport à l'environnement aquatique, d'autres exigences peuvent être formulées:

- ne pas utiliser de pesticides donnant des produits de dégradation toxiques et rémanents, s'accumulant dans les chaînes trophiques,
- ne pas avoir d'impact sur les Poissons à différentes étapes de leur cycle biologique,
- ne pas provoquer à long terme, un déséquilibre des écosystèmes dans les conditions normales d'application."

De nombreux produits ont été proposés sur le marché comme en témoignent les revues de BORAY (1969), d'EUZEBY (1971), de GODAN (1979), de McCULLOUGH *et al.* (1981). Aucune d'entre elles ne répond de manière parfaite à la définition du molluscicide idéal rapportée par LEVEQUE. Ils présentent tous une certaine efficacité sur les mollusques qui s'étend souvent aux autres membres de la biocénose comme les Poissons. Leur coût est souvent élevé, ce qui ne privilégie pas leur emploi. Enfin, leur action n'est pas limitée dans le temps ce qui impose de nouvelles applications sur le terrain pour lutter contre l'expansion des limnées survivantes (EUZEBY, 1971) et entraîne parfois une résistance des mollusques au toxique (JELNES, 1977). Les avantages et les inconvénients de ces produits méritent d'en faire une revue générale en tenant compte des grandes familles chimiques utilisées.

Le problème majeur en relation avec ces substances concerne leur mode d'action. Ce dernier est bien connu dans le cas des organophosphorés par exemple (FEST et SCHMIDT, 1973; GOODMAN et GILMAN, 1985) mais pour beaucoup d'autres comme les dérivés du benzamido 2-nitro 5-thiazole (MADULO-LEBLOND *et al.*, 1981; VIGNOLES, 1990), on en est encore réduit à émettre des hypothèses sur leur site d'action. Il existe donc un manque relatif de données sur la plupart de ces molluscicides et des investigations sont nécessaires pour préciser le mode d'action de ces molécules.

Les recherches réalisées sur ce dernier point sont, pour la plupart, réalisées avec des animaux ou des extraits d'animaux. Une étape intéressante est en cours de développement à l'heure actuelle avec la mise au point de cultures cellulaires qui permettent d'éviter le sacrifice de nombreux Vertébrés ou encore des Invertébrés. Des cultures de neurones ont ainsi été réalisées sur les espèces de mollusques suivantes: *Aplysia californica*, *Helisoma trivolvis* et *Lymnaea stagnalis* (TOWNSEL et THOMAS, 1987). Le développement de cette nouvelle technique pour les neurones de mollusque nous a semblé utile en raison de l'impact nerveux de certains molluscicides.

Les études, que nous avons réalisées, s'inscrivent dans le cadre d'une étude générale sur les molluscicides que le Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Limoges conduit depuis plusieurs années. Les premières recherches se sont déjà concrétisées par la soutenance de plusieurs thèses sur ce sujet (DUFOUR, 1989; GRENAILLE, 1991; LACOUTURE, 1991; VIGNOLES, 1990).

Le but de notre travail répond aux différents points que nous avons soulevés dans les paragraphes ci-dessus. Il est double:

- dresser un bilan actuel sur les molécules utilisées comme molluscicides, leur efficacité, leurs effets à long terme et les inconvénients que les auteurs ont constatés lors de leur emploi sur le terrain.

- mettre au point une nouvelle technique de culture pour les neurones du mollusque *L. stagnalis*.

Les données, que nous rapportons dans ce mémoire de thèse, répondent à ces deux buts. Pour les présenter, nous avons adopté le plan suivant:

- Le premier chapitre est consacré à une revue générale sur les molluscicides. Cette dernière porte sur les molécules chimiquement définies comme sur les principes actifs issus des espèces végétales.

- Le deuxième chapitre porte sur les cultures cellulaires qui ont été réalisées sur les Mollusques. Dans cette revue, nous nous proposons de faire un bilan des méthodes et des résultats obtenus par les auteurs au cours des deux dernières décennies.

- Le troisième chapitre présente le "cerveau" de *L. stagnalis*. Nos rappels portent sur la structure des ganglions nerveux, les types de cellules neurosécrétrices présents, les modalités de leur sécrétion, et le site d'action des hormones contenues dans ce neurosécrétat.

- Le dernier chapitre rapporte les résultats que nous avons obtenus avec la mise au point de notre méthode de culture. Ces données sont discutées par rapport à celles parues dans la littérature.

ETAT ACTUEL DE LA QUESTION SUR LES MOLLUSCICIDES

Les molluscicides sont des agents chimiques qui exercent une action létale sur les Mollusques. A l'heure actuelle, ils constituent un maillon nécessaire dans la lutte contre les helminthoses transmises par ces Invertébrés. C'est pourquoi il est nécessaire d'en faire une étude approfondie.

Nous avons limité notre revue aux molécules chimiquement définies et aux principes actifs qui proviennent des plantes. Il existe cependant des méthodes de lutte biologique (WEISER, 1991) basées sur l'emploi de prédateurs ou de compétiteurs (comme les mollusques *Helisoma duryi* et *Marisa cornuarietis* dans le contrôle des vecteurs de *Schistosoma* sp.) ou encore de bactéries (*Bacillus thuringiensis*) qui permettent de "réduire les populations de mollusques vecteurs au-dessous du seuil de transmission de la parasitose" (TAURISSON, 1991). Ces techniques ne sont pas prises en compte dans ce travail.

Le premier paragraphe est consacré à l'intérêt de leur emploi et à la présentation des deux catégories définies ci-dessus. Les différents types de molécules chimiquement définies, leur efficacité, leur mode d'action et leurs conséquences à long terme font l'objet du deuxième paragraphe. Le troisième se rapporte aux principes qui proviennent des espèces végétales. Des commentaires généraux sont présentés dans un dernier temps.

La plupart des éléments contenus dans ce chapitre proviennent de l'analyse des publications, thèses et revues suivantes: BORAY, 1969; EUZEBY, 1971; PECHEUR, 1974; GAYRAL et CAVIER, 1977; KLOOS et McCULLOUGH, 1981; MOUKRIM, 1987; JURBERG *et al.*, 1988; VIGNOLES, 1990; GRENAILLE, 1991; XIMENES, 1991.

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

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

I. - RAPPELS PRELIMINAIRES.

Un bon agent molluscicide est, avant tout, un produit qui présente les caractéristiques répertoriées dans le tableau I.

Parmi les 12 critères que rapporte EUZEBY dans sa revue en 1971, il faut retenir les faits suivants. Le produit doit être suffisamment actif à haute dilution. Il doit être, non seulement molluscicide, mais également ovicide. Il doit être stable sous tous les climats ainsi qu'à la lumière. Il doit présenter une activité sélective maximale. Enfin, il doit être le moins toxique possible pour l'Homme et les Vertébrés en général.

Ces critères sont des notions classiques que plusieurs auteurs rapportent à intervalles réguliers comme GAYRAL et CAVIER (1977) ou encore LEVEQUE (1990).

Ces critères sont ceux d'un molluscicide idéal et les différentes équipes de recherche qui travaillent dans ce secteur ont toutes pour but de trouver un produit qui réponde à ces exigences. Parmi toutes les molécules proposées sur le marché ou rapportées dans la littérature, aucune d'entre elles ne possède toutes ces caractéristiques. Il est donc logique de dire qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de produit avec une activité molluscicide satisfaisante. Les différents produits ont tous des caractères qui correspondent à certains des critères rappelés dans le tableau I mais ils possèdent également des inconvénients comme nous le verrons dans les paragraphes 2 et 3.

Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction générale, les molluscicides chimiques se divisent en deux grandes catégories:

- les molécules chimiquement définies. Comme leur nom l'indique, la structure de ces produits est parfaitement connue. Elles appartiennent à cinq classes principales.

- les substances qui proviennent d'un certain nombre d'espèces végétales. Les principes actifs issus de certaines parties de ces plantes ont une activité molluscicide variable mais leur caractérisation chimique n'est pas encore réalisée.

L'efficacité de ces divers produits est généralement assez bien précisée sur le terrain comme dans les conditions du laboratoire. Mais le mode d'action d'un certain nombre d'entre eux fait encore l'objet d'hypothèses. Quant aux conséquences de ces produits sur la faune et la flore associées, elles sont souvent sous-estimées et parfois inconnues.

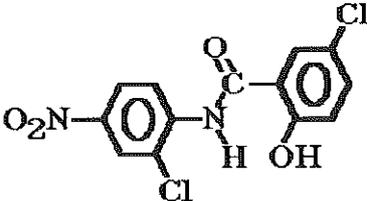
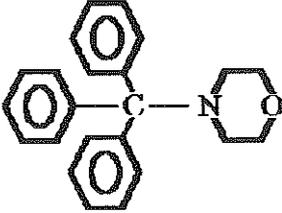
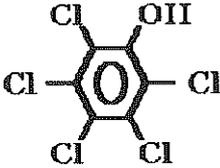
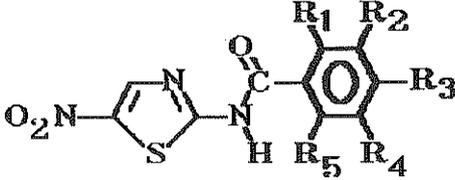
Noms des produits	Formules
Niclosamide	
N-trityl-morpholine (Trifenmorph)	
Phénols halogénés	
Sels métalliques	Cu^{2+} , Zn^{2+} $(\text{SO}_4^{2-}$, $\text{Cl}^-)$
Dérivés du BNT	

Tableau II.
 Les principaux molluscicides (d'après VIGNOLES, 1990).

II. - LES MOLECULES CHIMIQUEMENT DEFINIES.

A. LES PRINCIPALES FAMILLES.

Actuellement, un seul molluscicide est commercialisé, le Niclosamide (Bayluscide[®]). En fait, de nombreuses autres molécules présentent une activité contre les Pulmonés. Nous avons regroupé ces substances en cinq groupes principaux (tableau II):

- Les dérivés du salicylanilide. L'activité molluscicide est au départ de 10 parties par million (ppm ou mg.l^{-1}). Par la suite, cette dose est passée à 0,3 ppm dans le cas du Niclosamide (ou dichloro 2',5'-nitro 4'-salicylanilide). On utilise ce dernier produit sous forme de sel d'éthanolamine car il est insoluble dans l'eau. Il y a plusieurs marques:

* Clonitralide[®] (Niclosamide à 25 % de principe actif).

* Mollutox[®] (Niclosamide à 60 % de principe actif).

* Bayluscide[®] (à 70 % de principe actif).

- Les dérivés du triphénylméthane. Le plus important est la N-triphénylméthylmorpholine, encore appelé Trifenmorph (ou Frescon[®]). C'était le produit le plus actif que l'on disposait il y a une décennie. On l'utilisait sous différentes formes (granulés effervescents à 4 %, poudre mouillable, concentré émulsifiable à 16,5 %, appâts empoisonnés).

- Le pentachlorophénate de sodium (NaPCP) a été utilisé sur le terrain il y a deux décennies. Ce produit, très soluble dans l'eau, se disperse facilement dans le courant.

- Les sels métalliques. Ce sont des sels de cuivre, soit solubles (CuCl_2), soit insolubles comme CuCO_3 ou CuSO_4 . Les sels de zinc ont été également sollicités. Ce groupe est moins utilisé actuellement.

- Enfin, une cinquième classe est apparue vers la fin des années 1970. Il s'agit des dérivés du benzamido 2-nitro 5-thiazole (BNT): Ils possèdent une action comparable à celle du Niclosamide. Mais ils n'ont fait l'objet que d'une seule étude sur le terrain (YOUSIF, 1990). Ces molécules sont toujours en cours d'étude.

Il faut noter qu'en dehors de ces molluscicides principaux, d'autres composés sont capables d'avoir une action létale sur ces Invertébrés que sont les Mollusques. Une catégorie

Produits	Espèces	Résultats	Références
Mollutox® (Niclosamide à 60 % de principe actif)	<i>Biomphalaria alexandrina</i> <i>Bulinus truncatus</i>	0,5 mg.l ⁻¹ après une heure de contact, la mortalité des Mollusques est de : 19,1 % avec le Mollutox®, 27,1 % avec le Niclosamide.	ABDEL-RAHEEM <i>et al.</i> , 1979, 1980 EL-GINDY, 1975 (a et b)
Niclosamide, Trifenmorph, Sulfate de cuivre	<i>B. alexandrina</i> <i>B. truncatus</i>	CL ₅₀ en mg.l ⁻¹ Niclosamide : 0,062 (1) > 0,1 (2) Trifenmorph : 0,026 (1) > 0,05 (2) CuSO ₄ : 0,45 (1) < 0,2 (2)	EL-FIKI et MOHAMED, 1978 MOHAMED <i>et al.</i> , 1974, 1981 SHARAF <i>et al.</i> , 1974, 1975 (a et b)
Trifenmorph, Dérivés du Nicotinilide	<i>Biomphalaria glabrata</i> <i>B. truncatus</i>	CL ₅₀ en mg.l ⁻¹ Trifenmorph : 0,036 Dérivés du Nicotinilide : 0,16	DAFFALLA et DUNCAN, 1979 DUNCAN et BROWN, 1983 DUNLOP <i>et al.</i> , 1980
Trifenmorph	<i>Bulinus tropicus</i>	Hydrolyse du produit en milieu aqueux en morpholine et triphényl carbinol avec une demi-vie égale à 32 h à pH 7,5.	CHAUDHRY et MORGAN, 1986
	<i>B. truncatus</i>	Action sur les fibres musculaires cardiaques : diminution du rythme cardiaque et action sur le mécanisme de cyclisation de l'ATP.	BANNA, 1980 (a et b) BANNA et PLUMMER, 1978
	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Le produit provoque des contractions irréversibles au niveau des muscles de l'animal.	BREZDEN et GARNER, 1983
Sulfate de cuivre	<i>Lymnaea luteola</i>	* Diminution de l'activité de la cytochrome oxydase. * Augmentation de l'activité de la peroxydase.	BABU et RAO, 1982, 1985, 1987

(1) : produit seul ; (2) : produit plus herbicides (gramoxone, preforan, treflan). CL₅₀ : concentration de produit pour laquelle on observe 50 % de mortalité. TL₅₀ : temps au bout duquel on observe 50 % de mortalité.

Tableau III.
Principaux travaux effectués en laboratoire sur l'efficacité
et le mode d'action des molluscicides (d'après VIGNOLES, 1990).

particulière de pesticides, constituée par les esters organophosphorés qui sont généralement utilisés comme insecticides, présente aussi une action sur les mollusques. Ces produits ont un mécanisme d'action qui n'est plus à démontrer. Nous savons, en effet, qu'ils agissent par inhibition de l'acétylcholinestérase (MOUKRIM, 1987).

D'autres molécules ont été encore utilisées sur le terrain comme celles que DESCHIENS (*in* CAVIER et GAYRAL, 1977) propose vers les années 1950. Quel que soit leur degré de toxicité envers les mollusques, ces sels sont toujours des dérivés de métaux lourds qui fournissent de l'oxyde cuivreux lors de leur dégradation dans l'eau de ruissellement. Ce dernier produit est probablement plus actif que les autres sels proposés par DESCHIENS mais il est plus toxique pour les Poissons.

La lutte contre les mollusques nécessite l'emploi d'autres molécules plus sélectives. Les chimistes sont, à l'heure actuelle, capables de synthétiser de nouvelles substances et seul un "screening" élargi de ces produits de synthèse permettra de déterminer s'ils possèdent une activité molluscicide exploitable sur le plan commercial et, par suite, s'ils sont capables de lutter contre les hôtes intermédiaires de trématodoses.

B. EFFICACITE DES MOLLUSCICIDES CHIMIQUES AU LABORATOIRE.

1. Frescon[®] et niclosamide (Tableau III).

Le produit le plus efficace était le Frescon. Il possède une activité molluscicide très élevée, particulièrement à l'encontre de *Biomphalaria*, *Bulinus* et *Lymnaea*. Son action est plus marquée sur les jeunes individus que sur les mollusques adultes. Il n'est pas ovicide mais peut détruire les embryons lorsqu'ils se développent dans les pontes. Il en résulte la nécessité d'assurer sa présence dans les eaux à traiter pendant un temps suffisamment long pour attendre l'éclosion des oeufs. Il ne pénètre pas dans les boues et les vases. C'est, de plus, un produit stable à la chaleur et à la lumière solaire. Dans les milieux favorables, il a un effet rémanent pendant 3 semaines à 3 mois. PECHEUR (1974) conseille d'assécher au préalable le terrain par drainage pour obtenir une efficacité rapide et durable de ce produit.

Le Niclosamide, pour sa part, est efficace à la dose de principe actif de l'ordre de 4 à 12 mg.l⁻¹ par hectare. Les expériences de laboratoire ont montré que les individus jeunes de *Biomphalaria glabrata* sont beaucoup plus sensibles que les plus âgés. Il est ovicide dans tous les cas et sa rémanence dans le milieu est légère. Ce produit est largement utilisé au

Maroc, en particulier contre les hôtes intermédiaires de la bilharziose à *Schistosoma haematobium* (Ministère de la Santé du Maroc, 1982).

2. Autres produits (Tableau III).

Le sulfate de cuivre, comme le pentachlorophénate de sodium, n'ont pas d'effet rémanent. Le premier s'est révélé très actif sur les mollusques à une concentration de 1 ppm au laboratoire. Dans la nature, son activité est moindre car il a tendance à précipiter dans les eaux boueuses, ce qui se traduit par une activité molluscicide résiduelle de faible grandeur. Il a, de plus, la particularité d'intoxiquer les hôtes définitifs (bétail par exemple) lorsqu'il est répandu sur le terrain (EUZEBY, 1971). Le second est très toxique sur les mollusques adultes. Il tue par contact et rapidement. De plus, il est ovicide au moins pour certaines espèces (*B. glabrata*). Il faut préciser que ce produit présente un effet irritant sur les mollusques, ce qui entraîne leur fuite de l'eau traitée. Partiellement dégradé par la lumière, il a un effet plus faible dans les eaux claires.

Ces propriétés du sulfate de cuivre sont inhérentes au sel concerné. En effet, d'autres sels ont des propriétés différentes. Le chlorure cuivrique, par exemple, est totalement soluble dans l'eau de ruissellement, y compris pour des pH faibles. RONDELAUD (1986, 1988) l'utilise à des doses sublétales à 1 mg.l^{-1} dans les expériences qu'il a développées contre la Limnée tronquée sur le terrain. Il n'y a pas de phénomène de rémanence.

Quant aux dérivés halogénés du BNT, ce sont des produits qui possèdent une action molluscicide comparable à celle du Niclosamide mais leur mode d'action n'est pas élucidé. L'action de ces substances dépend de la nature du substituant comme VIGNOLES (1990) le rapporte dans sa thèse.

La détermination de cette toxicité se fait par le calcul des CL_{50} (concentration de produit qui provoque la mort de 50 % des animaux). Ceci se réalise par l'exposition d'un certain nombre de mollusques à une dose de toxique pendant 96 heures en milieu stagnant, non renouvelé ou encore à la même concentration du produit pendant 1 heure. Ces tests sont définis par l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (1981).

C. RÉSULTATS SUR LE TERRAIN.

Des expérimentations sur le terrain ont été menées sur les deux dernières décennies. Ces essais sont tout à fait indispensables avant l'utilisation de ces produits à grande échelle.

Produits	Espèces	Résultats	Références
Clonitralide® (Niclosamide à 25 % de principe actif) Sulfate de cuivre	<i>Biomphalaria glabrata</i>	* $CL_{90} = 0,097 \text{ mg.l}^{-1}$ pour 24 h de contact (Clonitralide) * Diminution du taux d'infection de 45 % à 6 % en dix ans. * 100 % de mortalité au bout de 8 jours avec 8 mg.l^{-1} de CuSO_4 en granules.	BARNISH, 1982 BARNISH <i>et al.</i> , 1980, 1982 BARNISH et PRENTICE, 1981 BARNISH et STURROCK, 1973 CHRISTIE <i>et al.</i> , 1978 JORDAN <i>et al.</i> , 1978 PRENTICE et BARNISH, 1980, 1981 a PRENTICE <i>et al.</i> , 1981 b STURROCK, 1973, 1974 STURROCK <i>et al.</i> , 1974 UPATHAM et STURROCK, 1977
Trifenmorph Sulfate de cuivre	<i>Biomphalaria pfeifferi</i> <i>Bulinus truncatus</i>	Trifenmorph à $0,12 \text{ mg.l}^{-1} \text{ jour}^{-1}$; → 100 % de mortalité pour <i>B. truncatus</i> .	AMIN, 1972 AMIN <i>et al.</i> , 1976 AMIN et FENWICK, 1977
Trifenmorph Hexabutyl distanno- xanne	<i>B. glabrata</i> <i>Biomphalaria tenagophila</i>	2 kg/ha de Trifenmorph : → 100 % de mortalité pour les Mollusques ($\text{pH} \geq 7$). → 50 % pour ceux situés en milieu acide ($\text{pH} 5,6$).	GILBERT <i>et al.</i> , 1973 (a et b)
Trifenmorph	<i>Bulinus rohlfsi</i> <i>Bulinus camerunensis</i>	Utilisé à 2 mg.l^{-1} toutes les six semaines, la transmission de la parasitose chute à 2,4 % par rapport à sa valeur initiale.	DUKE et MOORE, 1976
Chlorure cuivrique	<i>Lymnaea truncatula</i>	1 mg.l^{-1} de CuCl_2 utilisé en $2 \times 4 \text{ l}$ permet d'éliminer les Mollusques en une année.	RONDELAUD, 1986, 1988 (a et b)

Tableau IV.
Principaux travaux réalisés sur le terrain
pour l'étude de l'efficacité des molluscicides
(d'après VIGNOLES, 1990).

En général, on évalue l'activité de la molécule retenue sur des petits biotopes de quelques mètres carrés de surface (EUZEBY, 1971) reproduisant le plus fidèlement possible les écosystèmes à traiter. On peut donc ainsi, non seulement déterminer l'activité molluscicide du produit, mais également confirmer son impact sur l'environnement, préciser sa rémanence ou encore estimer sa facilité d'emploi. En fait, le nombre d'équipes qui sont intervenues sur le terrain est limité. Les principales sont répertoriées dans le tableau IV.

Ces études portent essentiellement sur les mollusques des genres *Biomphalaria*, *Bulinus* et *Lymnaea*. Les produits utilisés, quant à eux, sont le Niclosamide, le Trifenmorph et les sels de cuivre. Il faut noter que la majorité de ces études portent sur le contrôle des mollusques vecteurs de la bilharziose dans les pays tropicaux. En France, une seule équipe s'est intéressée à la lutte contre l'hôte intermédiaire de *Fasciola hepatica*. De plus, comme nous l'avons déjà mentionné ci-dessus, le BNT et ses dérivés n'ont fait l'objet que d'une seule étude sur le terrain, dans les canaux d'irrigation en Egypte (YOUSIF, 1990).

D. MODE D'ACTION.

Cette revue porte sur les cinq grandes familles de molluscicides que nous avons répertoriées sur le tableau II. Elle s'inspire des notes de VIGNOLES (1990).

L'action du Niclosamide dépend a) de sa fonction phénol qui lui confère les propriétés d'un acide faible, et b) de sa lipophilie qui lui permet de traverser les membranes mitochondriales. Le Niclosamide permet un transfert de protons à travers la membrane interne de la mitochondrie, ce qui empêche le passage de l'ATPase et inhibe, de ce fait, la synthèse d'ATP (CORBETT, 1974).

La N-trityl-morpholine agit sur les membranes des cellules musculaires en stimulant l'entrée du calcium (BREZDEN *et al.*, 1983), ce qui provoque une contracture irréversible en entraînant une tétanie permanente.

Les phénols halogénés inhibent, également, la synthèse de l'ATP (CORBETT, 1974) selon un mécanisme qui est identique à celui du Niclosamide en raison de l'existence de la fonction phénol. Les substituants halogénés permettent d'augmenter l'acidité de cette fonction tandis que le cycle benzénique assure la lipophilie nécessaire à la molécule pour sa diffusion membranaire.

Références	Durée et lieu de l'étude	Produits	Conclusions
BARNISH <i>et al.</i> , 1981, 1982	10 ans (1971 - 1981) Sainte-Lucie	Clonitralide [®] (Niclosamide à 25 % de principe actif)	* Absence de résistance au produit après un traitement de 9 ans. * Disparition totale de <i>Biomphalaria glabrata</i> dans les habitats traités. * La transmission de <i>Schistosoma mansoni</i> a diminué de 92 % dans les zones à forte transmission et de 77 % dans les zones à faible transmission.
GILLES <i>et al.</i> , 1973 ZAKI, 1971	7 ans (1963 - 1970) Egypte (delta du Nil)	Niclosamide	* Echec dans le contrôle des mollusques hôtes de <i>Schistosoma haematobium</i> en raison a) de la densité importante des mollusques d'une part, de la population humaine d'autre part, et b) du contact homme-eau trop fréquent.
BARBOSA et COSTA, 1981	12 ans (1966 - 1978) Brésil	Niclosamide	* Diminution de 58,2 % du taux d'infestation par <i>S. mansoni</i> dans la zone traitée (de 1966 à 1974) au lieu de 42 % dans la zone témoin.
SULLIVAN <i>et al.</i> , 1984	5 générations de Mollusques Laboratoire, USA	Niclosamide Sulfate de cuivre	* Pas de tolérance observée pour les produits étudiés sur cinq générations de <i>B. glabrata</i> lors d'une étude dans les conditions du laboratoire.
JELNES, 1977	10 ans (1967 - 1977) Laboratoire, Iran	Niclosamide	* Apparition d'une résistance notable de <i>Bulinus truncatus</i> au cours de l'expérience.
RONDELAUD, 1990	5 ans France	Chlorure cuivrique	* Disparition totale de <i>Lymnaea truncatula</i> dans les habitats traités. * Développement temporaire des colonies pour 4 autres espèces de Mollusques aquatiques, mais la recolonisation des habitats à <i>L. truncatula</i> par ces espèces est incomplète.

Tableau V.
Bilan à terme sur l'emploi des molluscicides chimiquement définis
(d'après VIGNOLES, 1990).

FAMILLES Espèce	Concentration (temps d'exposition)	Mortalité	Mollusques	Références
AGAVACEAE <i>Agave americana</i> <i>Agave decipiens</i> E. de feuilles	? (24 h) ? (24 h)	M M	<i>Lymnaea</i> sp.	SCHOEB <i>et al.</i> , 1984
ALPINACEAE <i>Hedychium coronarium</i> E. de graines	25 mg.l ⁻¹ (24 h)	Pas de données	<i>L. cubensis</i> , <i>L. columella</i> .	MEDINA et WOODBURY, 1979 WARREN et PETERS, 1969
EUPHORBIACEAE <i>Croton macrostachys</i> E. de graines <i>Jatropha curcas</i> E. de toute la plante	1 mg.l ⁻¹ (24 h) 1 g.l ⁻¹ (24 h)	90 % nulle	<i>Lymnaea</i> sp. <i>L. cubensis</i> .	DAFFALLA et AMIN, 1976 MEDINA et WOODBURY, 1979
PHYTOLACCACEAE <i>Phytolacca dodecandra</i> E. de fruits secs * ou de baies ** <i>P. isocandra</i> <i>P. rivinoides</i> E. de fruits	18-29 mg.l ⁻¹ (24 h) 0,8-1 cg.l ⁻¹ (8 h) 2 dg.l ⁻¹ (24 h) 2 dg.l ⁻¹ (24 h)	90 % 100 % M M	<i>L. natalensis</i> . <i>Lymnaea</i> sp. <i>L. columella</i> , <i>L. cubensis</i> .	LEMMA <i>et al.</i> , 1972, 1978 MEDINA et WOODBURY, 1979
POLYGONACEAE <i>Polygonum senegalense</i> E. de feuilles	5 g.l ⁻¹ (24 h)	M	<i>L. natalensis</i> .	DOSSAJI <i>et al.</i> , 1977
SAPINDACEAE <i>Paulliana pinnata</i> E. de toute la plante <i>Sapindus saponaria</i> E. de baies	1 g.l ⁻¹ (24 h) 25 mg.l ⁻¹ (6 h)	100 % 94 %	<i>L. columella</i> , <i>L. cubensis</i> . <i>L. cubensis</i> .	MEDINA et WOODBURY, 1979 TORREALBA <i>et al.</i> , 1953
SOLANACEAE <i>Solanum nodiflorum</i> E. de toute la plante	1 dg.l ⁻¹ (24 h)	M	<i>L. cubensis</i> , <i>L. columella</i> .	MEDINA et RITCHIE, 1980
ZYGOPHYLLACEAE <i>Balanites maughanii</i> E. de fruits	1 fruit/1 m ³ d'eau (24 h)	M	<i>L. natalensis</i>	WAGNER, 1933

Tableau VI.

L'activité molluscicide de plusieurs espèces végétales sur les limnées (d'après KLOOS et McCULLOUGH, 1981, complété avec les travaux parus sur la dernière décennie). Abréviations. E: extrait. M: activité molluscicide.

Les sels métalliques comme ceux dérivant du cuivre inhibent les enzymes du cycle de Krebs (BABU et RAO, 1985).

Le mode d'action du BNT et de ses dérivés est encore inconnu. La structure de ces produits est, cependant, à l'origine de deux hypothèses. La première suggère que les substances auraient une action découplante sur les enzymes des chaînes respiratoires. Elle s'appuie a) sur le fait que ces molécules sont des bases faibles, capables de fixer un proton sur l'azote endocyclique du groupement thiazole, b) sur la valeur de leur pKa, proche des pH existant au niveau de la mitochondrie, et c) sur leur lipophilie permettant la diffusion de ces molécules à travers les membranes mitochondriales. La deuxième hypothèse se rapporte à la conformation relativement plane de la forme protonée, ce qui permettrait une interaction de ces molécules avec les bases de l'acide désoxyribonucléique des cellules.

E. CONSEQUENCES DE L'UTILISATION A LONG TERME.

Le tableau V groupe les résultats des principales études menées sur le terrain ou dans les conditions du laboratoire avec les molécules chimiquement définies.

Deux observations se dégagent à la lecture de ce tableau:

- La première porte sur les résultats d'un contrôle des mollusques qui interviennent dans le cycle de la bilharziose. BARNISH et PRENTICE (1981) rapportent une chute de 92 % dans la contamination de l'homme par le parasite au bout de 10 années d'expérimentation dans les zones à haut risque tandis que GILLES *et al.* (1973) annoncent un échec.

- La seconde se rapporte à la résistance des mollusques vis-à-vis du produit utilisé. BARNISH et PRENTICE mentionnent l'absence de résistance au Niclosamide chez *B. glabrata* tandis que JELNES (1977) signale que les bulins ont développé une résistance au Niclosamide.

III. - MOLLUSCICIDES D'ORIGINE VÉGÉTALE.

A. REVUE DES PLANTES ÉTUDIÉES.

De nombreux essais expérimentaux ont été réalisés à l'encontre des mollusques qui interviennent comme hôtes intermédiaires dans le cycle de développement de *Schistosoma* sp. Les études sur les limnées sont nettement moins nombreuses. La revue de KLOOS et McCULLOUGH dresse le bilan de ces essais jusqu'à l'année 1981.

Comme les rapports des auteurs sur ce point sont assez nombreux, nous avons limité nos investigations aux principes actifs sur les limnées. Le tableau VI provient de la revue de XIMENES (1991) sur les plantes utilisées dans la littérature contre les limnées. Les concentrations de l'extrait, les temps d'exposition et les mollusques soumis aux expériences y sont, de plus, cités.

Sept espèces de plantes ont une activité molluscicide: *Agave americana*, *A. decipiens*, *Balanites maughanii*, *Phytolacca isocandra*, *P. rivinoides*, *Polygonum senegalense* et *Solanum nodiflorum*. Les autres espèces ont une activité plus variable ou nulle.

A l'exception de *Phytolacca isocandra* où cette activité n'a pas été recherchée, les autres plantes sont, de plus, cercaricides.

Il est intéressant de noter les valeurs élevées de certaines concentrations en extrait pour obtenir une activité molluscicide: 5 g.l⁻¹ pour *Polygonum senegalense*, 1 g.l⁻¹ pour *Paullina pinnata* par exemple.

B. CONDITIONS POUR L'APPLICATION SUR LE TERRAIN.

Une revue récente des molluscicides d'origine végétale a été effectuée par TAURISSON en 1991 dans le contexte de la bilharziose. L'auteur présente les conditions qui sont nécessaires pour qu'une plante soit utilisée comme molluscicide:

- Les plantes molluscicides doivent pousser en abondance dans la région d'endémie.
- On préférera les plantes vivaces aux plantes annuelles.
- Ces plantes doivent être résistantes à la sécheresse dans les zones arides. Elles doivent être également résistantes dans les endroits semi-aquatiques ou aquatiques.
- Les plus hauts pourcentages des principes actifs doivent, de préférence, se situer dans les baies, les fruits, les fleurs ou bien dans les tubercules se reproduisant de manière végétative.
- Le matériel provenant de plantes produites de manière saisonnière ne doit pas perdre de son pouvoir molluscicide pendant un stockage d'au moins une année.
- Le(s) principe(s) actif(s) doit(vent) être extractible(s) au moyen d'un appareillage simple ou à l'aide de solvants communément disponibles, de préférence l'eau.

- Les procédures d'application doivent être simples et sans danger pour l'opérateur. De plus, les formulations et l'accumulation doivent être conformes à la législation.

- L'activité molluscicide doit être élevée. Le produit brut à partir duquel le composé est obtenu doit posséder une activité avec une concentration inférieure à 100 ppm.

- Le pouvoir molluscicide doit se conserver dans des conditions physico-chimiques diverses (pH, lumière du soleil, température, pollution de l'eau, ...).

- La toxicité doit être élevée pour les mollusques mais faible ou nulle pour les organismes non visés aux concentrations molluscicides.

IV. - COMMENTAIRES.

Les données rapportées dans les paragraphes précédents peuvent se résumer de la manière suivante:

- Le contrôle des mollusques vecteurs d'helminthoses peut être réalisé à l'aide de molluscicides. Deux types de produits ont été utilisés, des molécules chimiquement définies et des principes actifs provenant de plantes.

- Parmi les substances proposées, aucune n'est parfaite et l'emploi de l'une d'entre elles se traduit par des effets quantifiés sur l'efficacité, la rémanence ou les conséquences à terme.

- L'utilisation des principes actifs provenant de plantes est, à l'heure actuelle, en plein essor aux dépens des molécules chimiquement définies qui semblent délaissées dans la plupart des pays. Le problème inhérent à cette utilisation concerne la nature même du principe actif qui est ignorée dans la plupart des cas.

- Si les effets à terme sont connus pour la plupart des molécules chimiquement définies, il n'en est pas de même pour les principes actifs d'origine végétale. La littérature reste muette sur ce point. Il en est de même pour le mécanisme d'action de ces produits.

- La plupart des espèces végétales proposées dans ce chapitre sont exotiques. L'utilisation d'espèces françaises indigènes n'a pas été rapportée jusqu'ici dans la littérature.

La revue de la littérature sur les molluscicides montre l'existence d'un certain nombre de "manques". Nous détaillons ici les principaux d'entre eux:

- Tous les molluscicides n'ont pas une action sélective sur une espèce de mollusque. Quelle que soit leur nature, ces produits agissent sur tous les organismes présents dans le milieu aquatique. Un certain nombre d'entre eux ont, de plus, une action sur la faune et la flore associée. C'est le cas du benzamido-2 nitro-5 thiazole et de ses dérivés qui sont toxiques à haute dose sur les plantes mais qui favorisent leur croissance à faible dose (VIGNOLES, 1990).

- Les effets à long terme des molluscicides sont contradictoires. C'est le cas, par exemple, de la résistance au Niclosamide (tableau V). Il est nécessaire de confirmer ces premières données en procédant à des expérimentations complémentaires sur d'autres espèces de Pulmonés soumises aux mêmes conditions.

- La plupart des principes actifs d'origine végétale ne sont pas connus. Or, il est bien connu que la toxicité d'une plante peut dépendre de plusieurs substances. Il est donc nécessaire d'isoler et de caractériser chimiquement ces agents pour déterminer leur toxicité vis-à-vis des mollusques.

- Le mécanisme d'action de la plupart des produits doit encore être élucidé, en particulier pour les produits d'origine végétale.

Notre travail de thèse se propose de répondre en partie à ces différents points. Comme l'expérimentation *in vivo* se révèle difficile en raison des problèmes de dégradation que subissent la plupart des molécules, nous nous sommes proposés de réaliser une expérimentation en procédant à l'étude des effets de ces substances sur des cultures cellulaires *in vitro*.

Nous avons donc décidé d'évaluer l'activité d'un certain nombre de molluscicides sur des cultures de neurones. Pour cela, il est nécessaire de présenter:

- les différents types de milieux que les auteurs ont utilisés pour le maintien *in vitro* de cultures cellulaires ou organotypiques chez les diverses classes qui composent l'embranchement des Mollusques. Cette revue est rapportée dans le chapitre deuxième.

- le matériel animal concerné par nos expériences, en l'occurrence *L. stagnalis*. Comme de nombreuses études ont été réalisées chez cette espèce, nous nous sommes proposée de faire la synthèse des connaissances parues à ce jour sur les différents points de la morphologie et de la biologie des neurones. Cette seconde revue est colligée dans le chapitre troisième.

Un premier "galop" d'essai a été réalisé sur les neurones de cette espèce en utilisant le milieu de LEIBOWITZ (WONG *et al.*, 1981, 1983, 1984; GRIMM-JORGENSEN, 1987). Nous rapporterons les résultats dans le dernier chapitre de ce travail.

CULTURES CELLULAIRES DE MOLLUSQUES PULMONES

Comme nous l'avons signalé dans le chapitre précédent, la culture cellulaire est un moyen pour étudier l'efficacité des molluscicides. Il est donc possible dans ce chapitre de procéder à un rappel sur les différents types de tissus que les auteurs ont employés chez les Pulmonés, de définir les méthodes de culture employées par ces derniers et, enfin, de préciser le cas particulier des neurones qui seraient, d'après TOWNSEL et THOMAS (1987), l'un des premiers tissus à être utilisé pour ces techniques. Le plan de ce chapitre tient compte de ces trois modalités et se termine par des commentaires généraux sur les cultures cellulaires des Pulmonés.

I. - TISSUS DES MOLLUSQUES PULMONES CONCERNES PAR LES CULTURES.

Le tableau VII (page suivante) récapitule les principaux travaux qui ont été réalisés sur la culture *in vitro* de tissus appartenant à des Mollusques Pulmonés.

A. ESPÈCES UTILISÉES.

Les trois principales classes de Mollusques sont concernées par ces études:

- Les cultures portent essentiellement sur les classes des Bivalves et des Gastéropodes.

Les Céphalopodes sont peu étudiés, à l'exception du travail de TRESGOTS (1982) sur la glande digestive de la Seiche.

Références	Espèces	Tissus ou cellules cultivés	Milieu de culture	Survie
QUIOT <i>et al.</i> (1973)	<i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Helix aspersa</i>	Tissu cardiaque, manteau, pied.	QUIOT et VAGO	3 mois
COUSSERANS (1977)	<i>Crassostrea angulata</i> , <i>C. gigas</i> , <i>Ostrea edulis</i>	Tissu cardiaque	Milieu dérivant du précédent	14 jours
KOSTENKO et TRET'JAK, 1978, MUSTENKO et KOSTENKO, 1982	<i>Helix pomatia</i> , <i>Lymnaea stagnalis</i>	Neurones	Milieu salin	?
GOMOT et COURTOT, 1979, VINCENT <i>et al.</i> , 1984	<i>Helix aspersa</i>	Ganglions nerveux, glande à albumen, gonade	Milieu semi-solide de GOMOT (1973)	8-13 jours
BREWSTER et NICHOLSON, 1979	<i>Crassostrea virginica</i>	Amibocytes	LI <i>et al.</i> (1966), + sérum de bovin	jusqu'à 6 semaines
TRESGOTS, 1982	<i>Sepia officinalis</i>	Glande digestive	DURCHON et SCHALLER (1963)	10 jours
GRYGON, 1981	<i>Cepaea nemoralis</i>	Gonade	EAGLE, avec sérum de veau ou de cheval (10 %)	3 semaines
WONG <i>et al.</i> , 1981, 1983, 1984, BARKER <i>et al.</i> , 1982	<i>Aplysia</i> , <i>Biomphalaria</i> , <i>Helisoma</i> , <i>Lymnaea</i>	Neurones	LEIBOWITZ L15	jusqu'à 2 semaines
WIJDENES <i>et al.</i> , 1983	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Glande à albumen, ganglions nerveux	GOMOT et GUYARD, 1964	2 semaines
HAYDON <i>et al.</i> , 1985, 1987, 1988, ZORAN <i>et al.</i> , 1990	<i>Helisoma trivolvis</i>	Neurones	LEIBOWITZ L15	4 à 7 jours
GRIMM-JORGENSEN, 1987	<i>Physella heterostropha</i>	Neurones	LEIBOWITZ L15	48 heures
MAROM et DAGAN, 1987	<i>Helix aspersa</i>	Neurones	LEIBOWITZ L15	2-5 jours
MOED <i>et al.</i> , 1989	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Neurones caudo-dorsaux	Solution saline avec vitamines et acides aminés du milieu d'EAGLE	2 semaines
BERDAN <i>et al.</i> , 1990	<i>Helisoma trivolvis</i>	Neurones	LEIBOWITZ L15	5 jours
FERGUSON et AUDESIRK, 1991	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Neurones	LEIBOWITZ L15	3 jours

Tableau VII.
Tissus de mollusques cultivés *in vitro* et principaux résultats.

- Parmi les Gastéropodes, ce sont les Pulmonés qui font l'objet de la plupart des études. Ce sont surtout les espèces dulçaquicoles qui sont les plus concernées. Parmi celles-ci, citons *B. glabrata*, *Helisoma trivolvis* et *L. stagnalis*.

B. TISSUS ET ORGANES CULTIVÉS.

Les tissus et organes étudiés appartiennent à des types différents. Il faut remarquer cependant:

- que les neurones ont fait l'objet de nombreuses études. Ces derniers font partie de ganglions différents comme les cellules caudo-dorsales de MOED *et al.*, 1989. Certains neurones sont bien identifiés comme les neurones 5L et 5R d'*H. trivolvis* (WONG *et al.*, 1981) ou les cellules 5 et 19 (HAYDON *et al.*, 1985). Mais la plupart des études concernent des cellules dont la localisation reste imprécise. C'est le cas des travaux de KOSTENKO et TRET'JAK (1978), de WONG *et al.* (1983, 1984), de WIJDENES *et al.* (1983) ou de FERGUSON et AUDESIRK (1991).

- que d'autres tissus sont également utilisés. C'est le cas de la glande digestive (TRESGOTS, 1982), des glandes génitales (GOMOT et COURTOT, 1979; WIJDENES *et al.*, 1983) ou encore du tissu cardiaque (QUIOT *et al.*, 1973).

- que des tissus particuliers ont été explorés. Parmi ceux-ci, citons les amibocytes de l'Huître de Virginie (BREWSTER et NICHOLSON, 1979) ou des secteurs du manteau ou du pied.

L'examen du tableau VII montre, de plus, que les premières cultures de cellules ont été faites aux dépens des Mollusques terrestres (QUIOT *et al.*, 1973) et portaient essentiellement sur le tissu cardiaque. La première étude réalisée sur les Mollusques marins est celle de VAGO et CHASTANG en 1960. Par la suite, les recherches se sont orientées vers les Pulmonés dulçaquicoles avec comme principal objectif, les neurones ganglionnaires.

C. MILIEUX DE CULTURE.

Une partie essentielle de ces recherches a porté sur la mise au point de milieux les plus adaptés aux tissus des Mollusques précités afin d'assurer une "prolifération" importante des cellules. VAGOT et QUIOT en 1969 ont développé le principe de la standardisation pour

les milieux de culture d'Invertébrés en fractions. Tous les milieux sont dérivés de milieux salins avec des concentrations en sels qu'il faut adapter à la pression osmotique et au pH de l'hémolymphe pour les mollusques (COUSSERANS, 1977). Tous ces milieux contiennent des antibiotiques et des éléments nutritifs d'origine diverse.

Les milieux utilisés pour la culture de neurones dérivent, pour la plupart, du milieu de LEIBOWITZ L15. Le milieu originel est souvent modifié et conditionné par apport d'éléments nutritifs ou autres.

D. *RÉSULTATS.*

Les résultats sont variables selon les auteurs. La raison invoquée tient à ce que les chercheurs comptent faire de ces cellules en culture.

- La plus grande survie enregistrée dans le cadre de cette étude est de l'ordre de 3 mois pour le tissu cardiaque (QUIOT *et al.*, 1973). Mais les cellules finissent par former une couche irrégulière où l'on enregistre de nombreux points de nécrose.

- Des survies assez longues, de l'ordre de 2 à 6 semaines, ont été rapportées par plusieurs auteurs pour des cultures d'amibocytes, de gonade, de glande à albumen aussi bien que pour des neurones. Ces résultats ont été obtenus avec des milieux de nature différente comme celui semi-solide de GOMOT (1973) ou celui d'EAGLE modifié.

- Des survies nettement plus faibles, de l'ordre de quelques jours, ont été rapportées pour les neurones en culture. La plupart de ces résultats ont été obtenus avec le milieu de LEIBOWITZ L15. Ceci pose la viabilité de ce milieu pour la survie des cellules de neurones car d'après WONG *et al.* (1983, 1984), la survie ne dépasse pas 2 semaines avec les neurones de plusieurs espèces de Mollusques.

Dans tous les cas, il faut noter que la survie des explants est nettement plus longue que celle de cultures cellulaires *sensu stricto*. De même, les survies sont plus faibles pour les neurones que pour les autres types cellulaires.

GRIMM-JORGENSEN (1987) note, en plus, que les neurones en culture dans un milieu défini contenant sels, vitamines, acides aminés et glucides sont capables d'une survie de plusieurs jours mais ils ne peuvent pas régénérer leurs axones. Ce dernier fait est possible

Milieu	Fraction A	Fraction B Antibiotiques	Fraction C	Fraction D Sels	Fraction E	Remarques
DURCHON et SCHALLER (1963)	-	Spécilline G, streptomycine	Sérum de cheval, embryon de poulet	Eau de mer	Albumine d'oeuf, glucose, gélose à 1 %	-
EAGLE (1959)	13 acides aminés, 8 vitamines	Pénicilline streptomycine	Sérum de veau ou de cheval (10 %)	Six sels	D-glucose, rouge de phénol	-
GOMOT et GUYARD (1964)	Milieu TC 199 à 50 % dans l'eau bidistillée	Pénicilline, streptomycine	-	Solution GEY modifiée (Ca++ et K+)	Glucose, agar (1 %)	Milieu semi-solide pH, 7,5
LI <i>et al.</i> , 1966	Milieu TC 199	Pénicilline, streptomycine, amphotéricine B	Sérum de veau foetal	Solution saline marine d'EARLE	L- glutamine	pH, 7,8 à 8
QUIOT et VAGO (1969)	Solution organique du milieu TC 199 (concentrée 5 fois)	Pénicilline G, dihydro- streptomycine	Sérum homologue d' <i>Helix</i>	Cinq sels	Hydrolysats de lactal- bumine, glucose, rouge de phénol	Milieu liquide, pH, 6,8
COUS- SERANS (1977)	Solution organique du TC 199 (concentrée 5 fois)	Pénicilline G, streptomycine, polymyxine, mycostatine	Sérum de veau foetal	Solution saline	5 acides aminés, glucose, rouge de phénol	pH, 6,9

Tableau VIII.
Composition des milieux de culture utilisés
pour les différents tissus des mollusques
(à l'exception des neurones).

si les neurones sont cultivés dans un milieu contenant de l'hémolymphe, du sérum de veau foetal ou encore un milieu conditionné à partir du cerveau.

II. - COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE.

A. *TISSUS AUTRES QUE LES NEURONES.*

Le tableau VIII récapitule la composition des six milieux que les auteurs ont utilisés pour la culture de tissus (ou de cellules) appartenant à des organes autres que les ganglions nerveux.

La majorité d'entre eux dérivent du milieu TC 199. Ce dernier est employé sous forme d'une dilution (à 50 % dans l'eau bidistillée stérile) ou sous forme concentrée (5 fois) pour la fraction organique. La fraction E du milieu de DURCHON et SCHALLER consiste en de la gélose à 1 %. Quant au milieu minimum d'EAGLE (1959), il contient 13 acides aminés et 8 vitamines.

Tous les milieux sont supplémentés en pénicilline G et streptomycine. Dans deux cas, on note la présence d'antifongiques.

La fraction nutritive est composée par du sérum de veau foetal (3 milieux), du sérum de cheval (2 cas), de l'embryon de poulet (1 cas) ou encore par du sérum homologue d'*Helix aspersa* (1 cas).

Le milieu de DURCHON et SCHALLER comprend une fraction minérale avec de l'eau de mer stérile. Les autres n'ont que des solutions salines avec un nombre variable de sels.

On retrouve du glucose dans trois milieux, de la gélose dans deux cas, de l'albumine également dans deux cas, et plusieurs acides aminés dans deux milieux.

Cinq milieux sont liquides. Celui de GOMOT et GUYARD (1964) est semi-solide avec une fraction liquide. WIJDENES *et al.* (1983) signalent que ce milieu présente les avantages suivants:

- "the tissues are both well aerated and well provided with nutrients",
- "test substances can be added directly and in high concentrations to the target organs",

Milieu	Fraction A	Fraction B Antibiotiques	Fraction C	Fraction D	Fraction E	Remarques
LEIBOWITZ (modifié et conditionné)	Milieu sans les sels (avec 17 acides aminés, 8 vitamines)	Pénicilline, streptomycine, amphotéricine B	Milieu pour le condition- nement à base de cerveaux	Quatre sels	D- galactose, acide pyruvique, rouge phénol	milieu liquide, pH, 7,5 et 7,8
Milieu de base d'EAGLE (1959)	13 acides aminés et 8 vitamines	Pénicilline, streptomycine	-	Solution saline HEPES	Glucose, rouge phénol	-
GOMOT et GUYARD (1964)	Milieu TC 199 dilué à 1/2	Pénicilline, streptomycine	-	Solution GEY modifiée (Ca++ et K+)	Glucose, agar (1 %)	Milieu semi-solide, pH, 7,5

Tableau IX.
Composition des milieux de culture
utilisés pour la culture des neurones de mollusques.

- "tissues and organs can be oriented close to the target structures".

Le pH est proche de la neutralité ou légèrement alcalin.

B. NEURONES GANGLIONNAIRES.

Le tableau IX fournit la composition des trois milieux de culture.

Les auteurs utilisent fréquemment le milieu de LEIBOWITZ L 15. Dans tous les cas, le milieu est modifié par la suppression de ses sels constitutifs mais on ajoute des concentrations définies de plusieurs sels inorganiques (NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂). Il est également conditionné par l'apport d'un certain nombre de cerveaux appartenant au mollusque étudié.

Les deux autres milieux sont ceux d'EAGLE (milieu de base) et de GOMOT et GUYARD (1964). Les caractéristiques de ces milieux sont identiques à celles que nous avons déjà rapportées pour le tableau VIII.

Les trois milieux sont supplémentés en antibiotiques, en glucose ou galactose, et en acide pyruvique (pour le milieu de LEIBOWITZ).

III. - TECHNIQUES PARTICULIÈRES POUR LA PRÉPARATION DES MILIEUX.

Ces méthodes sont spécifiques aux neurones.

A. TECHNIQUES D'ISOLEMENT.

Les neurones peuvent être isolés:

- par des méthodes enzymatiques. On peut utiliser a) la trypsine cristalline (0,25 %) en présence de hyaluronidase lyophilisée en solution physiologique à 37° C pendant 40 à 60 minutes, b) une solution de pronase (0,1 à 0,35 %) préparée dans une solution saline physiologique pendant 30 à 60 minutes à 18-20° C, ou c) de la trypsine cristalline (0,5 %) dans une solution saline physiologique pendant 10 à 12 heures à 4° C. Cette digestion ne doit pas être conduite jusqu'à la désintégration complète des "gaines" afin de protéger les neurones des dommages.

La meilleure des méthodes serait la première, d'après WONG *et al.* (1983). L'emploi de la seconde se traduirait par une survie limitée.

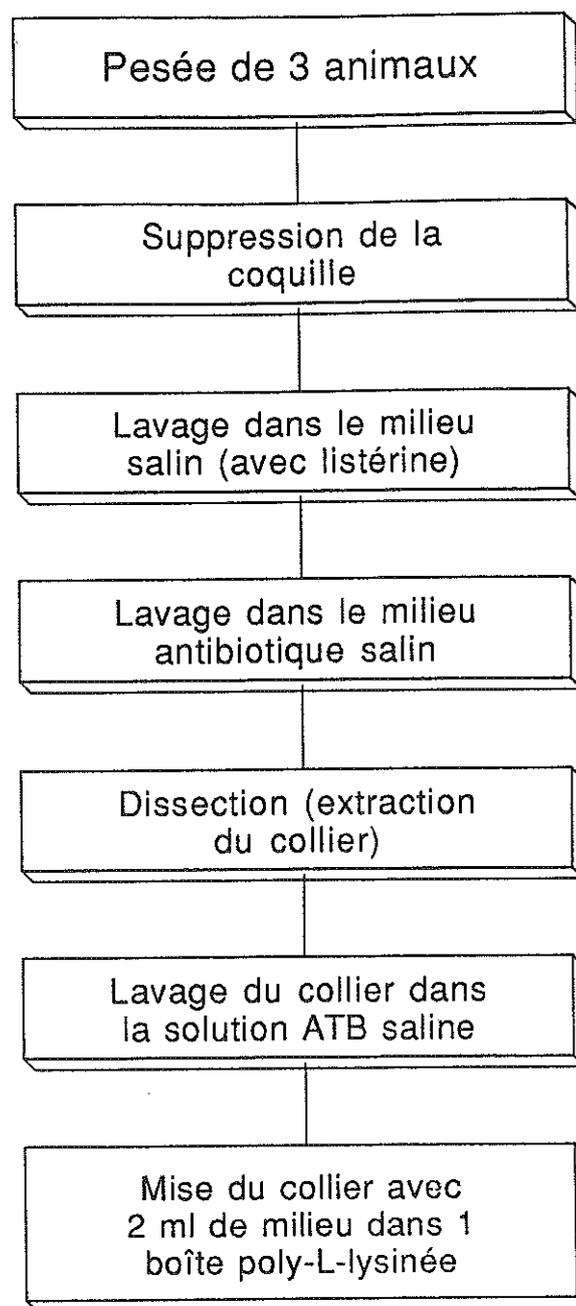


Figure 1.
Organigramme récapitulant les différentes étapes
pour le conditionnement des milieux.

- par des méthodes mécaniques, avec des pipetages répétés. Des dommages peuvent se produire au cours de ce traitement. Cela s'exprime habituellement par une vacuolisation du cytoplasme. Il faut noter que les neurones endommagés peuvent être identifiés par l'emploi du bleu trypan (0,4 % dans une solution physiologique): les cellules intactes restent incolores tandis que les éléments endommagés se colorent en bleu.

B. CONDITIONNEMENT DES MILIEUX.

D'après WONG *et al.* (1981, 1983), la préparation d'un milieu conditionné (CM) est indispensable à la survie *in vitro* et, surtout, à la stimulation de la croissance pour les dendrites des neurones dissociés (figure 1). Ce milieu s'obtient par la pré-incubation de colliers ganglionnaires pendant 72 heures: deux colliers sont ajoutés pour chaque millilitre de milieu (LEIBOWITZ). Si on utilise plus de deux colliers, la stimulation de la croissance ne change pas et on obtient seulement un plateau.

Si on place un neurone dans ce milieu conditionné, la cellule atteint "une morphologie stable" (WONG *et al.*, 1981) dès le deuxième jour, parfois au troisième et elle conserve cet aspect jusqu'à la fin de la culture. Dans le cas d'*H. trivolvis*, on n'utilise que le collier central et les ganglions buccaux pour le CM. Pour d'autres genres comme *Aplysia*, le CM est constitué à partir de l'hémolymphe.

Il faut 24 heures au minimum pour que le facteur conditionnant (CF) soit produit ou relargué dans le milieu: en effet, au bout de 12 heures, l'activité stimulante n'est toujours pas décelable. On pense que 65 % de ce CF dérivent d'un pool de stockage pré-existant et que le reste est synthétisé au cours des 72 premières heures (période de conditionnement).

Ce facteur se lie fortement au substrat (poly-L-lysine): c'est une macromolécule soluble qui développe son activité après sa liaison au substrat. Son action est inhibée par la chymotrypsine, la trypsine ou encore le chauffage à 100° C. Elle est conservée lors d'un traitement par la RNase ou la DNase. Si l'on fait agir de l'anisomycine (inhibiteur de la synthèse protéique chez les mollusques), la croissance neuronale est moins fortement stimulée (BARKER *et al.*, 1982).

Il existe donc une régulation dans la croissance des neurones en culture et ceci s'opère par des facteurs qui sont produits par leur propre système nerveux: on parle d'une spécificité

d'espèce (GRIMM-JORGENSEN, 1987). Il faut noter cependant que certains facteurs sont reconnus à des degrés divers par les neurones d'espèces voisines du mollusque étudié.

Si les neurones nécessitent pour leur croissance de tels facteurs dérivés du "cerveau", par contre le maintien de leurs caractéristiques électrophysiologiques ne dépend d'aucun facteur exogène (WONG *et al.*, 1981). Enfin, il faut signaler que ce milieu conditionné contient, non seulement des facteurs qui stimulent la croissance des neurones, mais également des facteurs différents qui, par exemple, stimulent le métabolisme cholinergique de ces cellules (BARKER *et al.*, 1982).

C. SUBSTANCES CAPABLES D'AGIR SUR L'ÉLONGATION DES DENDRITES.

Selon GRIMM-JORGENSEN (1987), la somatostatine synthétique et la calcitonine de Saumon stimulent la régénération neuronale d'une façon dose-dépendante chez le Pulmoné dulçaquicole *Physella heterostropha*. Ces deux substances peuvent donc se substituer au facteur conditionnant. Comme ces deux molécules sont stockées dans le "cerveau" de *Physella*, il serait tentant de dire que l'activité stimulatrice trouvée dans le milieu conditionné est due à la présence d'un matériel proche de la somatostatine ou de la calcitonine. Des expériences sont en cours à l'heure actuelle pour confirmer ou infirmer cette hypothèse de travail.

D'autres substances peuvent également agir sur l'élongation en inhibant la croissance. C'est le cas de la dopamine et de la sérotonine qui entraînent une inhibition totale ou transitoire (McCOBB *et al.*, 1988). Il faut souligner que les effets de ces deux neurotransmetteurs sont sélectifs. Les études, qui s'y rapportent (HAYDON *et al.*, 1985, 1987; McCOBB *et al.*, 1988) portent toutes sur *H. trivolvis* et, plus particulièrement, sur 5 neurones bien identifiés:

B 19: affecté par les deux neurotransmetteurs,

B 4 et B 5: ne sont pas affectés par ces produits.

P 1 et P 5: sont affectés par la sérotonine seule.

IV. - COMMENTAIRES.

Les données rapportées dans les paragraphes précédents montrent que la survie des tissus cultivés est plus faible lorsqu'il s'agit de neurones. Elle ne dépasse pas 2 semaines pour WONG *et al.* (1981, 1983), MOED *et al.* (1989) et est souvent de l'ordre d'une semaine ou moins pour les autres auteurs. Lorsqu'il s'agit de tissu cardiaque ou de gonade, les meilleures survies peuvent atteindre 3 mois (QUIOT *et al.*, 1973) et se situent le plus souvent autour de 15 jours. Il faut remarquer cependant que dans le cas des neurones, les survies rapportées par les auteurs correspondent à des études réalisées pour des buts autres comme l'électrophysiologie ou la toxicologie.

Les études réalisées sur les neurones avec le milieu de LEIBOWITZ montrent la présence de deux points particuliers qu'il est important de commenter:

- La fraction saline du milieu n'est pas celle de l'auteur précité. Dans tous les cas, les auteurs enlèvent les sels du milieu précité et mettent à la place une fraction composée par NaCl, KCl, MgCl₂ et CaCl₂, avec des variations dans la concentration respective de chaque sel. Le genre du mollusque utilisé pour ces expériences (*Helisoma*, *Lymnaea*, ...) peut expliquer dans une certaine mesure ces fluctuations mais il n'en reste pas moins vrai qu'il existe des variations dans ces concentrations pour la même espèce. A titre d'exemple, chez *H. trivolvis*, la concentration en NaCl est de 51,3 mM pour BERDAN *et al.* (1990) et de 40 mM pour ZORAN *et al.* (1990); la composition du tampon HEPES est respectivement de 5 et 10 mM tandis que les concentrations des autres sels ne changent pas. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces fluctuations intra-spécifiques. La plus plausible serait d'admettre que la concentration d'un sel déterminé n'a qu'une importance relative du moment que l'osmolarité globale et le pH du milieu sont les mêmes. Des expérimentations sont nécessaires pour vérifier le bien fondé de cette hypothèse.

- Le conditionnement du milieu peut être réalisé par la présence d'hémolymphe (chez *Aplysia*) ou encore de colliers ganglionnaires. Cette différence s'explique aisément par le fait que les neurones constitutifs de ces colliers sécrètent des facteurs utiles pour la croissance des cellules et que ces derniers se retrouvent dans l'hémolymphe. Si l'action des facteurs hémolympatiques sur la croissance neuronale a bien été retrouvée chez *Aplysia* (WONG *et al.*, 1984), ce n'est pas le cas lorsque les expériences sont réalisées chez *Helisoma*. L'influence de l'hémolymphe sur cette croissance est donc contestable et le résultat acquis

par WONG *et al.* chez *Aplysia* pourrait, en partie, s'expliquer par le protocole expérimental utilisé pour cette espèce. Il serait utile d'étudier la croissance de ces neurones en présence de substances qui stimulent leur croissance comme cela est réalisé chez les Vertébrés à l'heure actuelle (BOTTENSTEIN, 1985).

LE SYSTEME NERVEUX DE

Lymnaea stagnalis.

Il était utile de choisir une espèce de Pulmoné pour réaliser des cultures de neurones. Notre choix s'est porté sur *Lymnaea stagnalis* en raison des critères rapportés par KOSTENKO *et al.* (1974), TOWNSEL et THOMAS (1987):

- L'espèce a un système nerveux simple, nettement visible avec un nombre de neurones relativement faible.
- Les cellules nerveuses ont une activité stéréotypée et une grande rigueur physiologique.
- Les neurones de cette espèce ont déjà été utilisés pour des cultures neuronales, en particulier pour l'étude des mécanismes de croissance.

Nous avons adopté pour ce chapitre un plan classique de démonstration. Après un rappel sur la position systématique de *L. stagnalis*, nous passerons en revue la structure du "cerveau" de cette espèce, les différents types de cellules neurosécrétrices, leurs caractéristiques structurales et leur rôle. Des notions d'électrophysiologie sont fournies par la suite et des commentaires généraux sont présentés à la fin de ce chapitre.

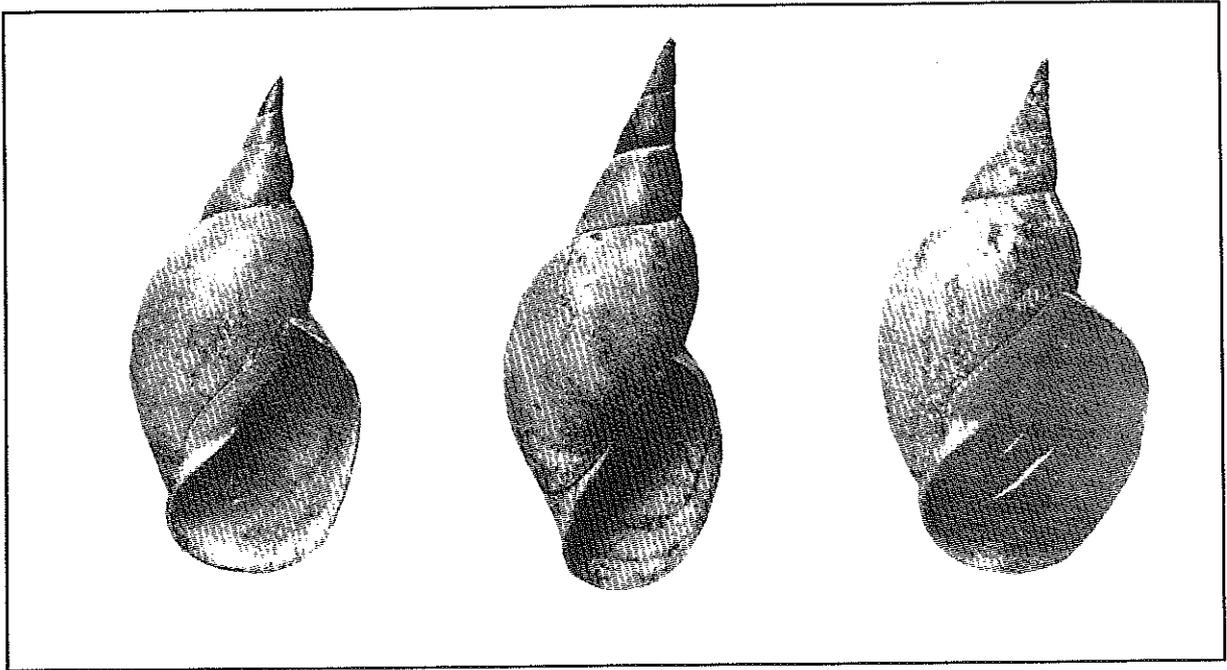


Figure 2.
L. stagnalis. Trois formes différentes de la coquille
 (variétés *turgida* Menke: 1, *Locardi* Coutagne: 2,
 et *variegata* Hazay: 3) (d'après GERMAIN, 1969).

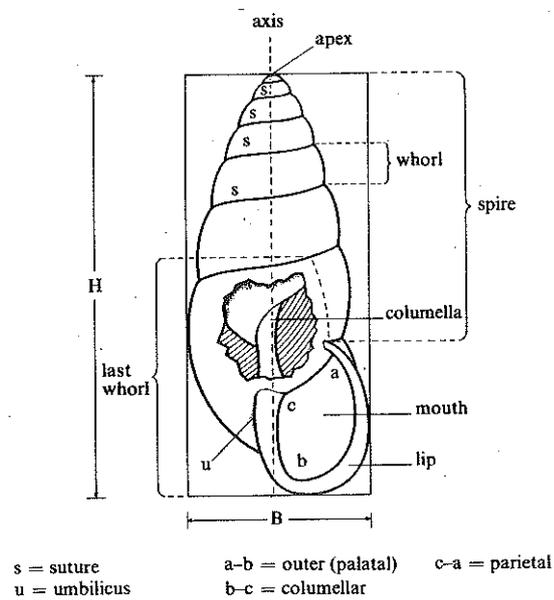


Figure 3.
 La terminologie utilisée pour la description de la coquille
 (d'après GERMAIN, 1969).

I. - *L. stagnalis*.

A. PRESENTATION DE L'ESPECE.

La position systématique de l'espèce est la suivante:

- * Embranchement des Mollusques,
- * Classe des Gastéropodes,
- * Ordre des Pulmonés,
- * Sous-ordre des Basommatophores,
- * Famille des Lymnaeidae,
- * Genre *Lymnaea*,
- * Espèce: *stagnalis* (Linné, 1758).

Le genre *Lymnaea* est parfois écrit sous la forme suivante: *Limnaea*. Cette terminologie se rencontre dans la littérature française alors que la première dénomination est utilisée dans le travail de synthèse réalisé par HUBENDICK (1951).

B. LA COQUILLE.

La figure 2 montre des exemples de cette coquille. Cette dernière est très polymorphe comme en témoignent les trois représentations. La longueur d'un exemplaire adulte varie de 35 à 65 mm (GERMAIN, 1969), voire jusqu'à 70 mm. Le diamètre du dernier tour de spire est, lui aussi, variable: de 16 à 30 mm.

Dénommée "Limnée d'étang", cette espèce a une coquille allongée et un ombilic¹ recouvert. La spire est longue, effilée avec 5, 6 ou 7 tours convexes. Le dernier tour forme les deux tiers de la coquille et les sutures sont marquées.

L'ouverture est oblique, ovulaire et sa hauteur dépasse la moitié de la longueur totale de la coquille. Le bord columellaire est dilaté, assez épais. Par contre, le péristome est mince. La coquille est garnie de stries longitudinales serrées, souvent avec de fines spirales.

La coquille est souvent nue. Mais nous avons cependant observé des exemplaires enduits de vase noirâtre ou encore d'oxydes ferriques lorsque l'espèce vit dans des rigoles de déversement, à la bonde des étangs.

¹. - Les termes techniques utilisés pour la coquille sont définis sur la figure 3.

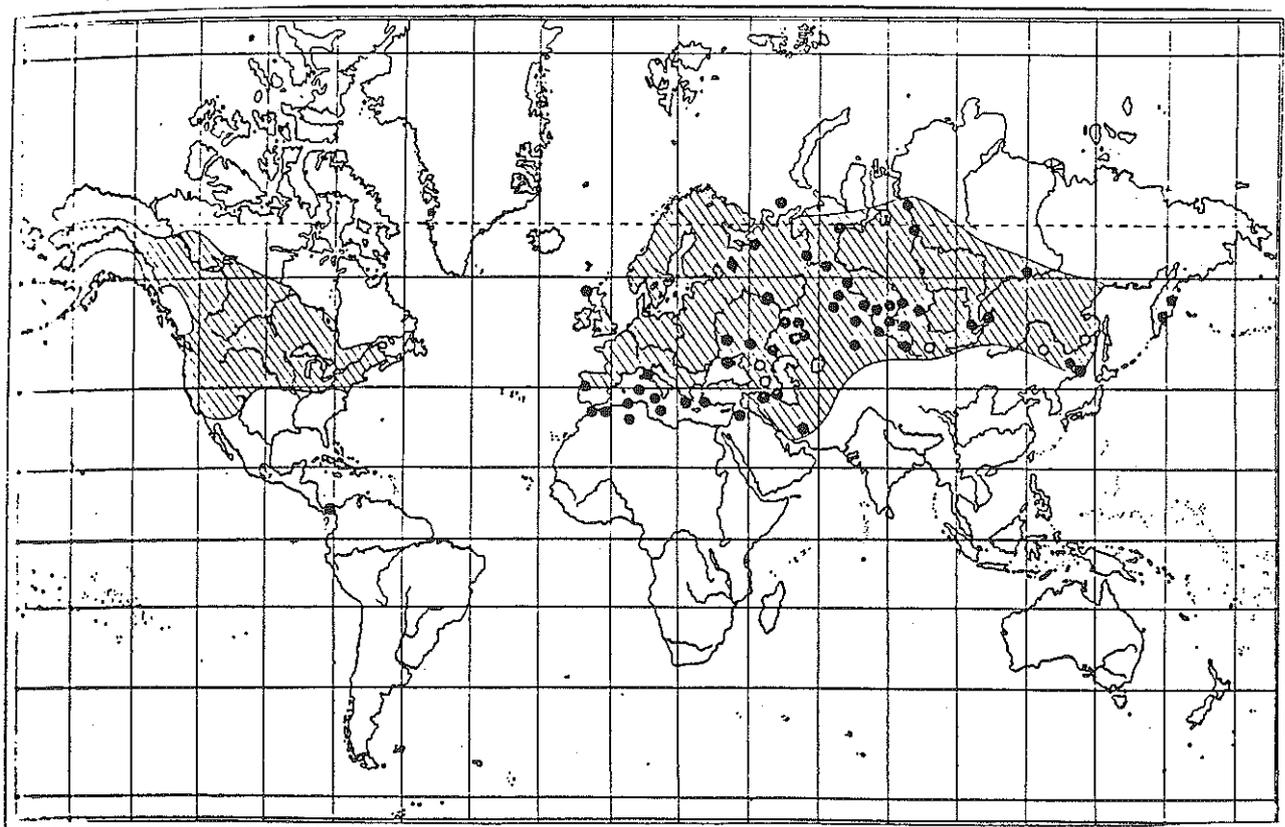


Figure 4.
La distribution géographique de *L. stagnalis*
(d'après HUBENDICK, 1951).

C. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DE L'ESPECE.

Nous avons emprunté à HUBENDICK (1951) la carte que cet auteur a réalisée sur la distribution géographique de *L. stagnalis*. Comme on peut le constater sur la figure 4, l'espèce s'observe en Europe et dans la majeure partie de l'Asie. On la rencontre dans l'Afrique du Nord, en particulier au Maroc où sa présence est notée dans plusieurs travaux (VAN DAMNE, 1984; KHALLAAYOUNE, 1989).

L'espèce vit également en Amérique du Nord, dans la plupart des états des U.S.A. et au Canada. Enfin, la présence de *L. stagnalis* a été rapportée en Amérique Centrale.

Dans le Centre de la France, l'espèce est surtout fréquente sur les terrains sédimentaires. En revanche, sur les terrains siliceux comme ceux du Limousin, l'espèce est très rarement observée. Lorsqu'elle est présente, elle forme des colonies abondantes que l'on rencontre en particulier dans les étangs et fossés ou rigoles qui en proviennent; elle est nettement moins fréquente dans les mares isolées ou les rivières.

L'introduction de cette espèce dans des mares qui en sont dépourvues se traduit par le développement d'une nouvelle colonie qui tend à dominer sur les autres espèces de limnées comme *L. palustris* Müller (RONDELAUD, communication personnelle).

D. QUELQUES TRAITES DE LA BIOLOGIE DU MOLLUSQUE.

D'après LAMBERT (1990), les *L. stagnalis* "apparaissent dans le milieu quand la hauteur d'eau atteint 25 à 35 cm". Elles se rencontrent également dans des couches d'eau plus minces (de 15 à 25 cm) ou plus élevées (jusqu'à 45 cm).

La présence de ces limnées est effective, dans le cas de cet auteur, entre juillet et octobre. Cette période correspond aux exemplaires qui atteignent la limite maximale de taille et qui meurent progressivement à partir de juillet. L'évolution du processus est, par contre, différente lorsque les mares s'assèchent en partie ou en totalité: les animaux adultes meurent tous et seuls les jeunes peuvent survivre à un assèchement prolongé de la station car elles s'enfoncent dans la vase, ferment leur ouverture par un épiphragme et restent à l'état de vie ralentie (GERMAIN, 1969).

Les limnées de cette espèce sont toutes herbivores et broutent les plantes aquatiques sur lesquelles elles rampent. En cas de jeûne prolongé, elles peuvent devenir omnivores.

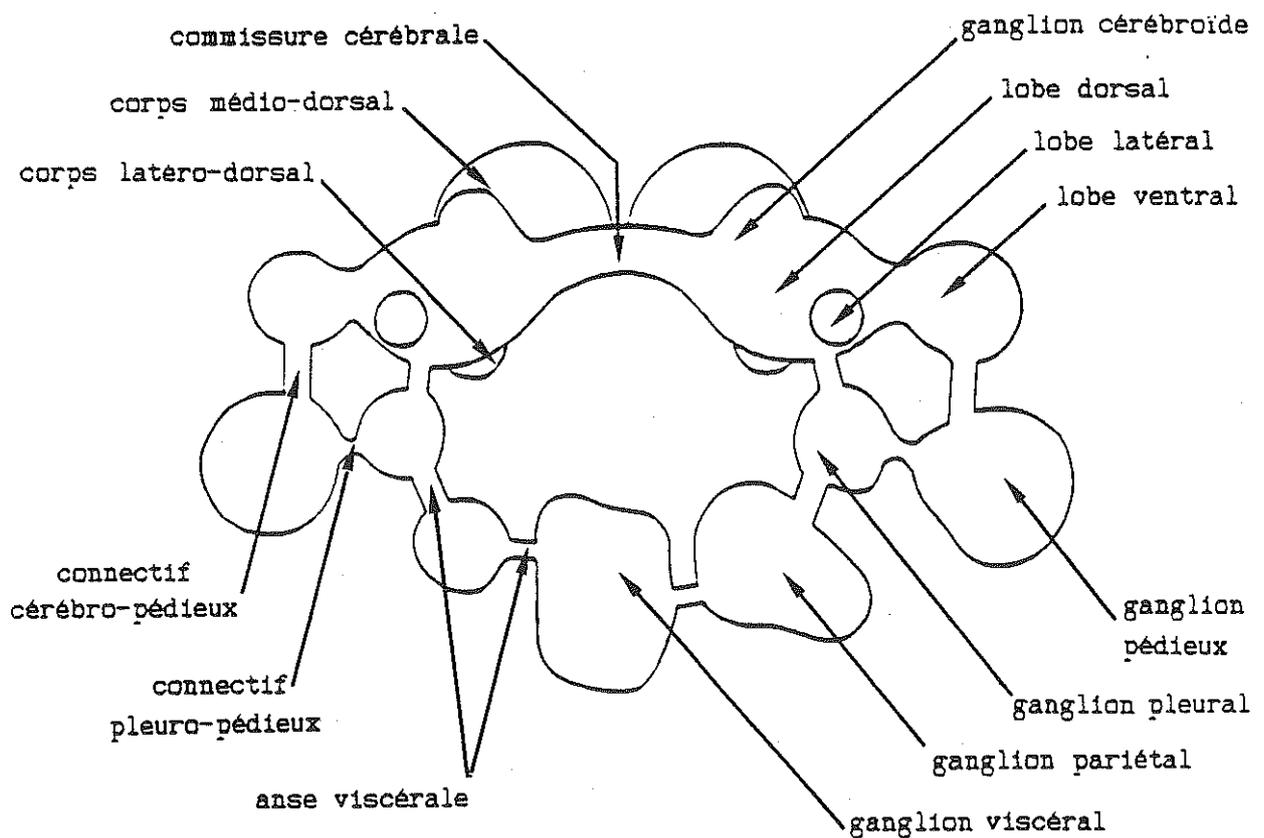


Figure 5.
 Le système nerveux de *L. stagnalis*
 (d'après BOER *et al.*, 1977, ESCLAIRE, 1990).
 Le collier péri-oesophagien a été aplati dans un but didactique.

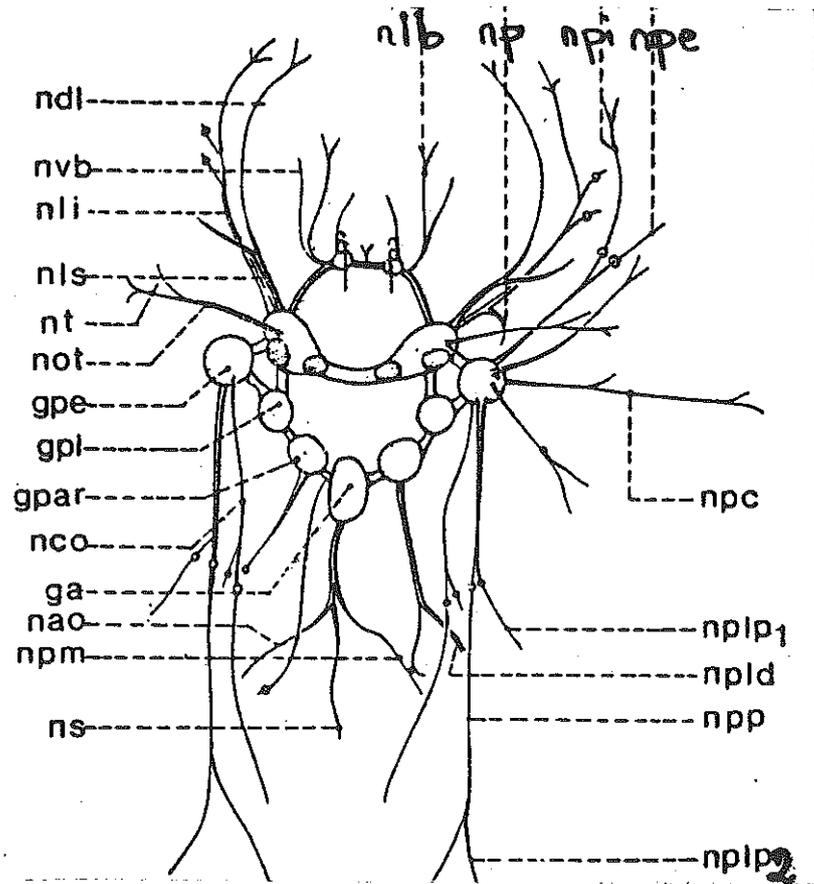


Figure 6.
 Systématisation des nerfs qui partent de la chaîne ganglionnaire
 chez *L. humilis* Say (d'après FRANC, in GRASSE, 1968).

Abréviations. ga: ganglion abdominal. gpar: ganglion pariétal. gpe: ganglion pédieux.
 gpl: ganglion pleural. nao: nerf aortique. nco: nerf columellaire. ndl: nerf dorso-latéral.
 nlb: nerf latéro-buccal. nls et nli: nerfs labiaux supérieurs et inférieur.
 not: nerf labio-tentaculaire. np: nerf pénial. npc: nerf pédio-central.
 npe et npi: nerfs pédieux externe et interne. npld: nerf pleural droit.
 nplp1 et nplp2: 1° et 2° nerfs pédieux latéro-postérieurs. npm: nerf palléal médian.
 npp: nerf pédieux postérieur. ns: nerf splanchnique. nt: nerf tentaculaire.
 nvb: nerf buccal ventral.

II. - LE SYSTEME NERVEUX DE *L. stagnalis*.

A. DESCRIPTION GÉNÉRALE.

La description de ce système nerveux s'inspire de la présentation qu'ESCLAIRE (1990) a réalisée sur les schémas de *L. stagnalis*.

Les deux ganglions cérébroïdes, lobés (Fig. 5) sont unis entre eux par une commissure cérébrale supra-oesophagienne et assez longue. Ils sont unis aux ganglions pédieux inférieurs par des connectifs cérébro-pédieux. L'ensemble forme un collier péri-oesophagien.

L'extrémité postérieure des ganglions cérébroïdes est reliée en arrière à deux ganglions pleuraux, l'un droit, l'autre gauche. Chacun d'entre eux est relié au ganglion pédieux correspondant par un connectif pleuro-pédieux.

Du ganglion pleural droit ou gauche, part l'anse viscérale avec un ganglion pariétal droit, un ganglion viscéral et un ganglion pariétal gauche, situé à l'arrière du pleural gauche. Il existe généralement une asymétrie entre les deux ganglions pariétaux, le droit étant plus gros que le gauche.

Outre ce deuxième collier nerveux (avec l'anse viscérale), il y a un collier buccal plus antérieur, avec deux ganglions buccaux appliqués contre le bulbe radulaire. Ces derniers sont unis entre eux par la commissure buccale; ils sont reliés aux cérébroïdes par des connectifs cérébro-buccaux.

En résumé, on peut distinguer trois colliers:

- le collier buccal antérieur,
- le collier péri-oesophagien avec les ganglions cérébroïdes et pédieux,
- l'anse viscérale (avec cinq ganglions derrière les cérébroïdes).

De ces ganglions, partent des nerfs qui rejoignent un certain nombre de tissus et d'organes internes. A titre d'exemple, nous avons présenté sur la figure 6 les principaux nerfs d'une limnée voisine, *L. humilis* Say. Les nerfs les plus longs sont les nerfs pédieux latéro-postérieurs. Certains sont importants comme les nerfs labiaux supérieur et inférieur, ainsi que les nerfs pédieux externe et interne. Enfin, le nerf columellaire se dirige, comme son nom l'indique, vers la région du corps qui entoure la columelle.

B. GANGLIONS ET CELLULES NEUROSECRETICES.

Les neurones peuvent être neurosécréteurs ou non. Ils ont une disposition particulière au sein des ganglions.

- Les corps cellulaires se situent à la périphérie du ganglion en plusieurs couches.
- Les axones des neurones bi- ou multipolaires se dirigent vers le centre où ils forment le neuropile.
- Entre les corps cellulaires et les axones, se trouvent des cellules gliales.
- Les couches périphériques (formées par les corps cellulaires des neurones) s'interrompent au niveau des commissures, des connectifs et au départ des nerfs qui ont pour origine le neuropile.

Ganglions et nerfs sont entourés par une capsule, la périnèvre, constituée d'une fine couche de tissu conjonctif. Cette capsule présente de nombreuses connections avec les vaisseaux sanguins adjacents.

Parmi ces neurones, la plupart présentent une activité neurosécrétrice.

1. Définition des cellules neurosécrétrices.

ROUBOS (1984) définit les cellules neurosécrétrices de la manière suivante:

"for a long time it has been common use in neurobiology to distinguish two types of nerve cells, viz. "conventional neurons," which release neurotransmitters (e.g., acetylcholine, bioamines, and some amino acids) at synapses, and "neurosecretory cells," which release peptidergic neurohormones into the blood or lymph via neurohemal axon terminals".

Cette définition est sujette à controverses car le fonctionnement des cellules neurosécrétrices ne diffère pas de celui des neurones conventionnels. De plus, les peptides n'ont pas seulement un rôle de neurohormone mais ils interviennent également comme neurotransmetteurs.

Les neurones capables de neurosécrétion se rencontrent dans tous les ganglions nerveux. Ils sont, cependant, les plus nombreux dans les ganglions cérébroïdes.

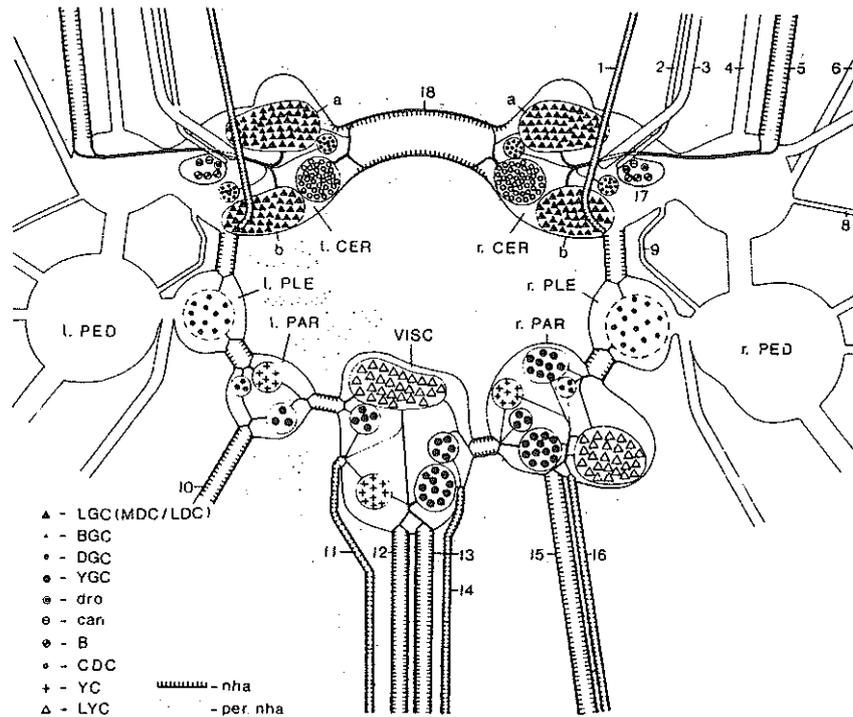


Figure 7.

Localisation des cellules neuro-sécrétrices dans 7 ganglions nerveux de *L. stagnalis*.

Abréviations. Ganglions cérébroïdes (CER), pariétaux (PAR), pédieux (PED), pleuraux (PLE) et viscéral (VISC) avec r: droit, et l: gauche. Cellules neurosécrétrices colorées en jaune (YC), en jaune clair (LYC), en vert jaunâtre (YGC), en vert brillant (BGC), en vert clair (LGC) ou en vert sombre (DGC). D'autres cellules sont caudo-dorsales (CDC), latérales (can: cellule canopy; dro: cellule en gouttelette; B: cellules B), latéro-dorsales (LDC ou b) ou médio-dorsales (MDC ou a). *In* BOER et JOOSSE, 1975.

Références	Groupes cellulaires et affinités tinctoriales	Caractéristiques cellulaires	Localisation dans les ganglions cérébroïdes
JOOSSE (1964)	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules Gomori + avec inclusions colorées <li style="padding-left: 20px;">* en bleu noir par l'hématoxyline chromique, <li style="padding-left: 20px;">* en violet par la fuchsine paraldéhyde. - Cellules phloxine + avec inclusions colorées en rouge par la phloxine. 	<p>Deux amas de 50 cellules environ.</p> <p>Un seul amas Nombre de cellules variable.</p>	<p>Lobe dorsal:</p> <ul style="list-style-type: none"> * Cellules médio-dorsales à côté de l'origine de la commissure cérébrale. * Cellules latéro-dorsales au départ du connectif cérébro-pleural. * Cellules caudo-dorsales entre les deux amas précédents.
LEVER et JOOSSE (1961)	Cellules Gomori + (colorées en bleu noir par l'hématoxyline chromique).	<p>3 types cellulaires dans le lobe latéral:</p> <ul style="list-style-type: none"> * une grosse cellule (canopy cell), * deux cellules en gouttelette (droplet cells), * de petites cellules (B cells). 	
WENDELAAR BONGA (1970)	Cellules colorées en jaune ou en vert selon les amas.	<p>Dans le lobe dorsal du ganglion cérébral:</p> <ul style="list-style-type: none"> * les 3 amas décrits par JOOSSE, * deux amas supplémentaires de 10 à 25 cellules chacun, en position dorsale. <p>Au niveau du lobe latéral:</p> <ul style="list-style-type: none"> * les 3 types décrits par LEVER et JOOSSE. 	

Tableau X.
Les différents types de cellules, leurs affinités tinctoriales et leur localisation dans les ganglions cérébroïdes de *L. stagnalis* (d'après ESCLAIRE, 1990).

2. Les différents groupes.

La figure 7 récapitule les principaux groupes de cellules neuro-sécrétrices que LEVER et JOOSSE (1961), JOOSSE (1964), WENDELAAR BONGA (1970) ont mis en évidence dans sept ganglions de *L. stagnalis*. Cette classification a été réalisée en fonction des principales colorations que ces auteurs ont utilisées, à savoir l'hématoxyline chromique-phloxine et la méthode du bleu alcian-jaune alcian:

- Les ganglions cérébroïdes sont riches en cellules neurosécrétrices. On y observe, en particulier, six groupes différents.
- Le ganglion viscéral et le ganglion pariétal droit sont, de même, assez riches en cellules neurosécrétrices. On y trouve des éléments colorés en jaune, en jaune clair et en vert jaunâtre ou vert sombre.
- Le ganglion pariétal gauche, plus petit, comporte des cellules colorées en vert jaunâtre, en jaune et en vert sombre. Les ganglions pleuraux n'ont que des éléments colorés en vert sombre.

Les différents groupes présents dans les ganglions cérébroïdes ont, de plus, été répertoriés dans le tableau X. La lecture de ce dernier permet les remarques suivantes:

- Au niveau du lobe dorsal, on distingue trois amas, à savoir les cellules médio-dorsales, les latéro-dorsales et, au milieu, les caudo-dorsales. Ces trois formations sont signalées dans le schéma de synthèse publié par JOOSSE et GERAERTS, 1983 (figure 8, page suivante).

- LEVER et JOOSSE (1961) montrent, de plus, l'existence de trois autres types cellulaires dans le lobe latéral du ganglion. Cet amas comprend une grosse cellule ("canopy cell"), deux cellules en forme de gouttelette ("droplet cells") et un ensemble de petites cellules ("B cells"). WENDELAAR BONGA (1970) confirme l'existence de ces types cellulaires mais décrit, en plus, deux amas supplémentaires au niveau du lobe dorsal.

- En plus des cellules précitées, les auteurs ont décrit une formation particulière au niveau du lobe latéral: la glande folliculeuse. C'est une vésicule sphérique ou ovoïde dont le contenu, appelé colloïde, est mal connu. Elle se colore par l'hématoxyline chromique et la fuchsine paraldéhyde (GABE, 1967).

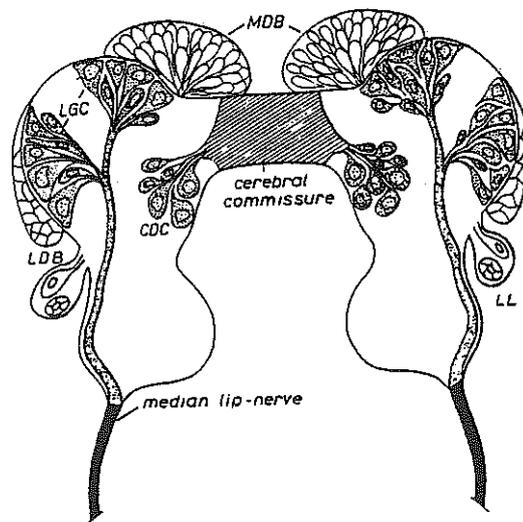


Figure 8.

Coupe schématique dans les ganglions nerveux montrant les zones neurosécrétrices (d'après JOOSSE et GERAERTS, 1983; JONG-BRINK, 1990).

Abréviations. Cellules caudo-dorsales (CDC), latérales (LL), latéro-dorsales (LDB) et médio-dorsales (MDC). Cellules colorées en vert clair (LGC).

Type cellulaire	Caractéristiques structurales	Observations
Cellules en vert clair	Diamètre: 80 μ m. Les axones forment un "paquet" principal qui aboutit au niveau de la périnèvre du nerf médian. Diamètre des granules neurosécrétoires: 200 nm.	Rythmicité diurne (relargage durant la nuit). Rôle dans la croissance. Cellules Gomori +.
Cellules en vert brillant	Non connues	Cellules Gomori +
Cellules caudo-dorsales	La zone neurohémale se situe à la périphérie de la commissure cérébrale. Diamètre des granules: 150 nm.	Rythmicité diurne. Cellules Gomori -.
Cellules + au bleu Soudan	La région neurohémale est probablement localisée à la périphérie du nerf médian.	Cellules Gomori -.
Cellules: * canopy * en gouttelette * B	Diamètre des granules neurosécrétoires: * 205 nm, * 135 nm, * 110 nm. La région neurohémale est inconnue. Les axones quittent le lobe latéral <i>via</i> le connectif postérieur.	
Cellules en vert foncé	La région neurohémale est diffuse. Diamètre des granules: 200 nm.	Rôle dans l'osmorégulation. Cellules Gomori +
Cellules en vert jaune	Les neurones sont à la périphérie des nerfs pariétal droit et viscéral. La région neurohémale est diffuse. Diamètre des granules: 165 nm.	Cellules Gomori +.
Cellules en jaune clair	Diamètre des granules: 230 nm. Les axones se rencontrent dans les mêmes zones que ceux des cellules en vert jaune.	Cellules Gomori -.
Cellules en jaune	Diamètre des granules: 140 nm. Mêmes remarques que pour les cellules colorées en vert jaune et en jaune clair.	Rôle dans l'osmorégulation. Cellules Gomori -.

Tableau XI.
Caractéristiques structurales des principales cellules neurosécrétrices
dans les ganglions cérébraux de *L. stagnalis*
(d'après BOER et JOOSSE, 1975).

A côté de ces méthodes histochimiques, des méthodes plus spécifiques telles que l'immunocytochimie sont utilisées pour localiser différents types de sécrétions identifiées par les méthodes classiques de coloration. La microscopie électronique est utilisée pour l'étude ultrastructurale des cellules et pour celle du turn-over neurosécrétoire.

3. *Ultrastructure.*

Comme le montre le tableau XI, les produits neurosécrétoires se présentent sous forme de granules élémentaires denses aux électrons, avec un diamètre moyen de 100 à 300 nm. A l'opposé des neuro-transmetteurs qui sont relargués au niveau des synapses, ces molécules sont libérées par les terminaisons axonales au niveau des zones neuro-hémales en contact avec l'hémolymphe. En fait, les caractéristiques générales d'une cellule neurosécrétrice sont les suivantes:

- Un noyau avec de nombreux nucléoles occupe le centre du corps cellulaire.
- Il existe une "dentelure" prononcée de la membrane nucléaire.
- De nombreux organites tels que mitochondries, appareil de Golgi, ... ainsi que des vésicules abondantes occupent le cytoplasme de ces cellules.

La figure 9 (page suivante) montre une reconstitution de cellules neurosécrétrices avec les éléments que nous avons rapportés ci-dessus.

Dans les petits neurones, les organites sont dispersés régulièrement dans le cytoplasme. Dans les cellules "géantes", ribosomes et réticulum endoplasmique sont concentrés autour du noyau excentré tandis que les mitochondries occupent la partie centrale du cytoplasme et que les cytosomes prédominent à la périphérie.

Les cellules nerveuses sont le plus souvent unipolaires, sans dendrites. Habituellement, elles possèdent un seul processus axonal qui se divise régulièrement. Les neurones bi- ou exceptionnellement multipolaires sont retrouvés le long du trajet des nerfs et connectifs ou dans le centre des ganglions.

Pour isoler les neurones de Mollusques, on les soumet à des traitements enzymatiques ou mécaniques. Ceci peut entraîner des altérations dans l'ultrastructure des cellules. En effet, leur cytoplasme apparaît "vidé" (ceci est dû à la destruction d'une partie du réticulum): de larges vacuoles apparaissent et le REG peut paraître "mou".



Figure 9.

Représentation schématique des cellules neurosécrétrices et de leurs zones neurohémales, pour les cellules jaune clair (d'après WENDELAAR BONGA, 1970).

Abréviations. BS: espace hémolympatique. BV: vaisseau hémolympatique de grandes dimensions. CAP: capillaire hémolympatique. E: endothélium. FGL: cellule gliale filamenteuse. GA: ganglion. G: cellule granuleuse. GL: cellule gliale formant le trophospongium. M: fibre musculaire. N: nerf avec des terminaisons d'axone neurosécréteur à la périphérie. NS: cellules neurosécrétrices. NT: neurones neurotransmetteurs. SN: petit nerf dans la périnèvre. ax: axones. bl: membrane basale. cy: cytosomes. er: REG. ga: appareil de Golgi. hd: héli-desmosomes. nu: noyau. mi: mitochondries. r: site de relarguage à l'extrémité d'un axone neurosécréteur. Axones des cellules colorées en vert jaunâtre (1), en jaune clair (2) ou en jaune (3). Axone avec des granules neurosécrétoires (4).

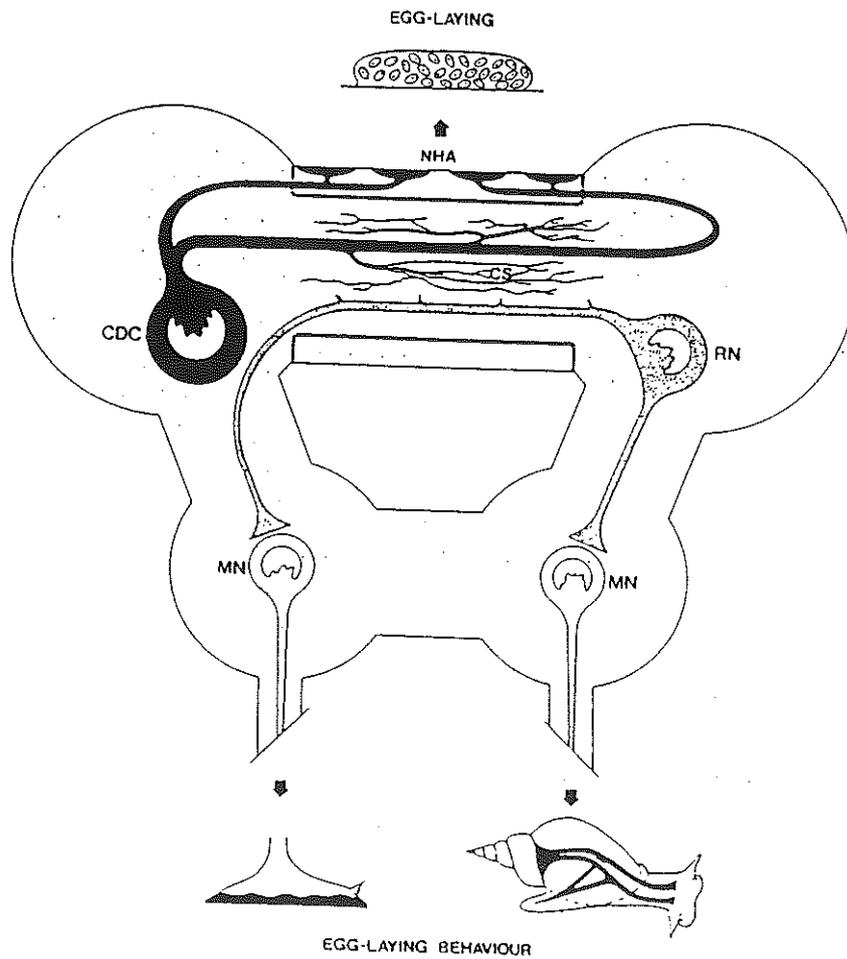


Figure 10.
 Contrôle de la ponte et de l'oviposition par les cellules caudo-dorsales chez *L. stagnalis*
 (d'après JONG-BRINK, 1990).

Abréviations. CDC: cellules caudo-dorsales. CS: système collatéral. MN: motoneurone.
 NHA: zone neuro-hémale. RN: ring neurone.

C. RÔLE DE LA NEUROSECRETION DANS LA PHYSIOLOGIE DU MOLLUSQUE.

Ce rôle a été étudié essentiellement dans le cadre de la régulation de l'activité reproductrice femelle.

Trois centres sont impliqués dans le contrôle de cette activité, à savoir les corps latéro-dorsaux et médio-dorsaux, les cellules caudo-dorsales et les lobes latéraux.

Les cellules des corps latéro-dorsaux et médio-dorsaux produisent une hormone qui stimule le développement et la croissance des ovocytes. C'est la DBH (hormone du corps dorsal). Les cellules cibles de ce produit sont les cellules péri-folliculaires entourant les ovocytes. *In vivo*, le système adénylate cyclase-AMPC de ces cellules folliculaires est activé dans les 45 minutes, voire dans les 2 à 3 heures qui suivent l'ovulation et ce processus est vraisemblablement dû à la DBH.

Les neuropeptides produits par les cellules caudo-dorsales contrôlent la ponte des limnées. Ces cellules sont réparties a) en un groupe de 25 éléments environ dans le ganglion cérébroïde gauche, et b) en un deuxième groupe de 75 cellules dans le ganglion droit. Toutes ces cellules sont reliées électriquement entre elles au sein de chaque groupe. A la périphérie de la commissure intercérébrale, se trouve l'aire neuro-hémale où les axones de ces cellules vont libérer le matériel sécrété. Les peptides ainsi libérés dans l'hémolymphe agissent sur les glandes sexuelles et induisent le développement des ovocytes, l'ovulation, la formation des "paquets d'oeufs" et l'oviposition. A côté de ce phénomène, il existe des "relargages" non synaptiques. Ceux-ci contrôlent la ponte en agissant sur l'activité d'un neurone impair, localisé dans le ganglion cérébroïde droit, le "ring neurone". Ce dernier régule les motoneurones pédieux impliqués dans le contrôle de la locomotion. Un schéma simplifié du contrôle de la ponte par les cellules caudo-dorsales est indiqué sur la figure 10.

Sur le plan biochimique, les peptides relargués lors d'une décharge du système caudo-dorsal proviendraient d'un précurseur. Ce dernier serait à l'origine de trois peptides intermédiaires qui seraient transformés en produits terminaux, lesquels sont relargués dans l'hémolymphe. Deux de ces peptides sont actuellement connus, l'hormone des cellules caudo-dorsales (CDCH) et la calfluxine. Cette dernière substance stimule l'entrée du calcium dans les mitochondries au niveau des cellules sécrétrices de la glande de l'albumine.

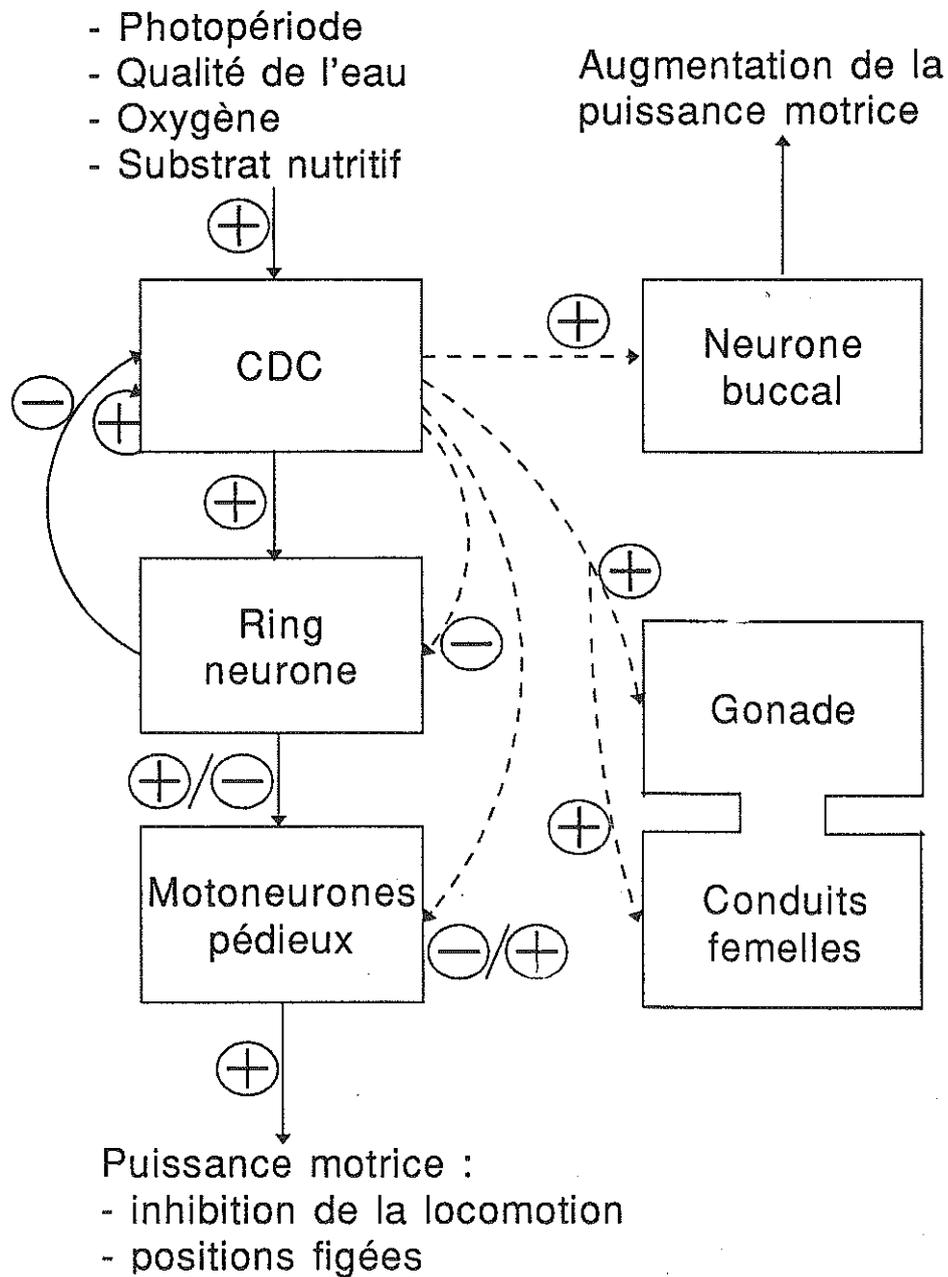


Figure 11.
 Organisation de la ponte chez *L. stagnalis*
 (d'après JONG-BRINK, 1990).
 Les flèches continues correspondent à la ponte
 et celles en pointillés, aux voies neuronales.

Aujourd'hui, on pense que l'hormone CDCH ne serait pas uniquement produite par les cellules caudo-dorsales mais également par d'autres neurones (neurones CDC-like) localisés dans les ganglions cérébraux, pleuraux, pédieux et viscéraux. L'identité et les fonctions de ces autres CDC-peptides ne sont pas encore connues. On admet cependant qu'ils jouent un rôle dans le phénomène complexe de la ponte.

Toutes les données sont résumées dans la figure 11.

Les lobes latéraux participent également à la régulation de l'activité reproductrice masculine et féminine. Les cellules de ces lobes produisent une ou plusieurs hormones qui accélèrent le développement de l'appareil reproducteur chez les individus immatures et stimulent l'oviposition chez ceux qui sont matures. Elles sont également impliquées indirectement dans la régulation de la croissance mais la présence d'hormone de croissance produite par les cellules d'un vert brillant est alors nécessaire. La synthèse et le relargage de cette hormone sont activés chez les individus dépourvus de lobes latéraux alors que l'activité reproductrice est diminuée. Ce sont donc des processus antagonistes et on suppose que les lobes latéraux jouent un rôle dans la coordination.

D. NOTIONS D'ÉLECTROPHYSIOLOGIE.

1. Généralités.

La plupart des données présentées dans ce paragraphe proviennent d'un article de BOER et JOOSSE (1975). Elles ont été complétées par des observations provenant d'articles récents.

Les acquisitions sur la physiologie des cellules nerveuses reposent sur des techniques d'enregistrement intra-cellulaires. Les neurones géants de mollusques conviennent très bien pour ce type d'étude. Après leur isolement par des méthodes enzymatiques et/ou mécaniques, les cellules sont capables de survivre *in vitro* pendant deux semaines durant lesquelles leurs caractéristiques morphologiques et physiologiques sont pratiquement celles d'une cellule intacte.

Les paramètres électriques sont mesurés grâce à la mise en place de micro-électrodes dans les neurones. Cette technique permet d'analyser les facteurs participant au potentiel de repos et au potentiel d'action. Ces paramètres sont souvent étudiés en deux temps, après

l'isolement des cellules et au cours de leur survie *in vitro* (KOSTENKO, 1974). L'élasticité de la membrane neuronale permet aux électrodes d'être insérées plusieurs fois sans qu'il n'y ait de changement dans les potentiels d'action.

2. Potentiels d'action.

Le potentiel d'action des neurones de mollusques résulte d'un courant ionique. Au repos, la membrane nerveuse est perméable au potassium de sorte que le potentiel de membrane prend une valeur proche du potentiel d'équilibre pour le potassium. Si on pratique une stimulation dépolarisante de la membrane, la perméabilité de celle-ci aux ions sodium augmente rapidement. Les ions entrent et le potentiel s'inverse.

A côté de ce mécanisme classique sodique, un mécanisme calcique de régénération des potentiels d'action est également possible. Pour d'autres neurones, ce serait même une action combinée de ces deux ions qui serait à l'origine du potentiel d'action. JUNGE (1967) parle "de potentiel d'action multiionique" dans les neurones géants de mollusques. La phase descendante du potentiel d'action est due à une diminution de la perméabilité membranaire aux ions sodium tandis que la perméabilité aux ions potassium augmente ("flux sortant de potassium").

Un échange rapide d'ions potassium entre le milieu externe et le liquide extraneuronal a été mis en évidence par SATELLE (1973) par une diffusion à travers des canaux extracellulaires. Pour maintenir une excitabilité constante, il existe une pompe sodium-potassium qui exclut le sodium et absorbe les ions potassium. GORMAN et MARMOR (1970) ont montré, de plus, que la dépolarisation de la membrane est d'autant plus importante que la température augmente. Cette dépolarisation n'a pas lieu si on remplace les ions sodium du milieu extérieur par des cations non perméables mais elle se produit si on utilise des ions lithium. Si l'activité de la pompe sodium-potassium n'est pas bloquée, le "réchauffement" de la cellule produit une hyperpolarisation rapide en relation avec l'action de cette pompe.

3. Contrôle de la régénération.

La régénération neuronale est contrôlée par des systèmes intracellulaires intervenant dans la régulation du calcium. La croissance neuronale dépend à la fois de la concentration en calcium et du pH. En effet, la réalisation de ce processus nécessite une concentration en calcium et un pH intracellulaire relativement bas. Une augmentation

artificielle de la concentration en calcium intracellulaire au début de la culture inhibe complètement la croissance neuronale. Quand cela se produit au 3^e ou au 5^e jour de culture, les dendrites déjà formés se rétractent.

Un taux élevé de potassium dans le milieu nutritif préserve les neurones de la lyse, prolonge le temps de survie en culture et inhibe la formation neuronale. Cet effet d'un taux élevé de potassium sur la survie et les capacités de formation neuronale n'est pas dû à la dépolarisation membranaire mais semble être en rapport avec l'homéostasie ionique intracellulaire.

III. - COMMENTAIRES.

Les données présentées dans les paragraphes précédents peuvent se résumer de la manière suivante:

- Le système nerveux de *L. stagnalis* est formé par un ensemble de ganglions réunis en plusieurs colliers. Ces ganglions sont riches en cellules neurosécrétrices appartenant à plusieurs types.

- Les cellules des ganglions cérébroïdes ont été particulièrement étudiées par les auteurs hollandais. Ces derniers ont fourni une classification des divers types et en ont détaillé la structure et l'ultrastructure.

- Le rôle de la neurosécrétion a été approfondi pour trois groupes cellulaires des ganglions cérébroïdes (cellules caudo-dorsales, médio-dorsales et des lobes latéraux). La fonction des autres groupes cellulaires a été peu étudiée.

- L'impact des produits relargués par les trois groupes précités se situe au niveau de l'activité reproductrice femelle. Des observations ont cependant été rapportées sur l'activité mâle.

La revue de la littérature montre que les ganglions nerveux de cette limnée sont bien étudiés. La disposition topographique des différentes cellules, leur structure et leur rôle neurosécrétoire ont fait l'objet de nombreux rapports. Plusieurs faits justifient l'intérêt de ces auteurs pour cette limnée:

- La maintenance de cette limnée est très facile dans les conditions du laboratoire. Un simple élevage en aquarium en circuit fermé ou en bac ouvert suffit pour leur assurer une survie parfaite avec peu de pertes comme l'ont souligné VAN DER STEEN *et al.* (1969).
- La Limnée d'étang est l'un des plus grands mollusques d'eau douce, avec une hauteur de 6,5 cm parfois à l'état adulte. Comme *B. glabrata* et *Aplysia californica*, cette taille permet une dissection facile et, par suite, le prélèvement aisé des organes et tissus nécessaires pour les études expérimentales.
- Les cellules nerveuses de cette espèce sont de grande taille, ce qui permet l'implantation de microélectrodes pour les études électrophysiologiques. Ces dernières sont nombreuses et sont encore largement développées à l'heure actuelle.
- Ces cellules gardent leurs caractéristiques "normales" pendant plusieurs jours lorsqu'elles ont subi un traitement enzymatique et/ou mécanique.

Toutes les données que nous avons rapportées ci-dessus permettent de retenir la Limnée d'étang comme modèle pour effectuer des cultures de neurones de Mollusque. Il faut d'ailleurs remarquer que cet embranchement est largement utilisé pour les investigations *in vitro* (TOWNSEL et THOMAS, 1987). Comme les neurones de *L. stagnalis* sont bien connus à l'heure actuelle, nous avons réalisé des expériences sur ces derniers afin de pouvoir suivre leur survie et leur comportement dans les conditions *in vitro* selon les indications fournies par les auteurs qui ont travaillé précédemment sur le sujet.

LA CULTURE DES NEURONES

CHEZ *L. stagnalis*.

Le but de cette expérimentation est de vérifier si des molluscicides ont une action sur les neurones du mollusque cible. Pour cela, il était utile de mettre au point une technique pour la culture *in vitro* de ces éléments en s'inspirant de travaux déjà parus sur ce point (WONG *et al.*, 1981, 1983, 1984; GRIMM-JORGENSEN, 1987). Le présent chapitre résume les premiers résultats que nous avons obtenus au cours d'un stage de recherche.

Après un exposé succinct sur le matériel animal, le protocole expérimental et la méthodologie que nous avons utilisés au cours de ce travail, nous présenterons les principaux résultats avant de les commenter par rapport à la bibliographie.

I. - MATERIEL ET METHODES.

A. LE MOLLUSQUE.

Les *L. stagnalis* proviennent d'une population naturelle qui vit communément dans une mare, au lieu-dit "La Fosse aux Poissons Rouges" sur la commune de Thenay (Indre). La planche A montre une photographie de cette station.

Située à proximité des "Marots", cette fosse est peuplée par *Lymnaea palustris* et *Physa acuta* en plus de la Limnée d'étang. L'eau est eucalcique avec un pH de 7,2 et une concentration en ions calcium dissous voisine de 70 mg/l.



Planche A.
La "Fosse aux Poissons Rouges", commune de Thenay (Indre).
Les *L. stagnalis* ont été récoltées dans la zone située
à proximité de la route (flèche).

Les animaux sont récoltés régulièrement toutes les trois semaines à l'aide d'un filet troubleau, par des mouvements rotatifs réguliers. Dans le cadre de cette étude, nous avons conservé les animaux adultes, avec une hauteur de coquille supérieure à 35 mm et un poids moyen de 2 grammes. Les limnées sont transportées dans des conditions isothermes, dans une atmosphère humide jusqu'au laboratoire. Elles sont alors placées dans des bacs d'élevage standard (marque Allibert) de 0,66 m² de superficie pendant 8-15 jours à raison de 15 par récipient (pour 8 litres d'eau).

L'eau utilisée provient d'une source voisine, située dans le bourg de Thenay. Toutes les semaines, nous avons renouvelé les deux-tiers de l'eau présente dans les récipients. De plus, les fécès présentes dans le milieu sont enlevées chaque semaine grâce à une pompe à vide en prenant soin d'épargner les pontes présentes. Les animaux sont nourris deux fois par semaine avec de la salade en abondance.

Le nombre d'animaux utilisés au cours de nos expériences est de 150. Ils appartiennent tous à la même génération annuelle.

B. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

Nous avons opéré en deux temps. Ces derniers dérivent de la technique utilisée par WONG *et al.* (1981, 1983, 1984) et par GRIMM-JORGENSEN (1987).

1. Premier temps.

Neuf animaux sont choisis pour l'expérimentation. Ils sont d'abord pesés afin de connaître leur poids frais. La coquille est ensuite enlevée à l'aide de pinces fines et l'animal *in toto* est lavé dans les milieux suivants:

- a) milieu salin¹ (pH 7,5-7,8) composé de 55 mOsm de NaCl, 4 mOsm de CaCl₂, 2 mOsm de MgCl₂, 2 mOsm de KCl, 4 mOsm de tampon TRIS (tris(hydroxyméthyl)amino-méthane) avec 25 % de listérine (Warner-Lambert Pharmaceutical Co.) pendant 15 min.

¹ - Les différentes solutions utilisées pour la préparation des milieux sont stérilisées par passage sur un filtre Millipore avec des pores de 0,22 µm de diamètre.



Planche B.
Vue générale de la salle de culture.

- b) solution antibiotique saline, composée du milieu précité avec des antibiotiques (100 U.I. de pénicilline G par ml, 100 mg.l⁻¹ de streptomycine et 250 mg.l⁻¹ d'amphotéricine B) pendant 20 min.

La dissection de chaque animal est réalisée dans un nouveau bain de solution antibiotique saline. On opère une incision à la face supérieure en coupant d'abord le manteau, puis les tissus sous-jacents jusqu'à l'observation de l'oesophage, entouré du collier ganglionnaire. Le collier est extrait et rincé pendant 15 min dans un nouveau bain de solution antibiotique saline. Il est ensuite placé dans une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre, poly-L-lysinée, avec deux autres cerveaux provenant de congénères et 2 ml de milieu de LEIBOWITZ L15 (FERGUSON et AUDESIRK, 1990) pendant 3 jours à 20° C sous une hotte à flux laminaire (Planche B). Ce milieu de LEIBOWITZ conditionné est indispensable à la survie des neurones car il contient des substances libérées par ces cellules.

2. Deuxième temps.

Une dissection est réalisée sur neuf autres limnées en adoptant le protocole présenté ci-dessus jusqu'au rinçage inclus. On opère ensuite:

- une dissociation enzymatique des cellules nerveuses à l'aide de la pronase E (à 0,5 % dans un bain de solution saline stérile, sans antibiotique) pendant 2 min. Deux rinçages de 10 minutes chacun sont ensuite opérés dans le milieu antibiotique salin avant de soumettre les cellules à la trypsine (à 0,1 % dans le milieu antibiotique salin) pendant 15 minutes. Les explants sont ensuite plongés dans une solution d'antitrypsine Sigma (à 0,1 % dans le milieu précité) pendant 7,5 minutes.

- une dissociation mécanique après la séparation des neuf "cerveaux" en trois groupes de trois. Les chaînes ganglionnaires correspondantes sont soumises à des pipetages répétés (50 en 5 minutes) à l'aide de pipettes Pasteur stériles dans du milieu de LEIBOWITZ stérilisé par ultra-filtration et sont placées dans des cuves avant d'être centrifugées pendant 10 min à 2000 tours/min. Le culot est ensuite repris dans le milieu de LEIBOWITZ conditionné (1 ml par cuve à 20° C), agité de façon circulaire pendant quelques secondes et déposé dans une boîte de Pétri poly-L-lysinée.

Les boîtes sont ensuite laissées dans une enceinte thermostatée à 20° C pendant 72 heures. Une première observation est alors réalisée au microscope inversé (Nikon) pour

Catégorie	Composante	Concentration en g/l
Sels inorganiques	CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,185
	MgCl ₂ , 6 H ₂ O	0,200
	MgSO ₄ anhydre	0,09767
	KCl	0,400
	KH ₂ PO ₄ anhydre	0,060
	NaCl	8,000
	Na ₂ HPO ₄ anhydre	0,190
Acides aminés	DL-alanine	0,450
	L-arginine (base libre)	0,500
	L-asparagine anhydre	0,250
	L-cystéine (base libre)	0,120
	L-glutamine	0,300
	L-glycine (base libre)	0,200
	L-histidine (base libre)	0,250
	DL-isoleucine	0,250
	L-leucine	0,125
	L-lysine (base libre)	0,075
	DL-méthionine	0,150
	DL-phénylalanine	0,250
	L-sérine	0,200
	DL-thréonine	0,600
L-tryptophane	0,020	
L-tyrosine (base libre)	0,300	
DL-valine	0,200	
Vitamines	Chlorure de choline	0,001
	Mononucléotide de flavine (sodium)	0,0001
	Acide folique	0,001
	Myo-inositol	0,002
	Niacinamide	0,001
	Acide D-panthothénique (calcium)	0,001
	Pyridoxine (HCl)	0,001
Monophosphate de thiamine (HCl)	0,001	
Autres produits	D-galactose	0,900
	Rouge phénol (sodique)	0,011
	Acide pyruvique (sodique)	0,550
Ajouter	Bicarbonate de sodium	N/A
Caractéristiques	pH à 25° C (sans bicarbonate de sodium)	8,1 ± 0,3
	pH à 25° C (avec bicarbonate)	N/A
	Osmolalité (mOsm/kg H ₂ O) sans bicarbonate de sodium	320 ± 5 %
	Osmolalité avec bicarbonate	N/A
	Grammes de poudre pour préparer 1 l de solution	14,8

Tableau XII.
Produits entrant dans la composition du milieu de LEIBOWITZ
et leur concentration (d'après SIGMA, 1992).

déterminer leur vitalité. Par la suite, on opère une surveillance journalière pendant 4 jours. Le milieu n'est pas renouvelé au cours de l'expérimentation.

C. MÉTHODOLOGIE.

Plusieurs méthodes ont été utilisées au cours de cette expérimentation.

1. Technique de dissection de l'animal.

L'animal est disséqué vivant dans le milieu antibiotique salin. Le manteau est incisé à la face supérieure et les deux parties sont maintenues entrouvertes à l'aide de minuties stérilisées, fixées dans un support Depron préalablement lavé dans une solution antiseptique RBS pendant 30 minutes, rincé à l'eau distillée et séché à l'étuve à 50° C pendant 2 heures. Les tissus sous-jacents sont ensuite découpés à l'aide de pinces de Panzer-Wolff et le collier ganglionnaire est extrait après l'ablation de l'oesophage et des nerfs périphériques.

2. Préparation des boîtes de Pétri.

Des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Falcon) sont préparées en ajoutant 2 ml de poly-L-lysine (Sigma, type 6) à 1 % dans le tampon TRIS par récipient. Elles sont placées ensuite dans une étuve à 37° C pendant 1 heure avant d'être rincées deux fois de suite (pendant 2 x 15 min) par la solution antibiotique saline.

Cette solution de poly-L-lysine a été fractionnée. Les aliquots sont conservés au congélateur jusqu'à leur emploi.

3. Milieu utilisé.

Le milieu de LEIBOWITZ L15 est complexe. Le tableau XII en donne la composition. Il contient des sels en solution, différents acides aminés et des glucides simples.

Nous n'avons pas opéré de modification dans la composition chimique de ce milieu.

D. PARAMETRES UTILISES.

Ils sont basés sur la morphologie des cellules. Nous avons apprécié la morphologie externe des neurones, leur coloration *in vitro* et l'aspect des organites intra-cytoplasmiques.

Les neurones vivants se reconnaissent à leur adhésion ferme sur le fond de la boîte de culture et à leur coloration jaune. Ils présentent souvent un prolongement axonal. Les cellules mortes ou en voie de l'être sont brunes et vacuolisées.

E. EXPRESSION DES RÉSULTATS.

Nous avons présenté sur les planches C et D des exemples caractéristiques de neurones après une culture de 4 jours dans le milieu de LEIBOWITZ.

Les deux premières photographies se rapportent à des cellules prises sur fond clair. Les deux autres concernent des neurones photographiés en contraste de phase.

II. - OBSERVATIONS PERSONNELLES SUR LA MÉTHODOLOGIE.

Plusieurs difficultés sont apparues au cours de la mise au point de notre technique. Elles se sont traduites par une dégénérescence neuronale en 24 heures ou moins.

La dégénérescence des neurones peut être due à plusieurs facteurs:

* le pH. Comme nous l'avons déjà signalé, le pH du milieu doit être compris entre 7,5 et 7,8. Les premiers essais ont été réalisés sur des milieux avec un pH 7,3 et la mise en culture des neurones s'est traduite par une lyse précoce des cellules.

* la présence de bactéries dans le milieu. Comme la technique comporte un certain nombre d'étapes (voir le protocole expérimental), il nous a semblé nécessaire de rechercher l'étape au cours de laquelle les microorganismes ont contaminé le milieu.

Chaque bain utilisé au cours de la manipulation a fait l'objet d'une recherche de bactéries. Cette dernière est réalisée sur une gélose au malt et l'ensemencement est effectué par l'inondation de la gélose avec une partie du bain à étudier. Les essais ont montré que les bactéries provenaient du milieu LL15 contaminé lors de sa préparation.

Pour remédier à ce problème, nous avons filtré le milieu sur membrane stérile. Ce dernier a été ensuite fractionné en de petites quantités (6 ml) et celles-ci ont été réparties dans des flacons entourés de papier aluminium, préalablement stérilisés à l'autoclave à 120° C pendant 20 minutes.

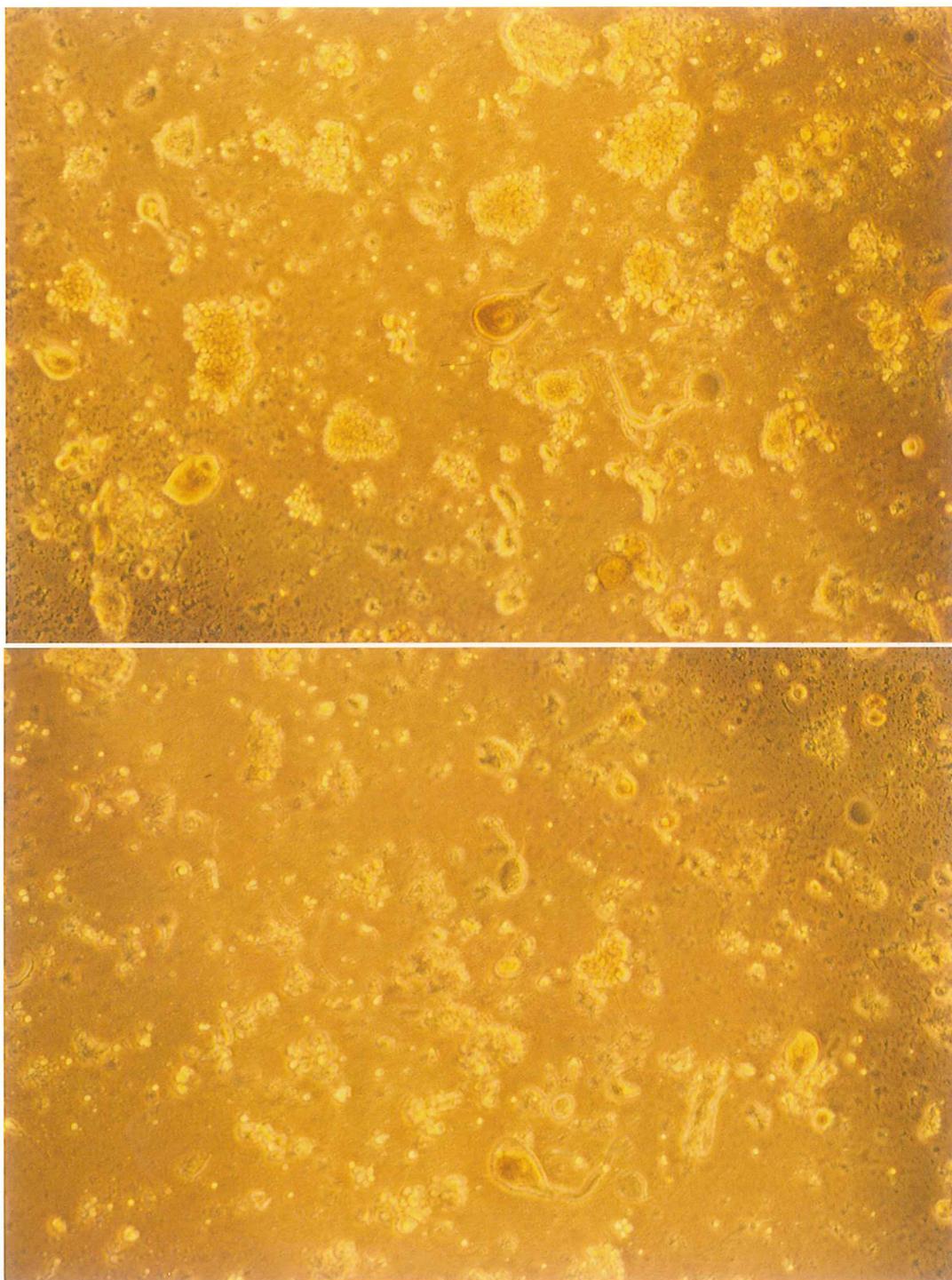


Planche C.

Neurones de *L. stagnalis* au 4^e jour de culture à 20° C.

- Cellules démunies souvent de leurs axones (n° 1).
- Neurone avec un axone replié (n° 2).

Grossissement: x 430.

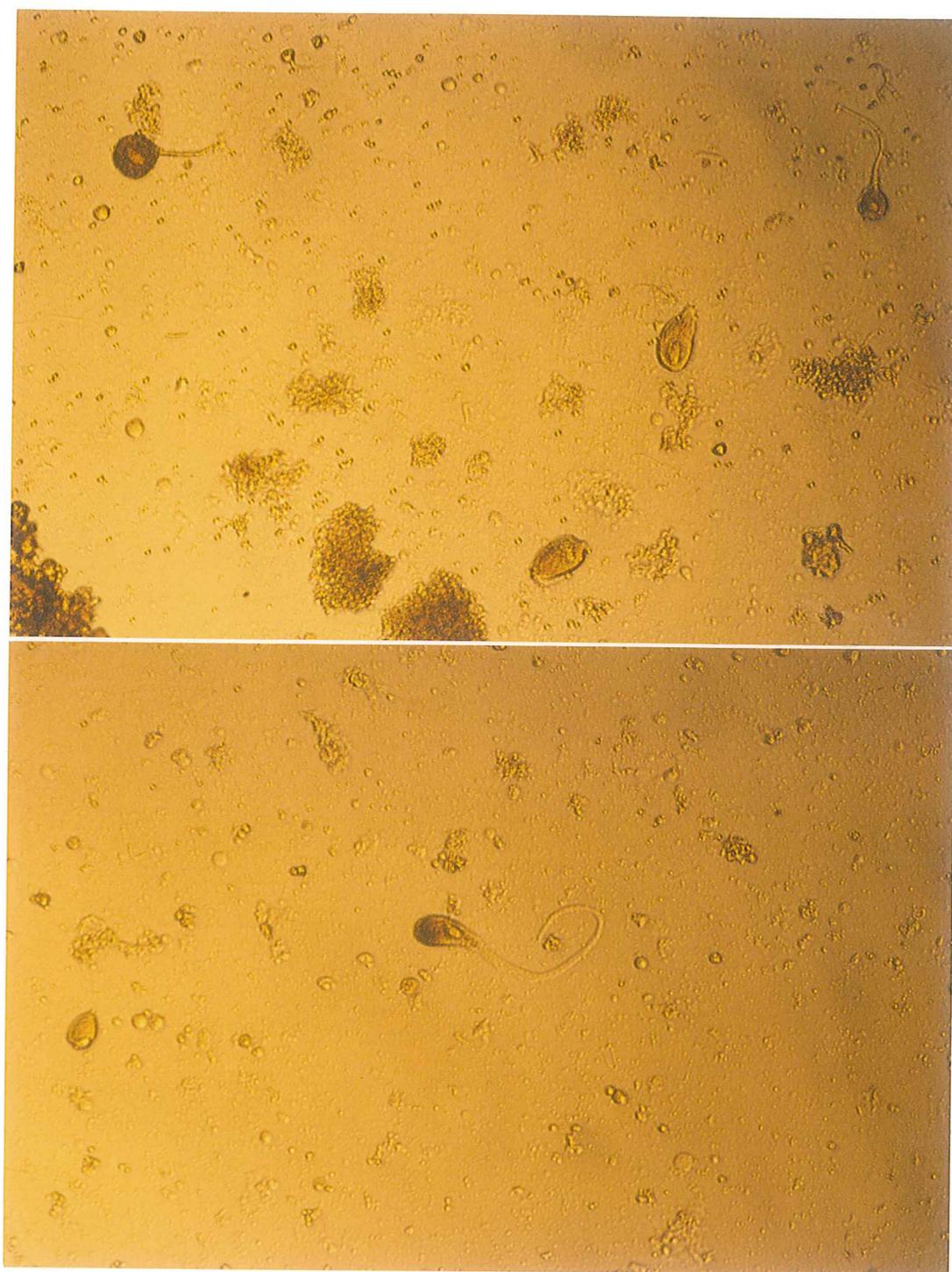


Planche D.
Neurones de *L. stagnalis* au 4^e jour de culture, à 20° C
observés en contraste de phase (n° 1 et n° 2).
Le neurone de la photographie n° 2 est replié sur lui-même.
Grossissement: x 430.

* la présence de boîtes de Pétri contaminées par des bactéries alors que les autres restent stériles. Ce problème n'a pas reçu d'explication satisfaisante. Les limnées utilisées pour les expériences ne sont pas stériles au départ et nous rapportons cet incident à ce facteur.

* les ultra-violets. L'action de ces rayons est nécessaire à la stérilisation de la salle de culture mais elle serait responsable d'altérations au niveau des tissus ou cellules cultivés. Pour éviter de tels dommages, nous avons recouvert les boîtes de Pétri d'un matériel opaque lorsqu'elles sont laissées à température ambiante, sous la hotte à flux laminaire.

* la solution de trypsine utilisée pour l'isolement des neurones. WONG et al. (1981, 1983) préconisent un traitement trypsique de 60 à 90 min, puis l'anti-trypsine pendant 15 min. Nous avons utilisé des temps beaucoup plus courts (15 min pour la trypsine, 7,5 min pour l'anti-trypsine).

III. - LA SURVIE DES NEURONES.

Les planches C et D montrent les résultats que nous avons obtenus avec cette technique de culture.

La majorité des cellules ont un axone de faible longueur; ce dernier est parfois replié sur lui-même comme le montre la planche D, n° 2. Certains neurones sont dépourvus d'axone (Planche C, n° 1).

Ces cellules ont une morphologie "normale" au bout du 4ème jour de culture. Les photographies en contraste de phase confirment cet aspect (Planche D).

Par contre, nous n'avons pas noté d'élaboration de dendrites à partir des péricaryons, ni de collatérales à partir de l'axone. Ce dernier point est à rapporter à la durée brève de l'expérimentation (4 jours).

IV. - COMMENTAIRES.

Les résultats présentés dans les paragraphes précédents montrent que la technique de culture basée sur le milieu de LEIBOWITZ permet la survie des neurones pour *L. stagnalis*. Cependant, nous n'avons pas observé l'apparition de prolongements à la différence de ce que

d'autres auteurs comme WONG *et al.* (1981, 1983), GRIMM-JORGENSEN (1987) ont rapporté dans leurs travaux.

Pour expliquer ce résultat négatif, nous avons émis des hypothèses sur les points suivants:

- la dissociation des cellules par voie enzymatique et mécanique. L'action des enzymes sur l'isolement des neurones est d'ailleurs abandonnée à l'heure actuelle par certains auteurs comme MOED *et al.* (1989). Ces derniers préfèrent l'isolement mécanique par pipetages répétés mais d'autres problèmes se posent alors comme le diamètre des pipettes (0,5 à 1 mm, KOSTENKO *et al.*, 1974), le volume de liquide présent dans celles-ci (< à 50 μ l, KOSTENKO *et al.*, 1974; 20 μ l, MOED *et al.*, 1989) et la vitesse de pipetage qui doit être lente (MOED *et al.*, 1989). Le non respect de ces données se traduit par la survenue de dommages au niveau des cellules. Comme nous avons utilisé les deux méthodes de manière successive, il est possible que des altérations se soient développées au niveau de certains constituants cellulaires.

- l'âge de *L. stagnalis*. FERGUSON et AUDESIRK (1990) conseillent de prendre des *L. stagnalis* pesant 0,75 à 1,5 g. Comme le poids moyen de nos individus est de 2 g (page 59), il est possible que cet écart de poids soit responsable en partie de nos résultats.

- le nombre de neurones insuffisant. Un nombre minimum de neurones est nécessaire pour que l'élaboration des prolongements axonaux se fasse (SKAPER *et al.*, 1990). Le nombre de neurones rapporté pour les auteurs pour les Mollusques Pulmonés est compris entre 200 et 400 pour *Helisoma* (WONG *et al.*, 1981), de 600 pour *Physella* (GRIMM-JORGENSEN (1987)). Un nombre insuffisant de neurones dans le milieu pourrait expliquer nos résultats mais à notre avis, cette hypothèse ne doit pas être retenue en raison de la similitude de notre protocole avec celui utilisé par FERGUSON et AUDESIRK (3 chaînes ganglionnaires de *L. stagnalis* par boîte de Pétri avec 2 ml de milieu).

Des améliorations peuvent être apportées à la mise en culture pour les neurones de *L. stagnalis*. A notre avis, il serait utile de modifier les opérations suivantes:

- l'isolement des cellules par voie mécanique en tenant compte des indications fournies pour les pipettes par les auteurs précités.

- l'emploi de mollusques plus jeunes ne dépassant pas 1 cm de hauteur,
- l'emploi d'un milieu de LEIBOWITZ possédant une fraction saline modifiée.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le but de ce mémoire est de présenter l'expérimentation d'une technique de culture pour les neurones de *L. stagnalis* afin d'étudier les effets de certains molluscicides sur leur structure. Les résultats relatifs à ces essais sont précédés par des rappels sur les molluscicides, les milieux de culture utilisés pour les Mollusques Pulmonés dulçaquicoles, et les ganglions nerveux de *L. stagnalis*.

L'ensemble des données présentées dans ce mémoire peuvent être regroupées sous quatre rubriques.

Des rappels sur les molluscicides sont présentés dans le premier chapitre. Cette revue nous a permis de montrer qu'il n'y a pas de molluscicide idéal à ce jour. Deux types de substances sont actuellement utilisées, des molécules chimiquement définies et des substances d'origine végétale. En fait, la lutte chimique semble marquer le pas en raison des problèmes d'écotoxicité et des déséquilibres des biocénoses.

Bien que ces molécules chimiques soient très nombreuses (5 familles de produits), une seule substance est encore commercialisée, le Niclosamide (Bayluscide®). Il faut noter que les études faites sur les conséquences de l'utilisation à long terme de ces produits donnent des résultats contradictoires. Aujourd'hui, on préfère utiliser des substances d'origine végétale. En effet, des essais nombreux sur ce type de produit ont été réalisés et leur utilisation comme molluscicide semble pleine d'avenir.

Différents milieux de culture ont été utilisés pour plusieurs types de tissus aussi bien chez les Gastéropodes que pour les Bivalves et les Céphalopodes. Les neurones ont été les plus étudiés malgré leur survie limitée (2 semaines au maximum). La plupart des études réalisées sur ce matériel ont été faites sur le milieu liquide de LEIBOWITZ L15, quelques-unes sur le milieu semi-solide de GOMOT et GUYARD. La survie de ces neurones nécessite un conditionnement du milieu basé sur la présence de colliers ganglionnaires de limnée.

Le système nerveux de la Limnée d'étang comprend 11 ganglions. Chacun d'entre eux comporte des péricaryons en périphérie et les axones des neurones au centre. Différents types de cellules neurosécrétrices ont été décrits par les auteurs et le rôle de certains groupes dans la physiologie du mollusque a été élucidé. Ces neurones ont fait l'objet de nombreuses études ultrastructurales et électrophysiologiques.

Une expérimentation a été réalisée sur les neurones de cette espèce lors de cultures *in vitro* dans le milieu de LEIBOWITZ non modifié mais conditionné. Les cellules ont une morphologie normale au 4^e jour de culture mais il n'y a pas d'élaboration de prolongements axonaux. Plusieurs hypothèses de travail ont été formulées pour expliquer ces résultats.

Ce travail ne représente qu'une première étape dans le déroulement de nos recherches. Nous nous proposons d'aborder les points suivants au cours d'études ultérieures:

- déterminer l'impact du benzamido 2-nitro 5-thiazole et de ses dérivés sur les neurones de *L. stagnalis*,
- préciser leur mode d'action sur les constituants de ces cellules.

BIBLIOGRAPHIE

- ABDEL-RAHEEM, K., EL-GINDY, H., HASSAN, M.J., 1979.- Susceptibility of different body-sized *Bulinus truncatus* to molluscicidal action at two different temperatures. *Hydrobiologia*, **65**, 129-133.
- ABDEL-RAHEEM, K., EL-GINDY, H., AL HASSAN, J., 1980.- Interrelationship of molluscicidal concentration and temperature on the respiration of *Bulinus truncatus*. *Hydrobiologia*, **74**, 11-15.
- AMIN, M.A., 1972.- Large-scale assessment of the molluscicides copper sulphate and N-tritylmorpholine (Frescon) in the north group of the Gezira irrigated area, Sudan. *J. Trop. Med. Hyg.*, **75**, 169-175.
- AMIN, M.A., FENWICK, A., 1977.- The development of an annual regimen for blanket snail control on the Gezira irrigated area of the Sudan. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **71**, 205-212.
- AMIN, M.A., FENWICK, A., OSGERBY, J.M., WARLEY, A.P., WRIGHT, A.N., 1976.- A large-scale snail control trial with Trifenmorph in the Gezira irrigation scheme, Sudan. *Bull. W.H.O.*, **54**, 573-585.
- BABU, G.R., RAO, P.V., 1982.- Heavy metal ion toxicity in the freshwater gastropod snail host, *Lymnaea luteola*. *Ind. J. Physiol. Pharm.*, **26**, 141-146.
- BABU, G.R., RAO, P.V., 1985.- Effect of copper sulphate on respiration, electron transport and redox potential in the digestive gland of the snail host, *Lymnaea luteola*. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **34**, 396-402.
- BABU, G.R., RAO, P.V., 1987.- Effect of copper sulphate on α -ketoglutarate metabolism in the digestive gland of the snail host, *Lymnaea luteola*. *J. Environm. Pathol. Toxicol. Oncol.*, **7**, 29-34.

- BANNA, H.B.M., 1980.a.- Histochemical studies of some enzymes in the tissues of the schistosome vector snail *Bulinus truncatus* (Audouin) with special reference to the effects of a molluscicide. I. Dehydrogenases. *Histochem. J.*, **12**, 139-144.
- BANNA, H.B.M., 1980.b.- Histochemical studies of some enzymes in the tissues of the schistosome vector snail *Bulinus truncatus* (Audouin) with special reference to the effects of a molluscicide. II. Hydrolases. *Histochem. J.*, **12**, 145-152.
- BANNA, H.B.M., PLUMMER, J.M., 1978.- The effects of Frescon on molluscan hearts. *Comp. Biochem. Physiol.*, **61**, 33-36.
- BARKER, D.L., WONG, R.G., KATER, S.B., 1982.- Separate factors produced by the CNS of the snail *Helisoma* stimulate neurite outgrowth and choline metabolism in cultured neurons. *J. Neurosci. Res.*, **8**, 419-432.
- BARBOSA, F.S., COSTA, D.P., 1981.- A long term schistosomiasis control project with molluscicide in a rural area of Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **75**, 41-52.
- BARNISH, G., 1982.- Evaluation of chemotherapy in the control of *Schistosoma mansoni* in Marquis Valley, Saint Lucia. II. Biological results. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **31**, 111-115.
- BARNISH, G., CHRISTIE, J.D.; PRENTICE, M.A., 1980.- *Schistosoma mansoni* control in Cul de Sac Valley, Saint Lucia. I. A two-year focal surveillance-mollusciciding programme for the control of *Biomphalaria glabrata*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**, 488-492.
- BARNISH, G., JORDAN, P., BARTHOLOMEW, R.K., GRIST, E., 1982.- Routine focal mollusciciding after chemotherapy to control *Schistosoma mansoni* in Cul de Sac Valley, Saint Lucia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **76**, 602-609.
- BARNISH, G., PRENTICE, M.A., 1981.- Lack of resistance of the snail *Biomphalaria glabrata* after nine years of exposure to Bayluscide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75**, 106-107.
- BARNISH, G., STURROCK, R.F., 1973.- Letter : aerial application of a molluscicide to a marsh. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **67**, 610-611.
- BERDAN, R.C., HAUSER, G., BULLOCH, A.G.M., 1990.- Ultrastructure of an identified molluscan neuron in organ culture and cell culture following axotomy. *J. Comp. Neurol.*, **296**, 437-446.
- BOER, H.H., JOOSSE, J., 1975.- Endocrinology. In: "*Pulmonates. Vol. 1. Functional anatomy and physiology*", by FRETTER, V. and PEAKE, J. ed. Academic Press, London, 245-308.
- BORAY, J.C., 1969.- Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.*, **7**, 97-210.
- BOTTENSTEIN, J.E., 1985.- Growth and differentiation of neural cells in defined media. 3-43. In: "*Cell culture in the neurosciences*", by BOTTENSTEIN, J.E. and SATO, G. ed. Plenum Press, New-York.
- BREWSTER, F., NICHOLSON, B.L., 1979.- *In vitro* maintenance of amoebocytes from the American oyster (*Crassostrea virginica*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **36**, 461-467.

- BREZDEN, B.L., GARDNER, D.R., 1983a.- The effect of the molluscicide Frescon on smooth and cross-striated muscles of *Lymnaea stagnalis* and *Helix aspersa*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **20**, 259-268.
- BREZDEN, B.L., GARDNER, D.R., 1983b.- Calcium entry blockers inhibit contractures induced by the molluscicide Frescon in *Lymnaea stagnalis* smooth and cross-striated muscles. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **20**, 269-277.
- BREZDEN, B.L., GARDNER, D.R., 1983c.- Evidence that Frescon-induced contractures in *Lymnaea stagnalis* muscles do not depend on intracellular calcium stores : a comparison with caffeine action. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **20**, 278-285.
- BREZDEN, B.L., GARDNER, D.R., 1983d.- A comparison of the action of Frescon with calcium ionophore A23187. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **20**, 286-293.
- CHAUDHRY, M.A., MORGAN, E., 1986.- Circadian variation in the susceptibility of *Bulinus tropicus* to standard doses of molluscicides. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **80**, 261-263.
- CHRISTIE, J.D., PRENTICE, M.A., UPATHAM, E.S., BARNISH, G., 1978.- Laboratory and field trials of a slow-release copper molluscicide in St Lucia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **27**, 616-622.
- CORBETT, J.R., 1974.- *The biochemical mode of action of pesticides*. Academic Press, Londres/New-York, 330 p.
- COUSSERANS, F., 1977.- Recherches sur la culture de cellules de Mollusques marins. *Haliotis*, **8**, 321-337.
- DAFFALLA, A.M., AMIN, M.A., 1976.- Laboratory and field evaluation of the molluscicidal properties of *habat-el-mollok* (*Croton* sp.). *East Afr. J. Med. Res.*, **3**, 185-195.
- DAFFALLA, A.A.R., DUNCAN, J., 1979.- The relative susceptibility of two field collections of *Bulinus truncatus* (Audouin) to Trifenmorph. *Pestic. Sci.*, **10**, 423-428.
- DOSSAJI, S.F., KAIRU, M.J., GONDWE, A.T., OUMA, J.H., 1977.- On the evaluation of the molluscicidal properties of *Polygonum senegalense* forma *senegalense*. *Lloydia*, **40**, 290-293.
- DUFOUR, I., 1989.- Impact de l'utilisation de molluscicides sur la croissance d'*Euglena gracilis* (Klebs) *in vitro*. *Thèse Doct. Pharmacie*, Limoges, n° 327, 115 p.
- DUKE, B.O., MOORE, P.J., 1976.- The use of a molluscicide in conjunction with chemotherapy to control *Schistosoma haematobium* at the Barombi lake foci in Cameroon. I. The attack on the snail hosts, using N-trityl-morpholine, and the effect on transmission from snail to man. *Tropenmed. Parasitol.*, **27**, 297-313.
- DUNCAN, J., BROWN, N., 1983.- Chronic exposure of the eggs and adults of *Biomphalaria glabrata* (Say) to the molluscicide, Nicotinanilide. *Tropenmed. Parasitol.*, **34**, 184-186.
- DUNLOP, R.W., DUNCAN, J., AYREY, G., 1980.- Quantitative structure-activity relationships for nicotinanilide molluscicides. *Pestic. Sci.*, **11**, 53-60.

- DURCHON, M., SCHALLER, F., 1963.- Application de la méthode de culture organotypique aux recherches endocrinologiques chez les Annélides Polychètes. *C.R. Acad. Sci., D*, **256**, 5615-5617.
- EAGLE, H., 1959.- Amino-acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, **130**, 432-437.
- EL-FIKI, S.A., MOHAMED, A.M., 1978.- Effect of some herbicides on the toxicity of certain molluscicides against *Biomphalaria alexandrina* snails. *Egypt. J. Bilharz.*, **5**, 91-100.
- EL-GINDY, H.I., 1975a.- Mollutox and Bayer 73 as molluscicides against *Bulinus truncatus* and *Biomphalaria alexandrina*. *Egypt. J. Bilharz.*, **2**, 213-220.
- EL-GINDY, H.I., 1975b.- A comparative study on the effect of repeated application of Bayer 73 and Mollutox on *Biomphalaria alexandrina*. *J. Egypt. Med. Assoc.*, **58**, 313-323.
- ESCLAIRE, F., 1990.- Contribution à l'étude de la neurosécrétion chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller infesté par *Fasciola hepatica* L. *Mémoire, D.E.A. Ecol. Terr. Limn.*, Toulouse, 75 p.
- EUZEBY, J., 1971.- *Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine*. Tome II. Maladies dues aux Plathelminthes. 2ème fasc.: Trématodes. Livre 1. Généralités. Distomatoses hépato-biliaires. Vigot frères éd., Paris, 798 p.
- FERGUSON, C.A., AUDESIRK, G., 1990.- Effects of DDT and Permethrin on neurite growth in cultured neurons of chick embryo brain and *Lymnaea stagnalis*. *Toxic. in Vitro*, **4**, 25-30.
- FEST, C., SCHMIDT, K.J., 1973.- *The chemistry of organophosphorus pesticides*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 339 p.
- GABE, M., 1967.- *Techniques histologiques*. Masson et Cie éd., Paris, 1118 p.
- GAYRAL, P., CAVIER, R., 1977.- Actualité et perspectives d'avenir des molluscicides. In : "Actualité en Chimie Thérapeutique", 5^e série. Société de Chimie Thérapeutique éd., Paris, 177-209.
- GERMAIN, L., 1969.- *Mollusques terrestres et fluviatiles*. Faune de France, n° 21 et 22. Kraus Reprint éd., Nendeln (Liechtenstein), 897 p.
- GILBERT, B., CASTLETON, C., BULHOES, M.S., 1973a.- Molluscicidal activity of Trifenmorph in field trials. *Bull. W.H.O.*, **49**, 377-379.
- GILBERT, B., PAESLEME, L.A., FERREIRA, A.M., BULHOES, M.S., 1973b.- Field tests of hexa-butyldistannoxane (TBTO) in slow-release formulations against *Biomphalaria* spp. *Bull. W.H.O.*, **49**, 633-636.
- GILLES, H.M., ZAKI, A.A.A., SOUSSA, M.H., SAMAAAN, S.A., SOLIMAN, S.S., HASSAN, A., BARBOSA, F.S., 1973.- Results of a seven year snail control project on the endemicity of *Schistosoma haematobium* infection in Egypt. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **67**, 45-65.
- GODAN, D., 1979.- *Schadschnecken und ihre Bekämpfung*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 467 p.

- GOMOT, L., 1973.- Etude du fonctionnement de l'appareil génital mâle de l'escargot *Helix aspersa* par la méthode des cultures d'organes. *Arch. Anat. Hist. Embr. Norm. Exp.*, **56**, 131-160.
- GOMOT, L., COURTOT, A.M., 1979.- Etude en culture *in vitro* du contrôle endocrine de la glande à albumen chez l'escargot *Helix aspersa*. *Malacologia*, **18**, 361-367.
- GOMOT, L., GUYARD, A., 1964.- Evolution en culture *in vitro* de la glande hermaphrodite de jeunes escargots de l'espèce *Helix aspersa* Müller. *C.R. Acad. Sci., D*, **258**, 2902-2905.
- GOODMAN, L.S., GILMAN, A., 1985.- *The pharmacological basis of therapeutics*. MacMillan, New-York, 7^e éd., 1189 p.
- GORMAN, A.L.F., MARMOR, M.F., 1970.- Temperature dependence of the sodium-potassium permeability ratio of a molluscan neurone. *J. Physiol.*, **210**, 919-931.
- GRASSE, P.P., 1968.- *Traité de zoologie*. Vol. V. Fasc. 3. Mollusques Gastéropodes et Scaphopodes. Masson et Cie éd., Paris, 1083 p.
- GRENAILLE, V., 1991.- Les effets toxiques de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole sur *Euglena gracilis* Klebs. *Thèse Doct. Pharmacie*, Limoges, n° 319, 93 p.
- GRIMM-JORGENSEN, Y., 1987.- Somatostatin and calcitonin stimulate neurite regeneration of molluscan neurons in vitro. *Brain Res.*, **568**, 121-126.
- GRYGON, B., 1981.- Primary cell cultures of the hermaphroditic gonad of *Cepaea nemoralis* L. (Gastropoda: Pulmonata). *Zool. Pol.*, **28**, 459-468.
- HAYDON, P.G., KATER, S.B., 1988.- The differential regulation of formation of chemical and electrical connections in *Helisoma*. *J. Neurobiol.*, **19**, 636-655.
- HAYDON, P.G., McCOBB, D.P., KATER, S.B., 1987.- The regulation of neurite outgrowth, growth cone motility, and electrical synaptogenesis by serotonin. *J. Neurobiol.*, **18**, 197-215.
- HAYDON, P.G., COHAN, C.S., McCOBB, D.P., MILLER, H.R., KATER, S.B., 1985.- Neuron-specific growth cone properties as seen in identified neurons of *Helisoma*. *J. Neurosci. Res.*, **13**, 135-147.
- HUBENDICK, B., 1951.- Recent *Lymnaeidae*. Their variation, morphology, taxonomy, nomenclature, and distribution. *Kungk. Svenska Vetenskaps. Akad.*, **3**, 223 p.
- JELNES, J.E., 1977.- Letter : evidence of possible molluscicide resistance in schistosome intermediate hosts from Iran. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **71**, 451.
- JONG-BRINK, M. de, 1990.- How trematode parasites interfere with reproduction of their intermediate hosts, freshwater snails. *J. Med. Appl. Malacol.*, **2**, 93-133.
- JOOSSE, J., 1964.- Dorsal bodies and dorsal neurosecretory cells of the cerebral ganglia of *Lymnaea stagnalis* L. *Arch. Neerl. Zool.*, **16**, 1-103.
- JOOSSE, J., GERAERTS, W.P.M., 1983.- Endocrinology. 317-406. In: "The Mollusca". Vol. 4, Physiology, Part 1. by WILBUR, K.M. ed. Academic Press, New-York, 352 p.

- JORDAN, P., BARNISH, G., BARTHOLOMEW, R.K., GRIST, E., CHRISTIE, J.D., 1978.- Evaluation of an experimental mollusciciding programme to control *Schistosoma mansoni* transmission in St Lucia. *Bull. W.H.O.*, **56**, 139-146.
- JUNGE, D., 1967.- Multi-ionic action potentials in molluscan giant neurones. *Nature*, **215**, 546-548.
- JURBERG, P., BARBOSA, J.V., ROTENBERG, L., 1988.- The role of behavior in the survival of *Biomphalaria glabrata* in bioassays with plant molluscicide *Phytolacca dodecandra*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **83**, 41-46.
- KHALLAAYOUNE, K., 1989.- Sheep fascioliasis in Morocco: epidemiology and serodiagnostic. *Ph. D. Thesis*, University of Minesota, 196 p.
- KLOOS, H., McCULLOUGH, F.S., 1981.- Plant molluscicides: a review. *Synthèse W.H.O.*, WHO/VBG/81.834, WHO/SCHISTO/81.59, 33 p.
- KOSTENKO, M.A., GELETYUK, V.I., VEPRINTSEV, B.N., 1974.- Completely isolated neurons in the mollusc, *Lymnaea stagnalis*. A new objective for nerve cell biology investigation. *Comp. Biochem. Physiol.*, **49A**, 89-100.
- KOSTENKO, M.A., TRET'JAK, N.N., 1978.- Morphological differentiation of the completely isolated molluscan neurons in the culture. *Citologija*, **20**, 1126-1134.
- LACOUTURE, L., 1991.- Etude de la toxicité de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole sur *Euglena gracilis* Klebs. *Thèse Doct. Pharmacie*, Limoges, n° 302, 82 p.
- LAMBERT, M.C., 1990.- Contribution à la biologie et à l'écophysiologie d'un *Lymnaeidae* armoricain: *Lymnaea peregra* (Müller) (Mollusque, Gastéropode, Pulmoné, Basommatophore). *Thèse Doct. Univ. Rennes, Sci. Nat.*, n° 538, 317 p.
- LEMMA, A., BRODY, G., NEWELL, G.W., PARKHURST, R.M., SKINNER, W.A., 1972.- Endod (*Phytolacca dodecandra*), a natural product molluscicide, increased potency with butanol extraction. *J. Parasitol.*, **58**, 104-107.
- LEMMA, A., GOLL, P., DUNCAN, J., MAZENGLIA, B., 1978.- Control of schistosomiasis with use of endod in Adwa, Ethiopia: results of a five year study. *Proceedings of the International Conference on Schistosomiasis*. S.O.P. Press ed., Le Caire, 415-436.
- LEVEQUE, C., 1990.- Impact de la lutte antivectorielle sur l'environnement aquatique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **65**, Suppl. 1, 119-124.
- LEVER, J., JOOSSE, J., 1961.- On the influence of the salt content of the medium on some special neurosecretory cells in the lateral lobes of the cerebral ganglia of *Lymnaea stagnalis*. *Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch., Amsterdam*, **C 64**, 630-639.
- LI, M.F., STEWARD, J.E., DRINMAN, R.E., 1966.- *In vitro* cultivation of cells of the oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Fish. Res. Board. Can.*, **23**, 595-599.
- MADULO-LEBLOND, G., GAYRAL, P., GUILLAUMEL, J., CLAVEL, J.M., DEMERSEMAN, P., ROYER, R., 1981.- Recherches sur les dérivés nitrés d'intérêt biologique. XXIII. Nouvelles données relatives aux propriétés molluscicides des dérivés halogénés du benzamido-2 nitro-5 thiazole. *Eur. J. Med. Chem.*, **16**, 267-270.

- MAGE, C., REYNAL, P., RONDELAUD, D., CHASTELOUX, C., 1989.- Mise en pratique du contrôle de l'infestation par *Fasciola hepatica* chez des bovins limousins. *Bull. G.T.V.*, **89-6-B-347**, 5-10.
- MAROM, S., DAGAN, D., 1987.- Calcium current in growth balls from isolated *Helix aspersa* neuronal growth cones. *Pflügers Arch.*, **409**, 578-581.
- McCOBB, D.P., HAYDON, P.G., KATER, S.B., 1988.- Dopamine and serotonin inhibition of neurite elongation of different identified neurons. *J. Neurosci. Res.*, **19**, 19-26.
- 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.
- MEDINA, F.R., RITCHIE, L.S., 1980.- Molluscicidal activity of the Puerto Rican weed, *Solanum nodiflorum* Jacquin, against snail hosts of *Fasciola hepatica*. *Econ. Bot.*, **34**, 368-375.
- MEDINA, F.R., WOODBURY, R., 1979.- Terrestrial plants molluscicidal to lymnaeid hosts of fascioliasis hepatica in Puerto Rico. *J. Agr. Univ. Puerto Rico*, **63**, 366-376.
- MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE, MAROC, 1982.- *Guide de la lutte contre la schistosomiase*. Direction des Affaires Techniques, Royaume du Maroc, Rabat, 207 p.
- MOED, P.J., BOS, N.P.A., TER MAAT, A., 1989.- Morphology and electrophysiological characteristics of caudodorsal cells of *Lymnaea stagnalis* in dissociated cell culture. *Comp. Biochem. Physiol.*, **92A**, 445-453.
- MOHAMED, A.M., EL-FIKI, S., EL-SAWY, M.F., 1981.- Effect of prolonged exposure of *Biomphalaria alexandrina* snails to low concentrations of some molluscicides. II. On total tissue proteins, carbohydrates and lipids. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, **11**, 459-468.
- MOHAMED, A.M., ISHAK, M.M., ABOU-EL-GHAR, M.R., MOUSA, A.H., 1974.- Effect of some pesticides on the snails intermediate hosts of schistosomiasis in Egypt. *Egypt. J. Bilharz.*, **1**, 249-259.
- MOUKRIM, A., 1987.- Action de pesticides organophosphorés sur le mollusque *Lymnaea peregra* Müller. Etudes biochimiques, histologiques et histochimiques, *Thèse Doct. Univ. Limoges*, n° 25, 133 p.
- MUSTENKO, V.S., KOSTENKO, M.A., 1982.- Effect of biogenous amines on morphological differentiation of adult mollusc neurones in culture. *Citologija*, **24**, 412-417.
- O.E.C.D., 1981.- *OECD guidelines for testing of chemicals*. O.E.C.D., Paris, Sect. 2, n° 203, 12 p.
- PECHEUR, M., 1974.- Lutte stratégique contre la distomatose. *C.R. Rech. I.R.S.I.A.*, **38**, 85-150.
- PRENTICE, M.A., BARNISH, G., 1980.- Granule formulations of molluscicides for use in developing countries. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **74**, 45-51.
- PRENTICE, M.A., BARNISH, G., 1981.a.- Snail infections following chemotherapy of *Schistosoma mansoni* in St Lucia, West Indies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75**, 713-714.

- PRENTICE, M.A., JORDAN, P., BARTHOLOMEW, R.K., GRIST, E., 1981.b.- Reduction in transmission of *Schistosoma mansoni* by a four-year focal mollusciciding programme against *Biomphalaria glabrata* in Saint Lucia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75**, 789-798.
- QUIOT, J.M., VAGO, C., LUCIANI, J., 1973.- Culture *in vitro* de cellules de Gastéropodes. *Haliois*, **3**, 149-154.
- RONDELAUD, D., 1986.- Le contrôle mixte et alterné de *Lymnaea truncatula* Müller par voie chimique et biologique. Premiers essais sur le terrain. *Ann. Rech. Vet.*, **17**, 15-20.
- RONDELAUD, D., 1988.a.- Les effets d'une concentration sublétales de molluscicide (CuCl₂) sur l'activité reproductrice et les déplacements du mollusque hôte *Lymnaea truncatula* Müller. *Ann. Rech. Vet.*, **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. Vet.*, **19**, 279-282.
- RONDELAUD, D., 1990.- The final effect of a mixed and alternate control of *Lymnaea truncatula*. *Proceedings I.C.O.P.A. VII, Paris, 20-24 août 1990. Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, **8**, Suppl. 2, S10.E29, 1224.
- ROUBOS, E.W., 1984.- Cytobiology of the ovulation-neurohormone producing neuroendocrine caudo-dorsal cells of *Lymnaea stagnalis*. *Int. Rev. Cytol.*, **89**, 295-346.
- SATTELLE, D.B., 1973.- Potassium movements in a central nervous ganglion of *Limnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda: Pulmonata). *J. Exp. Biol.*, **58**, 15-28.
- SCHOEB, H.A., HASSAN, A.A., EL-SAYEB, M.M., REFAHY, L., 1984.- The molluscicidal properties of *Agave decipiens* and *Agave americana* (var. *marginata*). *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, **14**, 265-273.
- SHARAF, A.A., MOHAMED, A.M., ABUL-GHAR, M.R., MOUSA, A.H., 1974.- Control of snail hosts of bilharziasis in Egypt. I. Effect of triphenyltin hydroxide (Du-Ter) on aerobic oxydation of the snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. *Egypt. J. Bilharz.*, **1**, 227-237.
- SHARAF, A.A., MOHAMED, A.M., ABU EL-GHAR, M.R., MOUSA, A.H., 1975a.- Control of snail hosts of bilharziasis in Egypt. 2. Effect of triphenyltin hydroxide (Du-Ter) on carbohydrate metabolism of the snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. *Egypt. J. Bilharz.*, **2**, 37-47.
- SHARAF, A.A., MOHAMED, A.M., ABU EL-GHAR, M.R., MOUSA, A.H., 1975b.- Control of snail hosts of bilharziasis in Egypt. 3. Effect of the organophosphorous insecticide, Dursban, on carbohydrate metabolism of the snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. *Egypt. J. Bilharz.*, **2**, 49-61.
- SIGMA CHIMIE S.A., 1992.- *Réactifs biochimiques et organiques pour la recherche et de diagnostic*. Sigma Chimie S.A.R.L., Saint-Quentin-Fallavier (France), 2176 p.

- SKAPER, S.D., FACCI, L., MILANI, D., LEON, A., TOFFANO, G., 1990.- Culture and use of primary and clonal neural cells. 17-32. In: "Cell culture", by CONN, P.M. ed. Academic Press Inc., San Diego and New-York.
- STURROCK, R.F., 1973.- Control of *Schistosoma mansoni* transmission : strategy for using molluscicides on St Lucia. *Int. J. Parasitol.*, **3**, 795-801.
- STURROCK, R.F., 1974.- Persistence of the molluscicide Bayluscide (Clonitralide) emulsifiable concentrate on mud surfaces in the tropics. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **68**, 427-434.
- STURROCK, R.F., BARNISH, G., UPATHAM, E.S., 1974.- Snail findings from an experimental mollusciciding programme to control *Schistosoma mansoni* transmission on St Lucia. *Int. J. Parasitol.*, **4**, 231-240.
- SULLIVAN, J.T., CHENG, T.C., CHEN, C.C., 1984.- Genetic selection for tolerance to Niclosamide and copper in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca : Pulmonata). *Tropenmed. Parasitol.*, **35**, 189-192.
- TAURISSON, C., 1991.- Plantes molluscicides et bilharzirose. *Thèse Doct. Pharmacie*, Limoges, n° 315, 258 p.
- TORREALBA, J.F., SCORZA, J.V., SANABRIA, M.S., VASQUEZ, A.D., RAMOS, B.I., RICCARDI, B., JORDAN, L.S., 1953.- Nota preliminar sobre la accion malaquisita del fruto de paraparo (*Sapindus saponaria*). *Gac. Med.*, **61**, 299-307.
- TOWNSEL, J.G., THOMAS, W.E., 1987.- On the status of the study of invertebrate neurons in tissue culture-phyla Mollusca and Annelida. *Comp. Biochem. Physiol.*, **86A**, 199-207.
- TRESGOTS, A., 1982.- Comportement de la glande digestive de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode) adulte en culture organotypique. *Malacologia*, **22**, 637-642.
- UPATHAM, E.S., STURROCK, R.F., 1977.- Preliminary trials against *Biomphalaria glabrata* of a new molluscicide formulation : gelatin granules containing Bayluscide wetttable powder. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **71**, 85-93.
- VAGO, C., CHASTANG, S., 1960.- Culture de tissus d'huîtres. *C.R. Acad. Sci., D.*, **250**, 2751-2753.
- VAGO, C., QUIOT, J.M., 1969.- Recherches sur la composition des milieux de culture d'Invertébrés. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, **1**, 281-288.
- VAN DAMNE, D., 1984.- *The fresh water Mollusca of Northern Africa*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht (Nederland), 337 p.
- VAN DER STEEN, W.J., VAN DEN HOVEN, N.P., JAGER, J.C., 1969.- A method for breeding and studying freshwater snails under continuous change, with some remarks on growth and reproduction in *Lymnaea stagnalis* (L.). *Neth. J. Zool.*, **19**, 131-139.
- 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. Limoges, Sci. Nat.*, n° 46, 130 p.

- VINCENT, C., GRIFFOND, B., GOMOT, L., BRIDE, J., 1984.- Etude *in vitro* de l'influence des corps dorsaux sur l'ovogénèse d'*Helix aspersa* Müller. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **54**, 230-235.
- WAGNER, V.A., 1933.- The possibility of eradicating bilharzia by extensive planting of the tree *Balanites*. *S. Afr. Med. J.*, **10**, 10-11.
- WARREN, K.S., PETERS, P.A., 1969.- Cercariae of *Schistosoma mansoni* and plants, attempt to penetrate *Phaseolus vulgaris* and *Hedychium coronarium*. *Nature*, **217**, 647-648.
- WEISER, J., 1991.- *Biological control of vectors*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester (England), 189 p.
- WENDELAAR BONGA, S.E., 1970.- Ultrastructure and histochemistry of neurosecretory cells and neurohemal areas in the pond snail *Lymnaea stagnalis* L. *Z. Zellforsch.*, **108**, 190-224.
- WIJDENES, J., VAN ELK, R., JOOSSE, J., 1983.- Effects of two gonadotrophic hormones on polysaccharide synthesis in the albumen gland of *Lymnaea stagnalis*, studied with the organ culture technique. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **51**, 263-271.
- WONG, R.G., HADLEY, R.D., KATER, S.B., HAUSER, G.C., 1981.- Neurite outgrowth in molluscan organ and cell cultures: the role of conditioning factors. *J. NeuroSci.*, **1**, 1008-1021.
- WONG, R.W., MARTEL, E.C., KATER, S.B., 1983.- Conditioning factors(s) produced by several molluscan species promote neurite outgrowth in cell culture. *J. Exp. Biol.*, **105**, 389-393.
- WONG, R.W., BARKER, D.L., KATER, S.B., BODNAR, D.A., 1984.- Nerve growth-promoting factor produced in culture media conditioned by specific CNS tissues of the snail *Helisoma*. *Brain Res.*, **292**, 81-91.
- XIMENES, T., 1991.- Le contrôle biologique de *Lymnaea truncatula* Müller, hôte intermédiaire de *Fasciola hepatica* L. Possibilités et perspectives. *Thèse Doct. Vétérinaire*, Maisons-Alfort, n° 122, 103 p.
- YOUSIF, R.E., 1990.- Communication personnelle.
- ZAKI, A.A.A., 1971.- The effect of systematic application of Bayluscide on controlling bilharziasis. *East African Med. J.*, **48**, 218-227.
- ZORAN, M.J., DOYLE, R.T., HAYDON, P.G., 1990.- Target-dependent induction of secretory capabilities in an identified motoneuron during synaptogenesis. *Developm. Biol.*, **138**, 202-213.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE PREMIER: Etat actuel de la question sur les molluscicides	4
I. - Rappels préliminaires	6
II. - Les molécules chimiquement définies	8
A. Les principales familles	8
B. Efficacité des molluscicides chimiques au laboratoire	10
C. Résultats sur le terrain	11
D. Mode d'action	13
D. Conséquences de l'utilisation à long terme	16
III. - Molluscicides d'origine végétale	16
A. Revue des plantes étudiées	17
B. Conditions pour l'application sur le terrain	18
IV. - Commentaires	18
CHAPITRE DEUXIEME: Cultures cellulaires de Mollusques Pulmonés	21
I. - Tissus des Mollusques Pulmonés concernés par les cultures	21
A. Espèces utilisées	21
B. Tissus et organes cultivés	23
C. Milieux de culture	23
D. Résultats	24

	Pages
II. - Composition des milieux de culture	26
A. Tissus autres que les neurones	26
B. Neurones ganglionnaires	28
III. - Techniques particulières pour la préparation des milieux	28
A. Techniques d'isolement	28
B. Conditionnement des milieux	30
C. Substances capables d'agir sur l'élongation des dendrites	31
IV. - Commentaires	32
CHAPITRE TROISIÈME: Le système nerveux de <i>Lymnaea stagnalis</i>	34
I. - <i>L. stagnalis</i>	36
A. Présentation de l'espèce	36
B. La coquille	36
C. Distribution géographique de l'espèce	38
D. Quelques traits de la biologie du mollusque	38
II. - Le système nerveux de <i>L. stagnalis</i>	41
A. Description générale	41
B. Ganglions et cellules neurosécrétrices	42
C. Rôle de la neurosécrétion dans la physiologie du mollusque	51
D. Notions d'électrophysiologie	53
III. - Commentaires	54
CHAPITRE QUATRIÈME: Mise au point d'une technique de culture pour les neurones de <i>L. stagnalis</i>	57
I. - Matériel et méthodes	57
A. Le mollusque	57
B. Protocole expérimental	59
C. Méthodologie	63
D. Paramètres utilisés	63
E. Expression des résultats	64
II. - Observations personnelles sur la méthodologie	64
III. - La survie des neurones	67

	Pages
IV. - Commentaires	67
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	70
BIBLIOGRAPHIE	72

-oOo-

ESSAI DE CULTURE *in vitro* DES NEURONES CHEZ LE MOLLUSQUE
Lymnaea stagnalis L. Par V. SZMIDT.

Une expérimentation a été réalisée pour préciser les conditions de culture permettant la survie des neurones de *Lymnaea stagnalis in vitro*. Les résultats relatifs à ces recherches sont présentés dans ce mémoire après des rappels sur les molluscicides utilisés contre la limnée, les milieux de culture employés pour les neurones et des données sur la biologie de *L. stagnalis*.

Les neurones ont été cultivés dans le milieu liquide de LEIBOWITZ L 15 non modifié, mais conditionné par la présence de chaînes ganglionnaires complètes. Les neurones ont une morphologie normale au 4^e jour de culture mais ils n'ont pas élaboré de nouveaux prolongements. Plusieurs hypothèses ont été émises dans ce mémoire pour expliquer ces résultats.

Ces premières données nécessitent d'étudier l'impact de plusieurs facteurs sur les conditions de culture de ces neurones afin de préciser l'action de certains molluscicides sur ces derniers.

Mots-clés. Neurones, culture cellulaire.

Lymnaea stagnalis.

Molluscicide.