

50376
1972
147

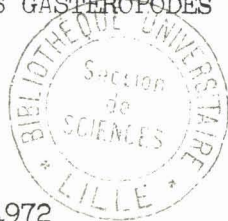
50376
1972
147

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I
LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE
LABORATOIRE ASSOCIE AU C.N.R.S. n° 148

THESE DE TROISIEME CYCLE
(Biologie Animale)

Christian WATTEZ

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU ROLE DES TENTACULES OCULAIRES
DANS LA DIFFERENCIATION GENITALE CHEZ LES ARIONIDES
(MOLLUSQUES GASTEROPODES PULMONES)



Présentée en Février 1972
devant la Commission d'Examen

Jury d'examen

M. DURCHON	Président et Rapporteur
A. RICHARD	Examineur
J. BERGERARD	Membre Invité

AVANT-PROPOS

Le Professeur DURCHON, Directeur du Laboratoire de Biologie Animale de Lille m'a proposé ce sujet de travail.

Il m'est particulièrement agréable de lui exprimer ma profonde gratitude pour les conseils et les encouragements qu'il m'a prodigués tout au long de ces recherches.

Je remercie également bien vivement Mme MEUNIER, aide-Technique, qui m'a initié aux méthodes de la culture organotypique.

Je ne saurais oublier mes amis du Laboratoire qui, à des moments divers, ont bien voulu m'aider.

S O M M A I R E

HISTORIQUE	p. 1
MATERIEL et METHODES	p. 5
PREMIERE PARTIE : LA GONADE	p. 11
CHAPITRE I : DEVELOPPEMENT DE LA GONADE	p. 12
CHAPITRE II : ETUDE DU CYCLE GENITAL D' <u>A. SUBFUSCUS</u> :	
RESULTATS PERSONNELS RELATIFS A LA GAMETOGENESE	p. 14
I - Introduction	p. 14
II - Différents stades histologiques	p. 14
III - Notion d'hermaphrodisme	p. 18
DISCUSSION	p. 20
CONCLUSION	p. 21
DEUXIEME PARTIE : ETUDE DU DETERMINISME ENDOCRINE DE LA	
DIFFERENCIATION SEXUELLE CHEZ <u>A. SUBFUSCUS</u>	p. 22
INTRODUCTION	p. 23
CHAPITRE I : ORGANES PRESUMES ENDOCRINES CHEZ LES ARIONIDES	p. 25
I - La gonade	p. 25
II - L'organe de Semper	p. 25
III - La glande céphalique	p. 26
IV - Le complexe céphalique tentacules oculaires-cerveau	p. 26
1 - Le tentacule oculaire : observations personnelles	p. 28
2 - Le cerveau	p. 31
V - Conclusion	p. 35
CHAPITRE II : ANALYSE EXPERIMENTALE DES EFFETS PRODUITS PAR	
<u>ABLATIONS IN VIVO</u> DES TENTACULES OCULAIRES	p. 36
INTRODUCTION	p. 36
I - Technique opératoire	p. 36

II - Résultats	p. 36
1 - Ablation des tentacules oculaires dès l'éclosion	p. 36
a) Influence sur la croissance pondérale	p. 36
b) Effet sur la différenciation sexuelle	p. 38
c) Influence sur la glande de l'albumine	p. 41
2 - Ablation des tentacules oculaires en phase juvénile (stade 2)	p. 41
3 - Ablation des tentacules oculaires en début de phase femelle (stade 5)	p. 41
III - Discussion	p. 41
IV - Conclusion	p. 43
CHAPITRE III : ETUDE DE LA REGENERATION GERMINALE CHEZ DES ANIMAUX CASTRES PRIVES OU NON DE TENTACULES OCULAIRES	
	p. 44
INTRODUCTION	p. 44
I - Technique opératoire	p. 44
II - Résultats	p. 46
III - Discussion	p. 49
IV - Conclusion	p. 50
CHAPITRE IV : ETUDE EXPERIMENTALE PAR LA METHODE DES CULTURES ORGANOTYPIQUES	
	p. 51
INTRODUCTION	p. 51
I - Techniques de la culture organotypique	p. 51
II - Résultats	p. 55
1 - Culture de la gonade isolée en milieu an hormonal	p. 55
2 - Associations autologues de la gonade avec d'autres organes	p. 56
III - Discussion	p. 57
IV - Conclusion	p. 58
CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE	p. 60

TROISIEME PARTIE : INFLUENCE DE LA LUMIERE SUR LA CROISSANCE ET
LA MATURETE SEXUELLE D'A. SUBFUSCUS p. 61

INTRODUCTION p. 62

 I - Méthodes p. 62

 II - Résultats p. 62

 1 - Influence sur la croissance pondérale p. 62

 2 - Effet sur la différenciation et
 la maturité sexuelles p. 63

 3 - Neurosécrétion p. 65

 III - Discussion p. 65

 IV - Conclusion p. 67

CONCLUSION ~~GENE~~RALE ET DISCUSSION p. 68

HISTORIQUE

Les premières expériences sur la différenciation sexuelle chez les Mollusques Gastéropodes Limacidés et Arionidés ont été inspirées par l'action gonadotrope de stéroïdes de synthèse chez les Vertébrés.

ROSE et HAMON (1939), à la suite d'injection d'une solution huileuse de benzoate d'oestradiol ou de propionate de testostérone au Limacidé Milax gagates Draparnaud, avaient conclu à l'inefficacité des hormones sexuelles de synthèse. BRIDGEFORD et PELLUET (1952) constataient que la synapoïdine (mélange des gonadostimulines antéhypophysaires : LH et FSH) provoquait chez Deroce-ras reticulatum Müller un accroissement notable du nombre d'ovocytes dans chaque acinus et une rapide maturation des cellules germinales mâles, le tout accompagné d'une désorganisation de l'ovotestis et d'anomalies cellulaires. Chez Arion rufus Linné, les pastilles d'hormones sexuelles cristallisées (pro-gestérone, testostérone et oestradiol), insérées dans la cavité générale par LAVIOLETTE (1954 b) n'influaient pas sur la gonade.

Si l'on excepte ces travaux, le problème du déterminisme endocrine de la différenciation sexuelle chez les limaces a été abordé tout d'abord par PELLUET et LANE (1961) et PELLUET (1964) chez les Arionidés Arion subfuscus Draparnaud, Arion ater Linné, Milax sp. Après une expérimentation *in vivo*, ils remarquent que l'ablation des tentacules oculaires provoquait, trois à huit semaines après opération, un accroissement du nombre d'ovocytes dans la gonade des jeunes animaux opérés.

L'injection, à des opérés détentaculés, d'extraits tentaculaires ou celle d'extrait mixte (Tentacules oculaires - Cerveau) entraînait un maintien du nombre normal d'ovocytes et même une légère augmentation numérique dans le second cas, en fonction des proportions de cerveau et de tentacules figurant dans la solution administrée. De plus, des animaux normaux traités par des broyats de cerveaux présentaient une gonade assez semblable à celle d'individus privés de tentacules.

Ces auteurs concluaient à l'influence d'un système neuro-endocrinien sur le développement de la gonade et donnaient l'interprétation suivante de leurs résultats : il existerait deux hormones distinctes intervenant dans la différenciation sexuelle :

- une hormone cérébrale contrôlant la production d'ovocytes,

- une hormone tentaculaire qui serait inhibitrice de l'ovogenèse, tout au moins jusqu'à la maturité, et stimulatrice de la spermatogenèse, ou régulerait la décharge de l'hormone cérébrale.

Selon eux, les deux substances seraient produites chez le jeune mais ces animaux étant protandres, l'hormone tentaculaire prédominerait l'hormone cérébrale féminisante et empêcherait la différenciation des ovocytes. Avec la poussée de maturité sexuelle, l'hormone cérébrale augmenterait ses potentialités permettant ainsi le développement des oeufs qui atteignent leur grande taille caractéristique. Chez l'adulte, un équilibre s'établirait entre les deux hormones.

BADINO (1967) reprend chez Arion rufus Draparnaud, par la méthode des cultures organotypiques, ces expériences réalisées in vivo. Cependant, il n'indique pas à quel stade les explants sont prélevés et de ce fait, ses résultats sont difficilement interprétables bien qu'il pense confirmer ceux de PELLUET et LANE.

Plus récemment, GOTTFRIED et DORFMAN (1970) ont effectué des tentaculectomies sur des lots d'Ariolimax californicus immatures (stade où la gonade ne renferme que des spermatogonies). Ils obtiennent, au bout de sept jours, un développement accéléré des spermatides et l'apparition de quelques spermatozoïdes. Vingt et un jours après opération, la spermatogenèse est achevée, ce qui normalement ne se produit que chez des animaux trois fois plus âgés que les opérés.

Ils en déduisent que le tentacule oculaire est impliqué dans le contrôle de la phase mâle de l'ovotestis car l'injection d'homogénats tentaculaires à des animaux immatures, chez lesquels une précocité mâle avait été induite sept jours après la détentaculation, provoque une inhibition de la spermatogenèse.

Ces résultats sont en opposition avec ceux de PELLUET et LANE mais GOTTFRIED et DORFMAN attribuent ce fait à une différence d'espèce et, à la suite d'administration de divers stéroïdes, concluent à propos des "principes tentaculaires" : "should they be regarded as gonad stimulators or inhibitors?". Pour eux, le tentacule oculaire serait un régulateur du développement de la gonade.

L'étude des cellules tentaculaires spéciales présumées neurosécrétrices qui, chez les Gastéropodes, n'existent que chez les Stylommatophores, a été entreprise par LANE (1962 à 1964) chez divers Pulmonés dont Agriolimax, Arion et Milax. Elle distingue trois types cellulaires : des cellules en collier

(collar cells) entourant le ganglion digité central et l'oeil, et deux sortes de cellules latérales (lateral oval et lateral processed cells). BIERBAUER et TÖRÖK (1968) retrouvent ces différentes catégories chez plusieurs Stylommatophores dont Limax maximus Linné. Selon PELLUET et LANE (1961) et LANE (1962), les "collar cells" seraient responsables de la fonction endocrine du tentacule. BIERBAUER et VIGH-TEICHMANN (1970) tentent d'en réaliser une étude cytochimique.

En microscopie électronique, LANE (1964 b) décrit, chez Helix aspersa Müller, des corpuscules α et β dans le cytoplasme des "collar cells" mais ne distingue pas les deux types de cellules latérales. RÖHLICH et BIERBAUER (1966) chez Helicella obvia semblent confirmer la nature neurosécrétoire des cellules en collier mais les considèrent comme des cellules neurosécrétoires non typiques en raison de la taille des granules qu'elles renferment. Quant aux cellules latérales (nommées ici A et B), ce seraient des cellules glandulaires à sécrétion exocrine.

HERLANT-MEEWIS et VAN MOL (1959) décrivent des cellules neurosécrétoires à activité variable au cours du développement de la gonade dans les ganglions buccaux d'A. rufus et d'A. subfuscus. PELLUET et LANE (1961) chez L. maximus, QUATTRINI (1963) chez Milax gagates observent de la neurosécrétion cérébrale mais seuls VAN MOL (1967) chez A. rufus et SMITH (1967) chez A. ater signalent une relation entre neurosécrétion et cycle génital.

Selon VAN MOL, les cellules neurosécrétoires, présentes dans les ganglions cérébroïdes des jeunes animaux, ne manifestent une activité intense qu'à la puberté.

Pour SMITH, la neurosécrétion serait maximum au stade spermatozoïde dans les différents ganglions constituant le cerveau.

L'influence de la photopériode a été étudiée chez D. reticulatum par HENDERSON et PELLUET (1960) : si l'exposition à une lumière d'intensité variable dix heures par jour provoque une accélération de la maturation des cellules germinales mâles, une lumière appliquée dix-huit ou vingt-quatre heures par jour entraîne la production de spermatides multinucléées tandis qu'une obscurité continue aboutit à une augmentation du nombre de cellules nourricières.

SMITH (1966), reprenant l'expérimentation chez A. ater, constate que sous différentes conditions de température et de luminosité, les animaux présentent des variations relatives au degré de maturation.

Ces résultats feront l'objet d'une discussion dans le chapitre consacré à ce domaine.

L'ensemble des résultats obtenus par les différents auteurs semble bien aboutir à la **conclusion** que la **différenciation** sexuelle des Arionidés est soumise à un déterminisme endocrine ; les tentacules oculaires et le cerveau seraient les organes responsables de la production de principes actifs. Mais, les hypothèses retenues sont contradictoires. Elles sont les suivantes :

- Le tentacule oculaire émet-il une substance inhibitrice ou stimulatrice de la gamétogenèse ; agit-il comme un simple régulateur ?

- Le cerveau intervient-il dans la différenciation sexuelle et, dans l'affirmative, est-il actif durant toute la vie de l'animal ?

Dans ces conditions nous avons entrepris une étude expérimentale de la différenciation sexuelle d'Arion subfuscus. Pour tenter de déterminer le rôle du tentacule oculaire nous avons pratiqué des résections répétées de cet organe soit chez le jeune à l'éclosion, soit chez des animaux plus âgés. De plus, la possibilité de régénération germinale nous a permis de réaliser une série expérimentale, comprenant des animaux castrés et des individus détentaculés puis castrés, et d'étudier chez ces opérés l'état de la gonade nouvellement constituée.

Grâce à la méthode des cultures organotypiques, nous avons cultivé des gonades d'A. subfuscus et tenté de discerner les rôles respectifs du tentacule oculaire et du cerveau.

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL

1 - Origine du matériel

Notre expérimentation a porté sur le Mollusque Gastéropode Pulmoné terrestre appartenant à l'Ordre des Stylommatophores et au Sous-Ordre des Sigmurethra, l'Arionidé A. subfuscus dont Monsieur SAUSSEY, Maître de Conférence de Biologie Animale à la Faculté des Sciences de Caen, a eu, à plusieurs reprises, l'amabilité de nous faire parvenir des lots. La détermination des espèces est réalisée à l'aide de la "Faune de France des Mollusques terrestres et fluviatiles" de L. GERMAIN (1930).

Le cycle reproducteur est annuel : A. subfuscus, espèce à cycle saisonnier, atteint le stade reproductif à une saison précise de l'année. Après l'accouplement, qui est réciproque, chaque partenaire jouant un rôle mâle et un rôle femelle, la ponte a lieu en automne mais A. subfuscus, plus résistant au froid, est susceptible de donner des pontes plus tardives. Généralement, les géniteurs meurent après avoir pondu. De ce fait, en hiver et au printemps, les populations ne comprennent que des individus infantiles ou juvéniles. Les jeunes passent la mauvaise saison enfouis sous les feuilles et achèvent leur croissance dans la nature, au printemps suivant. Les phénomènes d'accouplement et de ponte ont fait l'objet d'une publication de QUATTRINI (1970), relative à M. gagates (Limacidé).

2 - Soins d'élevage - Obtention des pontes

La technique d'élevage employée est celle de LAVIOLETTE (1954), LÜSIS (1961) et SMITH (1966) à quelques variantes près.

Dès l'éclosion, les jeunes sont transportés dans des boîtes de Pétri garnies de papier filtre humide renouvelé tous les deux jours. Les animaux préfèrent à la lumière une demi-obscurité. Quinze jours après l'éclosion ils sont installés dans des bocaux d'un demi-litre.

Dès l'âge de six mois, les individus sont placés par groupes de dix au maximum dans des aquariums de dix litres. Dans ces conditions, et à une température d'élevage d'environ quinze degrés centigrades, ces animaux poursuivent leur croissance d'une façon régulière si l'on veille à ce qu'ils soient de moins

en moins nombreux dans chaque récipient au fur et à mesure que leur taille augmente. Il est bien entendu nécessaire que ces derniers soient maintenus dans un état de propreté constante, ce qui nécessite de fréquents nettoyages (deux à trois fois par semaine). La nourriture (salade, carottes) doit toujours être en quantité suffisante, renouvelée fréquemment et l'humidité constante chez opérés et témoins. En effet, ROSENWALD (1927) montre qu'un élevage d'Agriolimax laevis Linné en milieu humide donne des animaux dont la glande hermaphrodite est petite et dont les parties femelles se développent les premières ; par contre en milieu sec les organes mâles se développent plus vite. De plus, LÜSIS (1966) constate qu'une baisse d'humidité trouble la ratio des gamètes mâles et femelles d'Arion ater rufus Linné et favorise le développement des ovocytes. D'autre part, RICHTER (1935) chez Agriolimax agrestis Linné pense que le régime alimentaire a une influence sur le développement de l'ovotestis, la sous-alimentation entraînant la réduction du nombre d'ovocytes (des individus de deux mois ne présentent pas encore d'ovocytes tandis que les témoins alimentés peuvent déjà pondre à cinq mois).

L'influence du jeûne ou de la sous-alimentation sur la croissance pondérale des limaces est importante (ABELOOS, 1942 ; CHEVALLIER, 1969 ; REYGROBELLET, 1970) et ce phénomène est retrouvé par JOOSSE, HOER et CORNELISSE (1968) sur le Pulmoné Basommatophore Lymnaea stagnalis Linné chez qui la gamétogénèse se poursuit à une vitesse plus lente et où le volume de l'ovotestis se trouve réduit.

En recueillant des adultes à la fin de l'été, on peut obtenir des pontes. Le délai normal entre accouplement et ponte est de quelques semaines. Le nombre d'oeufs émis varie de trente à cent, un même animal étant capable de fournir plusieurs pontes échelonnées.

Les oeufs recueillis sont disposés dans des boîtes de Pétri garnies de papier filtre humide. Leur durée d'incubation dépend surtout des conditions de température. Ainsi, dans la nature, si les pontes ont été tardives, les oeufs demeurent en terre durant l'hiver et éclosent dès le premier adoucissement de la température. Maintenus en étuve à vingt degrés centigrades, ils éclosent trente jours environ après le dépôt de la ponte. Dans certains cas, le taux d'éclosion est réduit ou même nul, les oeufs amorçant une segmentation qui s'interrompt au bout de trois à quatre jours. Il faut parfois laver les oeufs au cours de l'incubation pour les débarrasser des moisissures. De plus, des Nématodes peuvent détruire des pontes entières.

LAVIOLETTE (1954), chez A. rufus, en confrontant le développement d'animaux d'élevage et celui d'individus recueillis dans la nature aux diverses époques de l'année, a pu noter entre les deux séries des différences relatives à la croissance.

Dans la nature, les jeunes A. rufus subissent, au cours de l'hiver, une interruption de leur croissance dont n'ont pas à souffrir les animaux d'élevage. Ils comblent cependant ce retard au printemps et atteignent la maturité sexuelle (Spermiogenèse active dans la gonade) un ou deux mois avant les animaux d'élevage.

Ce phénomène semble se retrouver chez A. subfuscus qui dans nos élevages atteint la maturité en novembre, c'est-à-dire plus tardivement que dans la nature. Il y a donc là une incidence possible de la captivité sur le déclenchement de la maturité sexuelle.

II - TECHNIQUES

1 - Anesthésie

Pour provoquer l'extension des animaux, nous immergeons l'animal dans une solution diluée d'acide nitrique et de formol ($H_2O : 1000, NO_3 H : 2, HCHO 40 \% : 3$) selon la technique préconisée par LAVIOLETTE (1954).

Une bonne anesthésie est difficile à réaliser chez les Arionidés étant donné l'irritabilité des muscles de la paroi du corps.

De nombreux anesthésiques ont été employés chez les Invertébrés (KAPLAN, 1969). Une liste relative à ceux utilisés chez les Gastéropodes a été établie par RUNHAM, ISARANKURA et SMITH (1965).

L'emploi du phenoxetol de propylène, testé par ces derniers auteurs chez A. ater a montré, après des opérations variées, un taux de survie de 8 à 50 %. Après anesthésie par le chlorure de magnésium, et sans opérations, chez A. ater, H. aspersa et Achatina fulica Ferrussac la récupération est très variable (23 à 92 %). Cependant, le chlorure de magnésium permet difficilement une extension complète des tentacules, ce qui est incompatible avec le prélèvement de ces derniers.

Pour notre part, nous avons tout d'abord utilisé une technique dérivée de celles employées par JOOSSE et LEVER (1959 b) puis LEVER, JAGER et WESTERVELD (1964) chez L. stagnalis : immersion dans une solution aqueuse à 0,2 % de Nembuthal (Abbott) pendant vingt minutes à une heure, puis transfert dans une solution aqueuse de MS 222 (Sandoz) à 0,2 % pendant une durée équivalente.

Cette méthode présentant l'inconvénient d'être très longue, nous l'avons abandonnée et remplacée par l'utilisation d'anhydride carbonique pendant cinq à quinze minutes, selon la taille des animaux, procédé préconisé par HENDERSON (1969) et mis au point par BAILEY (1969). Dans ce cas, les animaux récupèrent assez vite et on obtient 100 % de survie. Cette technique se révèle donc être la plus pratique aussi bien pour les opérations que pour les prélèvements d'organes ; cependant, elle ne permet pas les interventions sur la région céphalique des limaces. En effet, le contact des pinces provoque assez rapidement une rétraction de la tête.

Pour d'éventuelles opérations ultérieures relatives à cette région, il conviendra de trouver un anesthésique adéquat. En effet, si l'uréthane agit utilement chez Australorbis (MICHELSON 58) il est inefficace chez les limaces et chez L. stagnalis (RUNHAM, ISARANKURA et SMITH, 1965). De plus, l'injection de Ringer saturé d'éther, réalisée par RIPPPLINGER et JOLY (1968), efficace pour des interventions sur la région céphalo-pédieuse d'Helix pomatia Linné, ne l'est pas chez H. aspersa (RUNHAM, ISARANKURA et SMITH, 1965) où elle provoque une rétraction accompagnée d'un important rejet de mucus. Donc, seul le phenoxetol de propylène permet une bonne extension de la tête mais, comme nous l'avons vu, le taux de survie après opération est faible.

Le prélèvement des organes s'effectue sur l'animal immergé dans une solution physiologique pour Pulmonés : la solution de CHIARANDINI (1964) ou de ROACH (1963).

2 - Histologie

L'examen, en microscopie photonique, a porté sur la gonade, la glande de l'albumine, le cerveau et les tentacules oculaires d'animaux d'âges variés.

Les très jeunes animaux, les gonades et les glandes de l'albumine sont fixés au Bouin Hollande avec acide acétique, avec un temps de fixation très court pour les glandes de l'albumine adultes qui présentent une forte tendance au durcissement ; les complexes tentacules-cerveau au Bouin-Hollande sans acide acétique pour faciliter la coloration selon le procédé de CLARK (1965).

Après inclusion dans la paraffine à 56° C, les coupes réalisées sont sériées et d'une épaisseur de 6 μ .

Les colorations topographiques les plus couramment employées sont les suivantes :

- Triple coloration de Prenant (Trioxyhématéine ferrique-éosine-Vert lumière)
- Hémalun-éosine
- Azan

Pour la neurosécrétion, la méthode de Clark (1955) est utilisée.

La détection du galactogène est réalisée selon les critères histo-chimiques définis par GRAINGER (1952).

3 - Comptages

Les comptages relatifs aux différents types cellulaires sont effectués pour les calculs de densité selon la méthode préconisée par KUHLMANN et NOLTE (1967) chez H. pomatia et reprise par GUYARD (1971) chez H. aspersa.

L'expression de la densité varie en fonction de la catégorie cellulaire.

La densité des cellules mâles D_m est définie par le rapport entre le nombre de cellules N contenues dans un acinus et la surface S de ce dernier exprimée en cm^2 au grossissement 25 et calculée à l'aide d'un planimètre (NOURTIER, 1971)

$$D_m = \frac{N}{S}$$

La densité des ovocytes représente le nombre N de cellules rapporté à la longueur basale L exprimée en centimètres (périmètre de chaque section acinaire assimilée à un cercle) multipliée par le nombre de coupes x passant par chaque ovocyte

$$D_o = \frac{N}{Lx} \quad \left(\text{avec } L = \frac{2S}{\sqrt{\frac{S}{\pi}}} \right)$$

La densité totale D_t pour chaque catégorie cellulaire est exprimée par la moyenne arithmétique de 100 comptages (100 acini par gonade)

$$D_t = \frac{\sum D}{100}$$

Le nombre total N d'ovocytes contenus dans la glande hermaphrodite est obtenu grâce à la formule de LÜSIS (1961, 1966) utilisée sur A. ater rufus L.

$$N = n Y x t / \phi$$

On compte le nombre total Y d'ovocytes contenus dans chaque section toutes les n coupes, mais ce nombre ne sera pas le nombre véritable étant donné que certains ovocytes seront comptés plusieurs fois, il y a donc lieu d'effectuer une correction faisant intervenir l'épaisseur des coupes en μ (t) et le diamètre ovocyttaire moyen ϕ

Nos comptages ont utilisé $n = 10$ et $t = 6$ pour les gonades jeunes où par conséquent $N = 10 Y \times 6/\phi$.

Le diamètre ovocytaire moyen ϕ est calculé à partir de la formule de LÜSIS (1961, 1966) où \bar{S} donne la surface moyenne de section d'un ovocyte :

$$\phi = 2 \sqrt{\frac{\bar{S} \times 3}{2 \pi}}$$

Le diamètre moyen est obtenu en prenant dix ovocytes ou plus par glande, ceci au hasard, en traçant leurs surfaces, et en les mesurant à l'aide d'un planimètre, le tout étant réalisé au grossissement 25.

PREMIERE PARTIE

LA GONADE

CHAPITRE I

DEVELOPPEMENT DE LA GONADE

1 - Origine

Chez les Pulmonés, deux théories s'opposent quant à la formation de l'appareil reproducteur, la théorie dualiste et celle de l'ébauche unique.

Des études entreprises par HEYDER (1909) et PABST (1914) sur Arion empiricorum Ferrussac plaident en faveur de la première hypothèse alors que celles de LAVIOLETTE (1954) chez A. rufus L. sont pour la seconde.

La théorie dualiste implique que la gonade soit d'origine mésodermique et les voies génitales ectodermiques tandis que celle de l'ébauche unique admet que la gonade elle-même soit ectodermique.

Comme le signale MARTOJA (1964), "il faudrait connaître très exactement les lignées cellulaires issues du micromère 4d pour infirmer ou confirmer l'origine mésodermique de la gonade et de là, opter entre les deux théories."

2 - Situation et aspect

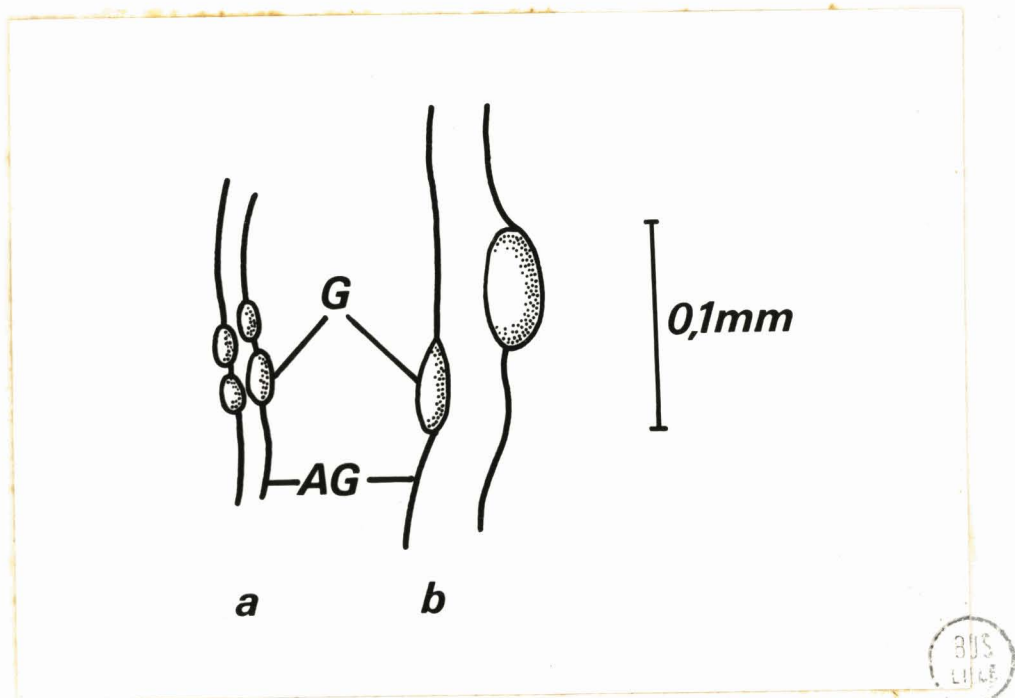


Fig. 1 - Aspects de la gonade à 10 jours (a) et à 2 mois (b)

G : gonade

AG : artère génitale

A l'éclosion et tout au long du premier mois, la gonade est formée de plusieurs groupes de cellules **toujours** disposés le long de la paroi de l'artère génitale (Fig. 1 - Pl. I, fig. a).

Vers l'âge de un mois en moyenne, ces amas cellulaires apparaissent comme des gonflements minuscules et transparents sur la paroi externe de l'artère génitale. Ces ébauches, séparées, s'accroissent et à l'âge de trois mois, la glande hermaphrodite possède la forme bilobée caractéristique de l'adulte.

A maturité sexuelle, la gonade, située au contact du cul de sac stomacal, recouverte par les lobes du foie et traversée par l'artère génitale, peut atteindre un centimètre.

L'ovotestis se subdivise en acini que réunit une enveloppe conjonctive externe.

Au moment de l'émission des produits sexuels, spermatozoïdes et ovules empruntent tour à tour le canal hermaphrodite.

3 - Croissance

On retrouve chez A. subfuscus les observations faites par ABELOOS (1944) et LÜSIS sur A. ater (1961).

La glande hermaphrodite, généralement impondérable pendant la phase infantile, s'accroît pendant la phase juvénile, atteint son développement maximum vers dix à onze mois puis décroît quand les spermatozoïdes sont déchargés.

CHAPITRE II

ETUDE DU CYCLE GENITAL D'A. SUBFUSCUS :

RESULTATS PERSONNELS RELATIFS A LA GAMETOGENESE

I - INTRODUCTION

La gonade d'A. subfuscus se présente sous la forme d'une glande en grappe dont tous les acini sont hermaphrodites, ce qui est général chez les Pulmonés.

Outre une enveloppe conjonctive externe, elle comporte un épithélium germinatif pariétal dont dérivent les cellules germinales.

Les éléments de la lignée mâle sont libérés dans la lumière de l'acinus. Les jeunes ovocytes évoluent sur place et leur apparition est toujours plus tardive que celle des spermatogonies.

II - DIFFERENTS STADES HISTOLOGIQUES

Le cycle génital d'A. subfuscus peut se subdiviser en six stades proches de ceux décrits par LÛSIS (1961) et SMITH (1966) chez A. ater.

1 - Stade 1 = Stade Immature

D'une durée moyenne d'un mois, ce stade, à la suite d'observations en microscopie optique, est qualifié de mâle par SMITH et LÛSIS. En effet, les acini, petits et nombreux sont remplis de cellules de type apparemment semblable et assimilées chez les Arionidés à des spermatogonies (Pl. I, fig. a).

Une étude ultrastructurale en cours tentera de démontrer s'il existe à ce stade des cellules indifférenciées ou même des ovogonies.

Depuis les travaux d'ANCEL (1903), de nombreux auteurs ont étudié l'évolution des noyaux de l'épithélium germinatif en noyaux de cellules germinales. Les transformations sont, avant tout, caractérisées par une augmentation de taille corrélative d'une régularisation de la forme.

L'épithélium germinatif d'A. subfuscus se compose de cellules à noyaux d'environ 6 μ . Les spermatogonies présentent au contraire des noyaux bien ronds, dont le diamètre atteint en moyenne 8 μ (Pl. I, fig. a). Cette évolution de la forme s'accompagne d'une transformation très sensible de la chromatine. Abondante et uniformément répartie en grains grossiers dans les noyaux épithéliaux,

elle semble se raréfier au cours de l'évolution spermatogoniale. Les amas chromatiniens deviennent, en définitive, périphériques. Le centre du noyau, pratiquement libre de chromatine, montre alors le plus souvent un et parfois deux nucléoles très nets. Ce même noyau est entouré d'une fine couche cytoplasmique.

Ce stade correspond à ce que ABELOOS (1944) appelle phase infantile.

2 - Stade 2 = Stade d'apparition des ovocytes ou Phase juvénile

a) La lignée femelle

L'apparition de la lignée femelle, encore indistincte pendant le stade infantile, marque l'avènement de cette phase nommée juvénile par ABELOOS (1944). A partir de ce stade, il y a hermaphrodisme vrai avec présence d'acini mixtes. De jeunes ovocytes, au début de leur phase de croissance (15 à 50 μ de diamètre), sont reconnaissables parmi les autres gonocytes grâce à leur vésicule germinative (Pl. I, fig. b).

Vers l'âge de cinq mois, on peut observer d'assez nombreux stades de préméiose ovocytaire, première étape de la différenciation de la lignée femelle.

Selon AUBRY (1962), chez L. stagnalis et Helix, les éléments femelles auraient, en microscopie optique, dès le début, une valeur d'ovocyte car ils ne se divisent jamais et entrent directement en accroissement.

D'après nos observations, en microscopie photonique, ces ovocytes semblent provenir de l'évolution de cellules à noyaux présentant un diamètre plus grand (10 μ) qui sont en nombre très réduit dans la totalité de la glande (Pl. I, fig. c).

Depuis BRACHET (1933), le comportement de l'ARN au cours de la gamétogenèse a été étudié chez de nombreuses espèces animales. On peut considérer que la teneur en ARN décroît au fur et à mesure que se poursuit la gamétogenèse. A. subfuscus ne fait pas exception à la règle. Dans la gonade jeune, les ovocytes au début de leur croissance manifestent une basophilie importante, révélatrice d'une teneur élevée en ARN. Cette observation est retrouvée par COWDEN (1962) à la suite d'études cytochimiques chez D. reticulatum et Arion.

Il faut signaler que de nombreux ovocytes de ce stade n'atteignent jamais la maturité mais, au contraire, dégénèrent, ce qui se traduit par des changements dans leur aspect cytologique, à savoir une réaction plus sombre à la coloration, un cytoplasme vacuolisé (Pl. I, fig. d) et, finalement un noyau pycnotique.

b) La lignée mâle

A l'inverse de ce qui se passe pour la lignée femelle où la multiplication goniale est absente ou très réduite, la lignée spermatogénétique débute par une intense multiplication des spermatogonies.

Cette phase se prolonge plusieurs mois durant, tandis que la glande croît et se subdivise en acini, jusqu'au moment où les éléments mâles entrent à leur tour en maturation.

3 - Stade 3 = Stade Spermatocytes - Spermatides

a) La lignée femelle

Quelques ovocytes dégénérescents sont entourés par des cellules germinales mâles en développement. Cependant, tous les ovocytes ne dégèrent pas, de très nombreux survivent et continuent leur croissance qui s'achèvera au stade femelle, ce qui se traduit par une augmentation de leur diamètre (60 μ maximum à ce stade).

b) La lignée mâle

On observe les événements nucléaires de la préméiose des spermatocytes, rapidement suivie par les deux divisions de maturation.

Les spermatocytes I sont fréquemment décrits en groupes réguliers assemblés radialement autour d'une cellule nourricière et présentent un gros noyau (Pl. II, fig. a).

Selon WATTS (1952), le passage du spermatocyte I au spermatocyte II est très rapide et ne peut être décrit.

Le spermatocyte II, qui résulte de la première division de maturation, diffère du spermatocyte I par son noyau plus petit.

En fin de stade 3, on relève de petits groupes de spermatocytes donnant naissance aux spermatides par méiose.

La jeune spermatide est ovale, à noyau sphérique situé à l'extrémité qui deviendra la région antérieure du spermatozoïde.

Finalement, les spermatides se trouvent disposées en bouquet autour d'une cellule nourricière ou sur les parois de l'acinus (Pl. II, fig. a).

4 - Stade 4 = Stade Mature

a) La lignée femelle

Les ovocytes sont assez gros (25 à 100 μ) et faiblement colorables (Pl. II, fig. c). D'assez nombreux sont en fin de croissance puisque l'ovocyte mature présente un diamètre moyen de 110 μ .

b) La lignée mâle

Cette phase, marquée par la présence de spermatozoïdes (Pl. II, fig. b, e, f) est équivalente de la phase de maturité (ABELOOS, 1944).

En début de stade, quelques spermatocytes sont encore présents, les spermatides prédominent mais on trouve quelques faisceaux de spermatozoïdes attachés à des cellules nourricières (Pl. II, fig. b). Les gamètes mâles peuvent parfois être disposés autour d'un ovocyte dégénéré (Pl. II, fig. d), observation retrouvée par LÜSIS chez A. ater (1961).

En fin de stade, quelques groupes de spermatides subsistent mais les spermatozoïdes sont en majorité et vont commencer à être libérés dans le canal hermaphrodite.

5 - Stade 5 = Stade femelle après décharge des spermatozoïdes

Ce stade se termine généralement par la mort de l'animal et dure environ un mois.

a) La lignée femelle

Les ovocytes ont achevé leur croissance et sont à présent matures, présentant un diamètre d'environ 110 μ . Leur cytoplasme est rempli de vitellus et une membrane primaire ou vitelline les entoure (Pl. III, fig. a, b, c). Ils sont alors prêts à quitter la glande hermaphrodite.

L'évolution de l'oeuf dans le canal hermaphrodite n'a pas été suivie, à ce niveau a lieu la méiose et l'émission des globules polaires (RAVEN et COLL, 1958) ; nous nous sommes intéressés uniquement aux transformations que subit l'ovocyte dans l'ovotestis.

b) La lignée mâle

Dans un premier temps, quelques rares spermatozoïdes, non évacués, sont encore présents (Pl. III, fig. a). AUBRY a fait la même observation chez L. stagnalis (1954 c). En fin de stade, la lignée mâle n'est plus représentée (Pl. III, fig. b et c).

c) Les cellules nourricières

Tandis que ce stade se termine, les cellules nourricières, dont le cytoplasme devient granuleux, s'étendent comme des languettes dans la lumière de l'acinus et parfois le remplissent complètement (Pl. III, fig. c) ; on a alors une atrophie partielle de la gonade qui précèdera l'atrophie complète.

Ces cellules nourricières hypertrophiées ont perdu leur fonction normale : support et nutrition des gamètes mâles (LÜSIS, 1961).

6 - Stade 6 = Stade Atrophie complète de la gonade

Après libération des ovocytes (ponte), toutes les cellules nourricières s'hypertrophient et les lumières des acini sont ainsi oblitérées. Aucun gamète n'est présent (Pl. III, fig. d).

Cette atrophie de la gonade est définitive, il n'y aura pas restauration de l'épithélium germinatif.

III - NOTION D'HERMAPHRODISME

1 - Définition de l'hermaphrodisme chez les Mollusques Gastéropodes

L'hermaphrodisme est une caractéristique générale des Gastéropodes Pulmonés.

PELSENEER (1894) considère comme hermaphrodites les Mollusques qui présentent en même temps les gamètes mâles et femelles.

A la suite des travaux de COE (1945), on peut admettre comme hermaphrodite tout individu présentant des cellules germinales de chacun des deux sexes mûrissant dans une même période ou dans des périodes successives de son cycle vital.

BACCI (1951 b), afin de regrouper tous les cas d'hermaphrodisme inclus dans cette définition, propose la classification suivante où il distingue deux types d'hermaphrodites :

- Les hermaphrodites simultanés, caractérisés par la maturation synchrone de leurs deux sortes de gamètes.

- Les hermaphrodites successifs, pouvant présenter deux cas :

* les cas de maturation asynchrone où les gonocytes mâles et femelles coexistent mais ne mûrissent pas simultanément,

* les cas de maturation distincte où phase mâle et phase femelle sont bien séparées dans le temps.

2 - Caractéristiques de l'hermaphrodisme chez A. subfuscus

La croissance des ovocytes se poursuivant durant toute la spermatogenèse, la gonade présente, selon la classification de COE (1945), un hermaphrodisme fonctionnel (puisque gamètes mâles et femelles mûrissent au cours de la même période) avec toutefois protandrie.

Cependant, il faut bien souligner que s'il y a bien chez A. subfuscus hermaphrodisme protandrique cela ne veut pas dire que la spermatogenèse s'effectue avant l'ovogenèse mais que les spermatozoïdes sont mûrs avant les ovocytes.

A. subfuscus se range donc parmi les hermaphrodites successifs à maturation asynchrone selon BACCI (1951 b).

A ce sujet, il faut noter que la protandrie n'est pas une règle générale chez les Pulmonés. ZANNINI (1960) constate que les ovogonies apparaissent avant les spermatogonies dans la gonade d'Helix cincta Müller.

L'existence de deux catégories de gonocytes dans la gonade pose alors deux problèmes :

1°/ La cellule indifférenciée donne-t-elle naissance aux deux types cellulaires mâle et femelle ou alors spermatogonies et ovogonies sont-elles issues de deux catégories cellulaires d'aspect différent ?

Pour résoudre ce problème, une fixation en microscopie électronique s'impose pour constater si, durant les stades allant de l'éclosion à la fin de la phase infantile, on décèle la présence d'un ou de plusieurs types cellulaires susceptibles d'évoluer dans le sens mâle ou femelle.

2°/ Quels sont les facteurs contrôlant la différenciation sexuelle ? L'expérimentation in vivo et in vitro, relative au complexe céphalique tentera d'amener des éléments de réponse.

DISCUSSION

Le problème de l'origine des deux lignées mâle et femelle n'est pas résolu. ANCEL (1903) chez H. pomatia pense qu'elle est la même pour les gonocytes mâles et femelles. Dans la glande génitale de l'escargot, la cellule sexuelle serait, pendant un certain temps, indifférenciée et se trouverait, à ce moment, susceptible d'évoluer dans le sens mâle ou dans le sens femelle. La présence d'éléments nourriciers dans son voisinage l'orientant dans le sens femelle.

Pour GUYARD (1971), l'étude ultrastructurale chez H. aspersa ne distingue qu'une seule catégorie cellulaire dans l'épithélium germinatif, "les futurs gamètes procèdent donc des mêmes cellules morphologiquement indifférenciées".

GALANGAU (1969), en microscopie électronique, constate chez M. gagates que la gonie de première génération est située contre la paroi de l'acinus. C'est une cellule de 15 μ à gros noyau contenant des amas de chromatine épars. Cependant, dans la morphologie des gonies primitives, cet auteur n'a pu observer aucune différence ultrastructurale permettant de dire que les unes donneront naissance à la lignée mâle, les autres à la lignée femelle.

Seule une étude ultrastructurale, en cours, permettra d'élucider ce problème chez les Arionidés.

D'après les observations en microscopie photonique, de nombreux auteurs pensent que, chez les Pulmonés, dès qu'une cellule femelle est reconnaissable elle est déjà en accroissement et que par conséquent on ne peut mettre histologiquement en évidence une cellule femelle qui ne soit déjà un ovocyte. Il n'y a pas de multiplication ovogoniale.

PLATNER (1885) admettait que, chez Helix, les spermatogonies et les ovogonies sont intimement mélangées dans le cul de sac glandulaire et que rien ne permet de les différencier. Plus tard, les ovogonies émigreraient à la périphérie puis augmenteraient de volume et se transformeraient en ovocytes.

Selon ANCEL (1903), les spermatogonies au repos chez Limax paraissent absolument semblables aux très jeunes cellules femelles ; seules les mitoses plus nombreuses qu'elles présentent pourraient permettre de les reconnaître. QUATTIRINI et LANZA (1965), également, ont remarqué chez Vaginulus borellianus Colosi (Veronicellidae) que les spermatogonies de première génération, contrairement aux ovogonies, avant de se transformer en spermatoocytes subissent cinq à six divisions multiplicatives.

Donc, si le stade ovogonie paraît difficilement décelable, il semblerait cependant, d'après nos observations, que les cellules à l'origine de la lignée femelle chez A. subfuscus, et que l'on pourrait qualifier de l'appellation d'ovogonies, soient des éléments de taille supérieure à celle des ~~spermatogonies~~ spermatogonies (10 μ contre 6 μ) et à chromatine nettement moins marquée (Pl. I, fig. c). De plus, la microscopie optique ne révèle ces éléments que vers l'âge de deux mois chez des animaux d'élevage.

Cependant, seule la microscopie électronique permet de les distinguer nettement.

Le phénomène de dégénérescence ovocytaire, surtout remarquable au cours de la seconde moitié de la phase juvénile, est retrouvé chez quelques Pulmonés, notamment A. ater rufus (LÛSIS, 1961) et Agriolimax reticulatus (RUNHAM et LARYAEA, 1968). De même, JOOSSE, BOER et CORNELISSE (1968) constatent que des ovocytes dégénérescents peuvent être observés dans l'ovotestis de L. stagnalis de tout âge, notamment durant toute la période de vie adulte.

CONCLUSION

Les Arionidés A. subfuscus, qui a fait l'objet de nos études, et A. ater expérimenté par LÛSIS (1961) et SMITH (1966) sont des animaux à cycle annuel. Ils possèdent une seule période de ponte dans leur vie, contrairement aux Limacidés M. gagates (GALANGAU, 1964) et A. reticulatus, ce dernier en présentant trois.

La maturité mâle survient peu avant la maturité femelle, bien que l'ovogenèse soit contemporaine de la spermatogenèse ; excepté durant le premier mois et la phase femelle on a toujours des acini mixtes.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DU DETERMINISME ENDOCRINE DE LA
DIFFERENCIATION SEXUELLE CHEZ A. SUBFUSCUS

INTRODUCTION

Peu de travaux ont été entrepris in vivo chez les Gastéropodes autres que les Arionidés.

HEKSTRA et LEVER (1960) constatent que l'ablation des ganglions cérébroïdes de L. stagnalis supprime la ponte. JOOSSE (1964) en procédant, chez le même animal, à la destruction élective des corps dorsaux empêche l'oviposition, ceci étant dû non pas à une baisse dans la production des ovogonies mais à un arrêt de la vitellogénèse (JOOSSE et GERAERTS 1969).

VICENTE (1963) chez Aplysia rosea Rathke empêche la ponte par ablation des ganglions cérébroïdes et montre (1969) que le rhinophore exerce une action inhibitrice sur les phénomènes reproducteurs.

KUPFFERMANN (1970) obtient chez Aplysia une stimulation de la ponte en injectant des homogénats de ganglions pariéto-viscéraux, où se situent des cellules neurosécrétrices nommées "bag cells".

CHOQUET (1969) admet chez Patella vulgata Linné, à la suite d'ablations de tentacules et de cerveaux, que le système nerveux central intervient dans le maintien d'une gamétogénèse normale et que le tentacule est inactif chez les animaux juvéniles et en période de reproduction.

LUBET, STREIFF, SILBERZAHN, LEBRETON (1969) démontrent, par ablation, que les ganglions cérébroïdes de Crepidula fornicata Philippi assurent les divisions goniales et la détermination mâle de la gonade. Par contre, les ganglions pleuraux n'ont aucun effet ni sur la gamétogénèse ni sur le changement de sexe.

En revanche, la méthode des cultures organotypiques a permis grâce aux associations d'organes d'obtenir des résultats plus nets. STREIFF (1967) prouve chez le Prosobranch Calyptraea sinensis Linné que le cycle de la gonade est régi par une hormone cérébrale masculinisante inhibitrice de l'autodifférenciation ovarienne et une hormone cérébrale de déclenchement de la prévitellogénèse.

Par la même technique, CHOQUET (1969) conclut que le tentacule se comporte comme un centre inhibiteur de la lignée mâle chez P. vulgata et qu'un facteur hormonal diffusant à partir des ganglions cérébroïdes stimule, au contraire, les mitoses de la lignée mâle.

GOMOT et GUYARD (1967), GUYARD (1967, 1969, 1971) démontrent in vitro que deux facteurs interviennent dans la réalisation de la gamétogénèse d'H. aspersa : un facteur d'origine tentaculaire dont l'effet principal est d'inhiber

la tendance spontanée des gonocytes à l'autodifférenciation ovocytaire ; un facteur issu des ganglions cérébroïdes favorisant l'accroissement des ovocytes et la différenciation des spermatogonies.

GRIFFOND (1969) observe en culture l'apparition de grosses cellules à aspect ovocytaire dans les testicules isolés de Viviparus viviparus Linné. Dans des associations testicules-ganglions cérébroïdes des "femelles", le nombre de ces grosses cellules est encore plus important.

LUBET, STREIFF, SILBERZAHN et LEBRETON (1969) confirment in vitro les résultats obtenus in vivo quant à l'influence des ganglions cérébroïdes chez C. fornicata. Pour LUBET et STREIFF (1969), un phénomène d'autodifférenciation ovarienne semble exister chez Crepidula.

VIANEY-LIAUD (1970), à la suite d'associations gonade-collier nerveux émet l'hypothèse que ce dernier produirait, chez Australorbis glabratus Say., un facteur "permettant aux spermatogonies d'effectuer la répllication d'ADN de la méiose et les divisions méiotiques."

Ces résultats semblent en faveur de l'existence d'un déterminisme endocrine de la sexualité chez ces Gastéropodes.

Nous avons entrepris l'étude du déterminisme de la différenciation sexuelle, chez A. subfuscus, in vivo par ablations de tentacules oculaires et in vitro par la méthode des cultures organotypiques.

Dans un premier temps, nous examinerons les résultats d'une étude histologique du complexe céphalique essentiellement consacrée au tentacule oculaire.

Les second et troisième chapitres seront consacrés à l'expérimentation in vivo et le quatrième aux cultures d'organes.

CHAPITRE I

ORGANES PRESUMES ENDOCRINES CHEZ LES ARIONIDES

Avant d'entamer l'étude du déterminisme de la différenciation sexuelle, il convient de décrire les organes susceptibles d'être impliqués dans ce phénomène.

I - LA GONADE

LAVIOLETTE (1954), à la suite d'opérations réalisées chez les Arionidés A. rufus L., A. subfuscus, Kobeltia hortensis Ferrussac et les Limacidés L. maximus, Limax flavus Linné, A. agrestis constate qu'une corrélation existe entre l'état de différenciation de la gonade et le développement morphologique des différentes parties du tractus génital.

Dans le cas des greffes réalisées, l'absence de lien anatomique entre le tissu germinatif actif et l'organe effecteur permet de rejeter l'hypothèse d'une médiation nerveuse.

Selon cet auteur, on peut admettre, "avec le maximum de vraisemblance, l'existence d'un mécanisme humoral authentique."

Cependant un problème reste entier : quel est, parmi les types cellulaires présents dans la gonade, celui auquel on peut attribuer la sécrétion de la substance active ?

Pour LAVIOLETTE, on ne peut a priori écarter l'hypothèse d'une élaboration de la substance par les éléments germinatifs eux-mêmes, ce qui se rapprocherait des observations de DURCHON (1952) qui a démontré, chez les Néréidiens, l'existence d'un mécanisme inducteur de l'épitoque consécutive à l'injection de produits génitaux. Mais, s'il n'exclut pas la possibilité d'un rôle des cellules nourricières, il ne semble pas prendre en considération le conjonctif périlobulaire qui est très peu abondant.

II - L'ORGANE DE SEMPER

Situé entre le bulbe buccal et le tentacule inférieur, il comporte des cellules à activité sécrétoire cyclique, dont le cytoplasme contiendrait des granulations, interprétées comme étant des produits à affinité semblable à celle de granules de neurosécrétion par LANE (1964 e), qui considère cet organe comme une glande endocrine spécifique des Stylommatophores.

Par contre, pour RUNHAM et HUNTER (1970), ce serait un assemblage de glandes muqueuses et de ganglions nerveux sensoriels qui n'aurait aucune fonction endocrine. De même, les observations de VAN MOL (1967) chez A. rufus L. rejétaient l'hypothèse de LANE ; il s'agit d'une glande exocrine. Son rôle est inconnu et sa position en rend difficile l'accès expérimental.

III - LA GLANDE CEPHALIQUE

C'est VAN MOL (1960) qui le premier a décrit, chez A. rufus L., cette glande.

Dérivé embryologique d'une invagination ectodermique se mettant en rapport avec le procérébron, elle se présente sous la forme d'une vésicule creuse remplie d'amas de sécrétion.

VAN MOL considère cet organe comme une glande endocrine dont le taux d'activité pourrait être en rapport avec la croissance. En effet, la sécrétion apparaît dès le jeune âge, s'accumule au cours de la croissance, et persiste à un état maximum jusqu'à un stade proche de la puberté. Elle commence alors à se résorber en même temps que la glande régresse et, à l'issue de la période de reproduction, la glande réduite à un cordon cellulaire n'en renferme plus.

Cependant, NOLTE et KUHLMANN (1964) puis RÖHNISCH (1964), dont les études portent essentiellement sur H. pomatia et H. aspersa, dénie toute fonction endocrine à cette glande.

IV - LE COMPLEXE CEPHALIQUE TENTACULES OCULAIRES - CERVEAU

Si les trois organes précédents semblent avoir une fonction endocrine, parfois discutée, la gonade a un rôle dans la différenciation du tractus génital, la glande céphalique semble agir sur la croissance et l'organe de Semper, de fonction inconnue, a un accès expérimental difficile en rapport avec sa localisation.

Le but de nos recherches ayant trait à la différenciation sexuelle, notre étude a essentiellement porté sur le tentacule oculaire et sur le cerveau qui, depuis les travaux de PELLUET et LANE (1961) puis PELLUET (1964) semblaient avoir la part importante dans cette différenciation.

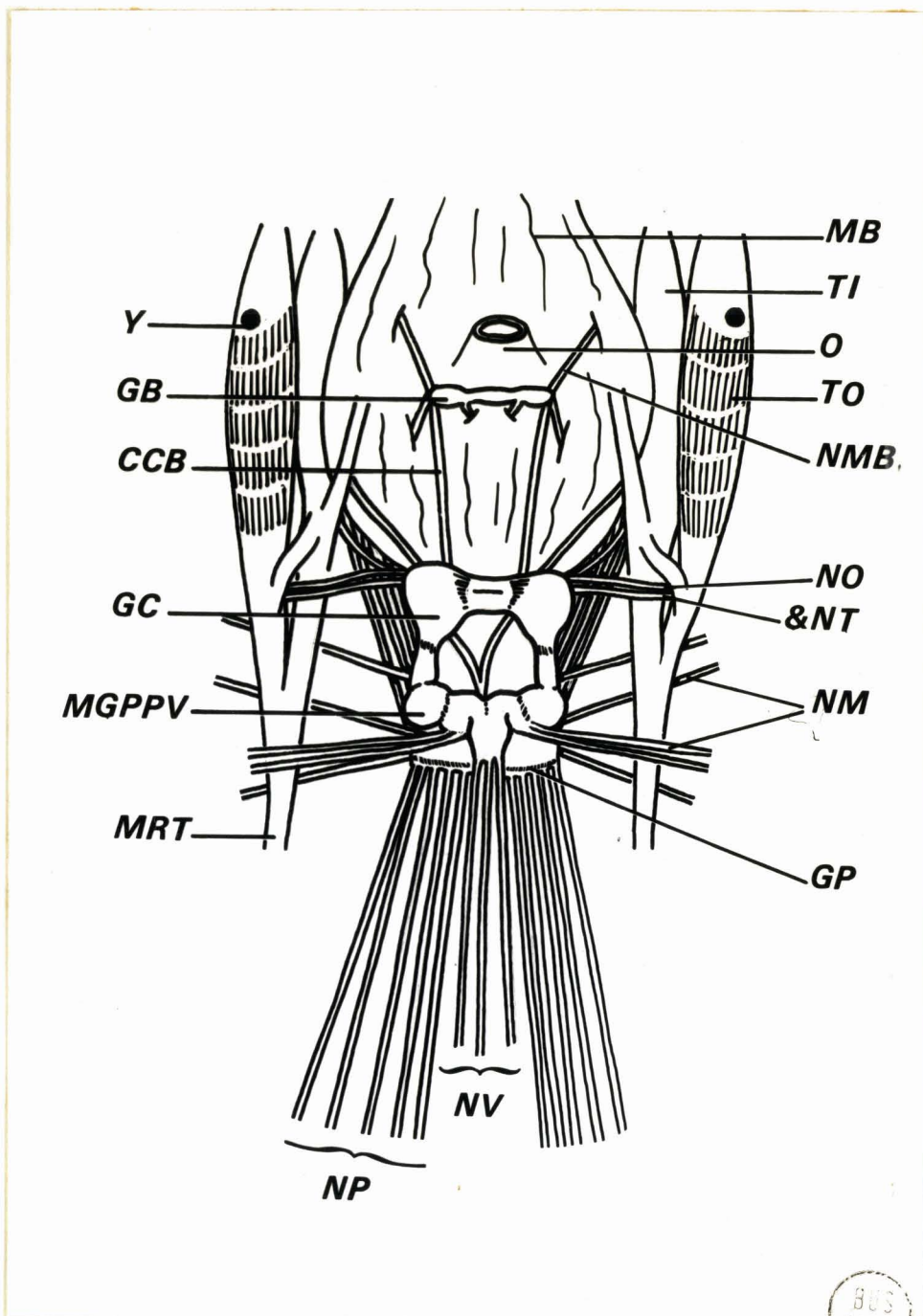


Figure 2 - Le complexe céphalique

CCB : connectif cérébro-buccal

GB : ganglion buccal

GC : ganglion cérébroïde

GP : ganglion pédieux

MB : masse buccale

MGPV : masse ganglionnaire pleuro-
pariéto-viscérale

MRT : muscle rétracteur tentaculaire

NM : nerfs du manteau

NMB : nerfs de la masse buccale

NO et NT : nerf optique et nerf ten-
taculaire

NP : nerfs pédieux

NV : nerfs viscéraux

O : oesophage

TI : tentacule inférieur

TO : tentacule oculaire

Y : oeil

1 - Le tentacule oculaire : observations personnelles

Si de nombreuses études ont été entreprises chez Helix, où notamment TUZET, SANCHEZ et PAVANS de CECCATTY (1957), SANCHEZ et BORD (1958) et SANCHEZ (1963) ont montré que les différents types cellulaires Gomori positifs du tentacule oculaire ont une fonction neuroendocrine, peu l'ont été chez les Arionidés où seuls LANE (1962), BIERBAUER et TÖRÖK (1968), BIERBAUER et VIGH-TEICHMANN (1970) font allusion à Arion circumscriptus bien qu'ils ne donnent que des images relatives à d'autres Stylommatophores.

a) Structure

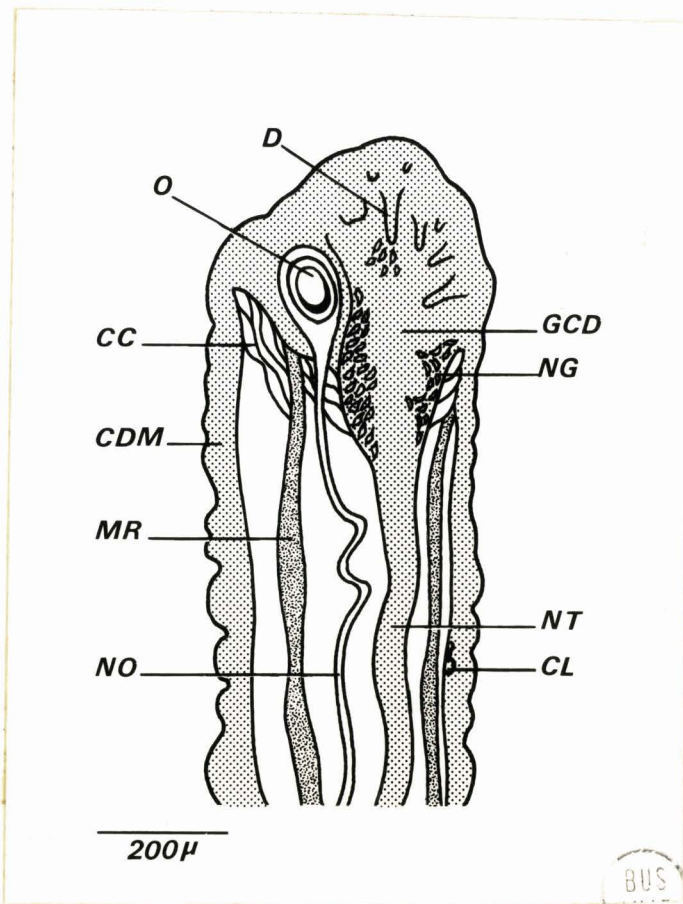


Figure 3 - Le tentacule oculaire des Pulmonés (d'après LANE)

CC : cellules en collier

NG : neurones ganglionnaires

CDM : couche "dermo-musculaire"

NO : nerf optique

CL : cellules latérales

NT : nerf tentaculaire

D : digitations

MR : muscle rétracteur du tentacule

GCD : ganglion central digité

O : oeil

Les Arionidés, Stylommatophores, possèdent deux paires de tentacules, les yeux étant pédonculés.

Le tentacule oculaire d'A. subfuscus, rétractile, possède une structure assez semblable à celle des autres Stylommatophores déjà étudiés (Fig. 3). L'oeil est localisé le long du ganglion central digité, à l'extrémité distale du tentacule oculaire en extension (Pl. IV, fig. b).

Entre la couche "dermo-musculaire" et le ganglion, on distingue des faisceaux musculaires constituant les muscles rétracteurs du tentacule.

L'épithélium externe est recouvert d'une cuticule.

Le ganglion central et l'oeil sont respectivement situés aux extrémités du gros nerf tentaculaire et du petit nerf optique. Le ganglion tentaculaire est digité et envoie des prolongements en forme de doigt de gant, composés de fibres nerveuses, vers l'extrémité tentaculaire.

Des neurones périphériques au ganglion digité envoient des axones dans la masse fibreuse centrale (Pl. IV, fig. a).

Entourant ce ganglion et l'oeil, on peut distinguer un collier de cellules formant un anneau incomplet (Pl. IV, fig. b), d'où le nom de "collar cells" donné par LANE (1962).

Les cellules en collier sont de taille supérieure aux neurones ganglionnaires classiques et leurs extrémités possèdent des prolongements se dirigeant vers le ganglion central. De plus, leur cytoplasme renferme de nombreux granules sphéroïdes (Pl. IV, fig. d). Des cellules similaires mais situées latéralement, les cellules latérales, présentent également des granules de sécrétion dans leur cytoplasme (Pl. IV, fig. c). Leur position éloignée du ganglion digité fait qu'aucune connexion avec celui-ci n'est visible.

b) Nature endocrine du tentacule

- Les cellules en collier

Ovales ou pyriformes, elles sont disposées en groupe autour du ganglion central digité, leurs extrémités s'étirent en prolongements assez souvent situés côte à côte. Rarement, on peut voir ces derniers entrer dans le ganglion central ou dans sa couche externe de neurones.

Leur cytoplasme est bourré de granules sphéroïdes réfringents apparaissant être des produits de sécrétion (Pl. IV, fig. d). Ces granules ne sont pas situés uniquement dans le corps cellulaire mais également dans les prolongements.

Ces cellules de 20 μ à 70 μ présentent un noyau sphérique, parfois elliptique et d'une taille de 15 μ en moyenne. Après coloration par la méthode de Clark, les granules se révèlent être Orangé G positifs et d'une taille moyenne de 1 μ .

* Les cellules latérales

De forme similaire aux cellules en collier, elles sont généralement de taille inférieure à celles-ci (10 à 30 μ de long) mais contiennent également des granules (Pl. IV, fig. c).

LANE distingue, chez H. aspersa, deux sortes de cellules latérales : ovales et à prolongements. Bien que toutes deux soient à prolongements, ceux des ovales seraient moins colorables.

Selon BIERBAUER et TÖRÖK (1968), il existerait des cellules A et B chez H. pomatia, les A correspondant aux cellules ovales.

Le type A présente une réaction négative au mucicarmin et à la réaction du PAS, ce qui le différencie du type B, les observations réalisées chez A. subfuscus semblant confirmer celles de BIERBAUER et VIGH-TEICHMANN (1970) chez divers Stylommatophores.

* Les granules de sécrétion

Chez les jeunes animaux, l'activité sécrétoire apparaît intense, les cellules en collier étant bourrées de granules (Pl. IV, fig. e). Cette activité se poursuit jusqu'à l'état adulte, des fixations régulières de tentacules oculaires d'âges différents montrant que les granules sont toujours en nombre à peu près constant. Cependant, ceux-ci sont moins nombreux et plus difficilement colorables par l'orangé G chez les animaux en phase femelle (Pl. IV, fig. f).

Ceci semblerait indiquer qu'en phase terminale du cycle génital, la sécrétion serait moins abondante que lorsque l'animal est en phase de croissance, contrairement aux observations de SMITH chez A. ater (1967).

L'activité des cellules latérales ne semble, par contre, pas varier au cours de la vie.

c) Discussion

Le tentacule oculaire possède deux sortes de cellules particulières appelées latérales et en collier. Par leurs morphologie et taille, elles diffèrent très nettement des autres types cellulaires rencontrés dans cet organe. LANE (1964), RÖHLICH et BIERBAUER (1966), après une étude ultra-

structurale chez des Stylommatophores non Arionidés, concluent que les cellules latérales présenteraient des caractères de cellules muqueuses.

Les résultats récents de BIERBAUER et VIGH-TEICHMANN (1970) prouvent, en s'appuyant sur des examens cytochimiques réalisés en microscopie photonique, que ces cellules sont exocrines, notamment chez A. circumscriptus.

Ce seraient les cellules en collier qui sécrèteraient l'"hormone" de cytodifférenciation de la gonade.

Le problème se posant alors est le suivant : peut-on qualifier ces cellules de neurosécrétrices ?

Certaines préparations montrent des prolongements cellulaires en connexion avec la masse digitée centrale. Il semble donc qu'il s'agisse de cellules nerveuses bien qu'elles soient de taille supérieure aux neurones normaux, leur nature sécrétoire se traduisant par la présence de granules sphériques.

D'après LANE (1962), ces cellules pourraient être considérées comme des neurones sensoriels modifiés. Cependant, le seul fait acquis est que ces "collar cells" sont sécrétoires.

Une étude ultrastructurale chez les Arionidés est envisagée pour éventuellement établir un cycle de sécrétion non apparent en microscopie photonique.

Si aucun organe neurohémal n'a été décrit chez les Arionidés, des vaisseaux sanguins s'étendent dans les tentacules oculaires. Selon LANE (1962), le produit de sécrétion pourrait être déversé directement dans le sang à partir soit des cellules en collier soit de la masse ganglionnaire tentaculaire.

2 - Le cerveau

a) Historique : Les cellules neurosécrétrices des centres nerveux

Les neurones des Gastéropodes sont connus depuis longtemps pour renfermer un grand nombre d'inclusions cytoplasmiques de nature complexe : lipides associés à une protéine (SIMPSON; BERN et NISHIOKA, 1963) ; ces substances, à l'heure actuelle, sont considérées comme des produits de déchet. La présence presque constante de ces inclusions retrouvées dans la plupart des neurones du collier oesophagien (KRAUSE, 1960 ; QUATTRINI, 1963 ; KUHLMANN, 1963 ; BOER, 1963 ; LANE, 1964) et leur colorabilité par les techniques de mise en évidence de la neurosécrétion expliquent l'utilisation parfois abusive du terme de cellule neurosécrétrice utilisée chez les Gastéropodes.

BERN (1963) a précisé la définition de la cellule neurosécrétrice : une telle cellule doit non seulement renfermer des inclusions figurées dans le péricaryon et le long de son axone, mais encore ces axones doivent-ils présenter un étroit contact avec un vaisseau sanguin, contact au niveau duquel la sécrétion est déversée dans le système circulatoire, à la manière d'une hormone.

En d'autres termes, il doit exister un système neurohémal.

Chez les Arionidés, il existe des cellules neurosécrétrices localisées dans les ganglions cérébroïdes. VAN MOL (1960) chez A. rufus L. en décrit, toujours groupées dans les couches les plus périphériques de la partie dorsale et commissurale du mesocerebrum, ceci se retrouvant chez les Hélicidés (KUHLMANN 1963).

SMITH (1967), chez A. ater, observe de la neurosécrétion dans tous les ganglions constituant le cerveau et dans les ganglions buccaux. Si la sécrétion de la plupart de ces cellules neurosécrétrices ne semble pas en rapport avec le degré de maturation de l'animal, quelques cellules et plus particulièrement certaines, petites, situées dans la masse pleuro-pariéto-viscérale sécrètent plus activement durant le stade spermatozoïde.

NOLTE (1967) signale chez L. stagnalis deux types d'aires neurohémales : latérale et dorsale.

PENTREATH et COTTRELL (1970) ne font qu'émettre l'hypothèse de l'existence de telles zones chez H. pomatia.

Chez les Arionidés, seul VAN MOL (1960) décrit tout le long du nerf de l'artère cérébrale des traces importantes de neurosécrétion, à la suite de quoi, il pense avoir trouvé chez A. rufus L. une voie de cheminement de la neurosécrétion vers l'appareil circulatoire "semblable à celle qui existe entre la pars intercerebralis et les corpora cardiaca des Insectes qui se développent dans la paroi de l'aorte".

b) Observations personnelles

- Structure

Très concentré, le cerveau d'A. subfuscus forme un collier périoesophagien assez semblable à celui d'A. ater décrit par SMITH (1966). Il est formé de la fusion des neuf ganglions primitifs des Pulmonés en une structure complexe. Cependant, on peut subdiviser ce système nerveux central en trois masses ganglionnaires : supraoesophagienne, pleuro-pariéto-viscérale et pédieuse (Fig. 4).

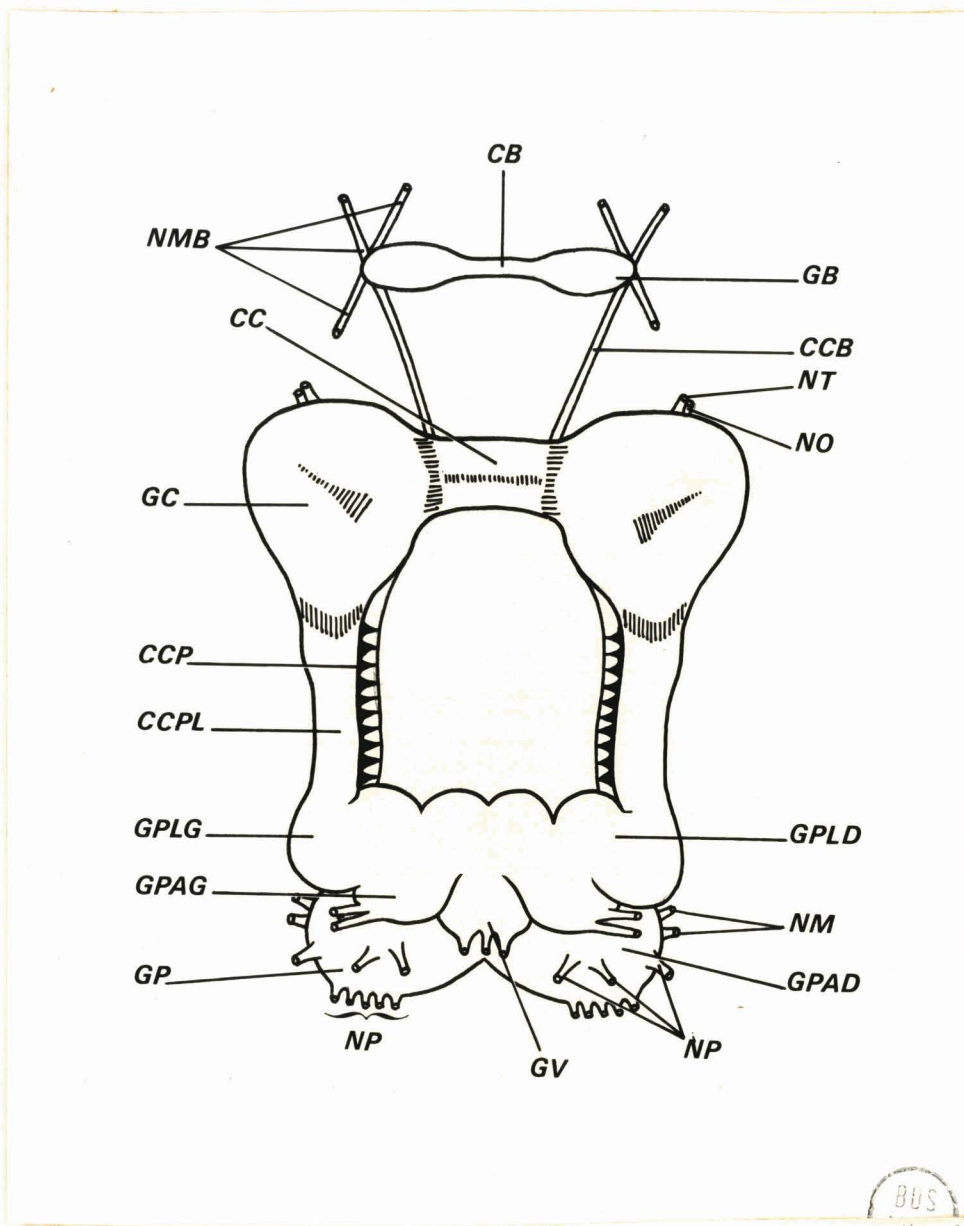


Figure 4 - Le cerveau

- | | |
|----------------------------------|---------------------------------|
| CB : commissure buccale | GPAG : ganglion pariétal gauche |
| CC : commissure cérébroïde | GPLD : ganglion pleural droit |
| CCB : connectif cérébro-buccal | GPLG : ganglion pleural gauche |
| CCP : connectif cérébro-pédieux | GV : ganglion viscéral |
| CCPL : connectif cérébro-pleural | NM : nerfs du manteau |
| GB : ganglion buccal | NMB : nerfs de la masse buccale |
| GC : ganglion cérébroïde | NO : nerf optique |
| GP : ganglion pédieux | NP : nerfs pédieux |
| GPAD : ganglion pariétal droit | NT : nerf tentaculaire |

* La masse ganglionnaire supraoesophagienne

Elle comprend deux ganglions cérébroïdes réunis par une commissure cérébrale supraoesophagienne, chaque ganglion se subdivisant en trois lobes : Procérébron, mésocérébron et métacérébron.

Le procérébron est latéral par rapport aux deux autres constituant le ganglion cérébroïde. Les nerfs optiques et tentaculaires en sont issus. L'intimité des rapports nerf tentaculaire-procérébron a été expérimentalement prouvée par les phénomènes de dégénérescence nerveuse apparaissant dans le procérébron après la section des nerfs chez A. rufus L. et A. agrestis (CHETAIL, 1963).

Le mésocérébron est la partie principale du ganglion cérébroïde, la commissure intercérébrale et le connectif cérébro-pleural y entrant. Le métacérébron lui est antérieur.

* La masse ganglionnaire pleuro-pariéto-viscérale

Elle est formée de la fusion des ganglions pleuraux et pariétaux latéraux et du ganglion viscéral médian.

* La masse ganglionnaire pédieuse

Plus ventrale, les nombreux nerfs pédieux en sont issus.

- Neurosécrétion cérébrale

Avec les réserves faites au sujet des Gastéropodes, nous avons trouvé de la neurosécrétion. Le chapitre consacré à la photopériode développe plus particulièrement ce point, avec des données encore très fragmentaires.

c) Discussion

L'expérimentation relative à cet organe n'est actuellement abordable qu'in vitro. Plus tard, une étude in vivo par injection d'extraits pourra être envisagée.

Il importera de bien localiser les différents types de cellules neurosécrétrices éventuellement présents dans le cerveau d'A. subfuscus. A la suite de quoi, il faudra essayer de mettre en rapport cycles neurosécrétoires et cycle génital, ceci pouvant permettre une expérimentation in vitro très précise relative à l'éventuelle action cérébrale sur la différenciation sexuelle.

V - CONCLUSION

L'expérimentation est nécessaire pour mettre en évidence une relation entre neurosécrétion et cycle génital.

Au point de vue endocrine, les deux organes à tester sont le tentacule oculaire et le cerveau.

Pour mettre en évidence leur rôle présumé endocrine, nous avons essentiellement pratiqué des ablations de tentacules/oculaires et réalisé des cultures organotypiques, cette dernière technique permettant de mettre en évidence l'action directe d'un organe sur un autre.

CHAPITRE II

ANALYSE EXPERIMENTALE DES EFFETS PRODUITS PAR ABLATIONS IN VIVO DES TENTACULES OCULAIRES

INTRODUCTION

PELLUET et LANE (1961) ont effectué des détentaculations chez de jeunes individus d'A. subfuscus, maintenus en expérience durant seulement trois à quatre semaines. De plus, ils n'ont envisagé l'effet de cette intervention que sur l'ovogenèse en enregistrant une augmentation du nombre d'ovocytes, certains acini en renfermant trois ou quatre.

Nous avons repris cette expérience sur A. subfuscus en opérant d'une part sur des jeunes dès l'éclosion et en effectuant des fixations régulières, d'autre part sur des individus plus âgés avec une durée d'expérimentation plus brève.

I - TECHNIQUE OPERATOIRE

Nous avons essentiellement réalisé des ablations bilatérales des tentacules oculaires, mais également quelques ablations unilatérales.

Les interventions sont effectuées après anesthésie préalable à l'anhydride carbonique qui provoque, chez la plupart des animaux, une extension du tentacule. L'ablation de ce dernier est facile à réaliser : saisi à l'aide de pinces, il est sectionné à la base, les cellules en collier et les cellules latérales étant ainsi éliminées. Cependant, la régénération de l'organe, et en particulier celle des cellules susceptibles de sécréter l'hormone (CHETAIL, 1956, 1963) rend obligatoire une résection périodique (tous les quinze jours) et complète du régénérat, spécialement chez les jeunes animaux où les tentacules peuvent se reformer rapidement, contrairement à ceux des adultes.

II - RESULTATS

1 - Ablation des tentacules oculaires dès l'éclosion

La série expérimentale présentement réalisée a été effectuée sur un lot d'animaux issus d'une même ponte.

a) Influence sur la croissance pondérale

T : Témoins
DDG : Opérés ayant subi une
détentaculation bilatérale

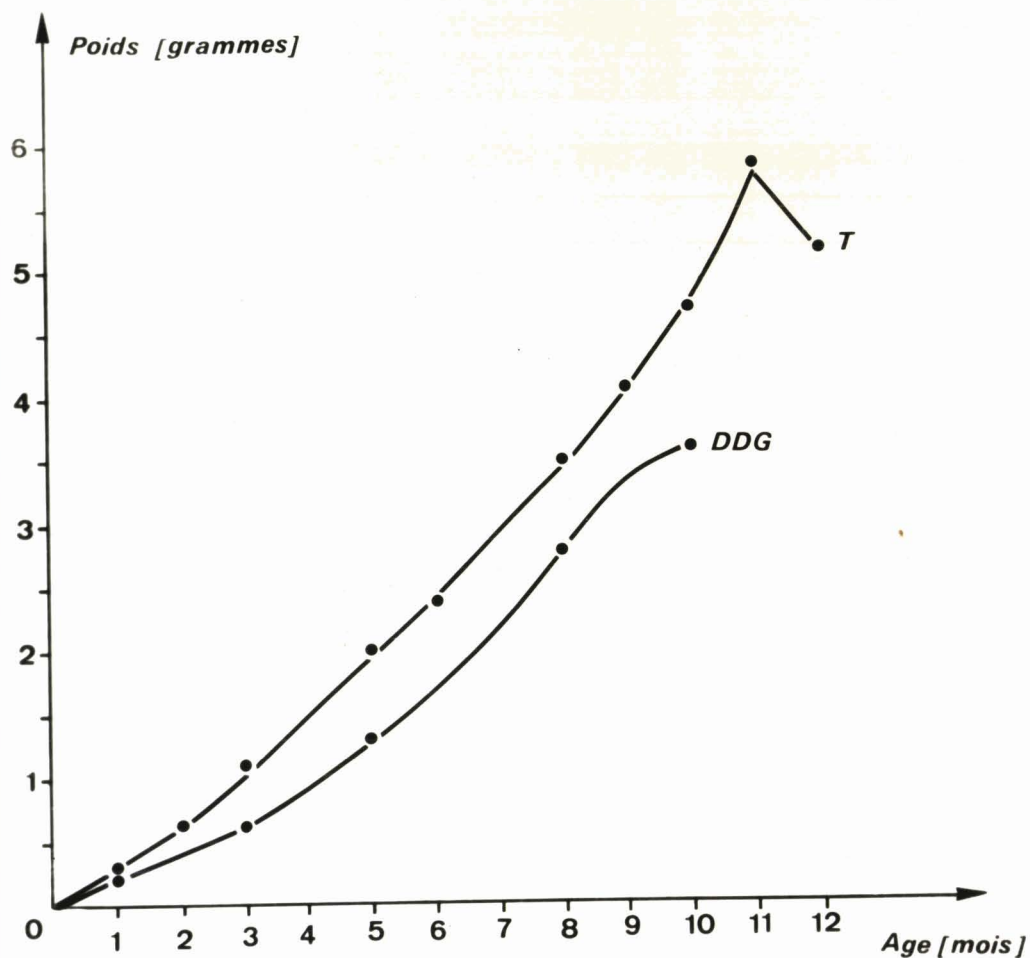


Figure 5 - Evolution pondérale moyenne d'A. subfuscus témoins et de détentaculés bilatéralement.

TABLEAU I - Evolution pondérale des opérés et des témoins.

Age de l'animal (mois)	Nombre d'animaux		Poids du corps (grammes)				
	T	O	T	DD	DG	DDG	
Eclosion	5	-	0,012	-	-	-	
1	5	5	0,3	0,24	0,21	0,20	
2	5	-	0,65	-	-	-	
3	5	5	1,10	0,70	0,80	0,60	
4	-	-	-	-	-	-	
5	5	5	2,00	1,40	1,50	1,30	
6	3	-	2,40	-	-	-	
7	-	-	-	-	-	-	
8	3	5	3,50	-	-	2,80	
9	3	-	4,10	-	-	-	
10	5	5	4,70	-	-	3,60	
11	3	-	5,80	-	-	-	
12	2	-	5,20	-	-	-	

T : Témoins

O : Opérés

DD : détentaculation droite

DG : détentaculation gauche

DDG : détentaculation bilatérale

La période de croissance, caractérisée par une augmentation du poids, dure onze mois dans les conditions climatiques et alimentaires définies précédemment. Les très rares animaux survivant à la période adulte entament alors une période de sénilité, se traduisant par une baisse irréversible du poids.

La courbe de croissance (Fig. 5), obtenue par pesées régulières de témoins (Tableau I), présente un décours assez semblable à celles établies chez A. ater rufus par LÛSIS (1961), sur A. rufus par ABELOOS (1944) et STERN (1970) et chez Arion lusitanicus Mabilie par CHEVALLIER (1969).

Celle des opérés (Fig. 5) a sensiblement le même aspect que celle des témoins jusqu'à l'âge de huit mois. Il faut remarquer qu'à partir de cet âge, moment où la croissance de la gonade semble bloquée, on enregistre un écart plus net entre opérés et témoins.

Ainsi, on constate dès le début de l'expérimentation une diminution de la croissance des opérés qui cependant se nourrissent. Mais, l'appréciation quantitative de la nourriture absorbée étant difficile, on ne peut dire si cette différence est due à un effet direct consécutif à la tentaculectomie ou à un effet secondaire (prise de nourriture inférieure chez les opérés) dû à cette privation de tentacules oculaires.

b) Effet sur la différenciation sexuelle

α) Ablations bilatérales

Nous avons récapitulé dans le tableau II les résultats obtenus.

TABLEAU II - Evolution de la gamétogenèse chez les témoins et chez les animaux ayant subi une ablation bilatérale des tentacules oculaires.

Age de l'animal (à la fixation) (mois)	Nombre d'animaux fixés	Catégories cellulaires observées	ϕ_o (en μ)	N_o	Rapport D_o/D_m	Nombre de mitoses spermatogoniales	
T	0	T	0	T	0	T	0
1	5 : 5	Spermatogonies	0	0	-	31 : 28	
3	5 : 5	Spermatogonies rares : ovogonies	15 à 40	15 à 60	232 : 683	0,04 : 0,13	156 : 112
5	5 : 5	ovocytes	15 à 50	15 à 70	413 : 1256	0,05 : 0,14	243 : 156
8	3 : 5	Spermatocytes : Spermatozoides : Ovocytes	15 à 60	15 à 80	527 : 1812	-	-
10	5 : 5	Spermatocytes : Spermatozoides : zoïdes : Ovocytes	15 à 90		411 : 1760	-	-

T : témoins ; 0 : opérés ; ϕ_o : diamètre des ovocytes ; N_o : Nombre d'ovogonies et d'ovocytes par glande ; D_o : densité des ovogonies et des ovocytes ; D_m : densité des spermatogonies.

* Fixation à un mois

En fixant des opérés un mois après l'ablation, on constate qu'il ne semble pas possible de faire apparaître précocement des ovocytes ; témoins et détentaculés étant au stade immature.

* Fixation trois et cinq mois après détentaculation

- Chez les animaux sacrifiés trois mois après l'éclosion, on remarque que la détentaculation a entraîné, par rapport aux témoins qui se trouvent en phase juvénile (Pl. V, fig. a), une poussée ovocytaire très nette accompagnée d'une régression de la spermatogenèse, ce qui se traduit par un rapport D_o/D_m plus important chez les opérés.

L'opération exerce donc un effet quantitatif sur la lignée femelle, les ovogonies (stade très rarement retrouvé chez les témoins) et les ovocytes étant en nombre accru chez les détentaculés.

De plus, de nombreux ovocytes présentent une augmentation notable de leur diamètre qui peut atteindre 60μ (Pl. VI, fig. a).

Ainsi, dans l'ovotestis d'un animal détentaculé on peut observer tous les stades d'évolution semblant acheminer les acini vers une prédominance femelle. Dans un premier temps, certains acini renferment plusieurs ovogonies plutôt ovalaires, d'un diamètre de 10μ , à chromatine peu colorable et à cytoplasme réduit (Pl. VI, fig. b).

Dans une deuxième étape, on peut rencontrer des acini montrant plusieurs stades de prémioses ovocytaires (Pl. VI, fig. c).

Enfin, et c'est le cas le plus fréquent, de nombreux acini contiennent des ovocytes en phase d'accroissement, en quantité importante, Il n'est pas rare d'en trouver qui renferment quatre ou cinq ovocytes (Pl. V, fig. b), la moyenne chez les témoins étant de 1 à 2 ovocytes par acinus (Pl. V, fig. a). Quelques rares acini peuvent se féminiser fortement (Pl. V, fig. c) et même totalement (Pl. V, fig. d).

Opérés et témoins renferment des spermatogonies dans leur gonade mais les mitoses sont moins nombreuses chez les détentaculés.

- La fixation au bout de cinq mois, âge qui chez les témoins correspond à une phase juvénile avancée, confirme les différences enregistrées dès trois mois comme le montre le Tableau II.

* Fixation à huit mois

Si les témoins (Pl. VII, fig. a) présentent une gamétogenèse normale (apparition de spermatocytes et de quelques spermatides), les opérés voient celle-ci évoluer dans le sens femelle (Pl. VII, fig. b) : les ovocytes y sont toujours plus nombreux, les mitoses spermatogoniales assez rares et les stades spermatocytes et spermatides jamais rencontrés.

* Fixation à l'âge de dix mois

En premier lieu, il faut signaler que la croissance de la gonade des détentaculés est affectée par rapport à celle des témoins chez lesquels elle présente son développement maximum.

Au point de vue histologique, si les animaux contrôles présentent une gonade caractéristique d'un stade 4 (Pl. VII, fig. c), chez les opérés l'aspect de la glande génitale, nettement féminisée, n'est pas du tout typique. Il ne s'agit pas d'un blocage en phase juvénile étant donné la taille des ovocytes, leur nombre important et celui relativement restreint des spermatogonies, stade auquel la spermatogenèse semble bloquée (Tableau II ; Pl. VII, fig. d, e).

Il faut également remarquer qu'à côté de gros ovocytes d'un diamètre de 90 μ , on peut parfois trouver des ovocytes dégénérés, ce qui se rapproche des observations de SANCHEZ et SABLIER (1962) chez H. aspersa.

β) Ablations unilatérales

TABLEAU III - Evolution de la gamétogenèse chez les témoins et chez les animaux ayant subi l'ablation unilatérale d'un tentacule oculaire.

Age de l'animal (à la fixation) (mois)	Nombre d'animaux fixés			Catégories cellulaires observées			ϕ_0 (en μ)			N_0			Nombre de mitoses spermatogoniales		
	T	DD	DG	T	DD	DG	T	DD	DG	T	DD	DG	T	DD	DG
1	5	6	6	Spermatogonies			0			0			31	29	30
3	5	6	6	Spermatogonies			15	15	15	232	386	410	156	133	127
				Ovogonies			40	60	60						
5	5	6	6	Ovocytes			15	15	15	413	690	678	-	-	-
							50	65	65						

T : témoins ; DD : détentaculation droite ; DG : détentaculation gauche ; ϕ_0 : diamètre des ovocytes ; N_0 : nombre d'ovogonies et d'ovocytes par glande.

Les fixations de tels détentaculés n'ont été effectuées que jusqu'à l'âge de cinq mois ; les observations paraissant intermédiaires entre les témoins et les opérés bilatéralement tant au point de vue croissance pondérale (Tableau I) que gamétogenèse (Tableau III).

Ainsi, comme les résultats obtenus à la suite d'ablations droites ou gauches semblent le montrer, les deux tentacules oculaires sont équivalents, ce qui n'est pas le cas général (LEBRETON, 1969).

c) Influence sur la glande de l'albumine

A dix mois, la glande de l'albumine des opérés est moins grosse que celle des témoins, sa croissance ayant dû être affectée. L'état histologique de la gonade des détentaculés, où la spermiogenèse n'a pas lieu, pourrait expliquer ce résultat, étant donné l'influence de la gonade sur le développement de la glande de l'albumine (LAVIOLETTE, 1954).

Néanmoins, on y retrouve, comme dans la glande de l'albumine des adultes, du galactogène (Pl. VII, fig. f) dont il sera utile d'estimer le taux, MEENAKSHI et SCHEER (1969) ayant montré que l'ablation des tentacules oculaires provoque chez Ariolimax columbianus une augmentation du taux de galactogène au niveau de cette glande.

2 - Ablation des tentacules oculaires en phase juvénile (Stade 2)

A la suite de ce type d'opération, semblable à celui pratiqué par PELLUET et LANE (1961), on assiste, en un mois, dans certains acini à une poussée ovocytaire se traduisant par l'apparition de jeunes ovocytes pariétaux (Pl. VI, fig. d). Cependant d'autres ne semblent pas affectés.

3 - Ablation des tentacules oculaires en début de phase femelle (Stade 5)

Les fixations sont effectuées un mois après opération, c'est-à-dire avant la ponte. On retrouve chez les détentaculés de rares spermatozoïdes non évacués et les ovocytes matures ne semblent pas être affectés tant au point de vue qualitatif que quantitatif.

III - DISCUSSION

Chez les Pulmonés, en dehors des Arionidés, où des détentaculations ont été effectuées par PELLUET et LANE (1961) puis PELLUET (1964) et plus récemment par GOTTFRIED et DORFMAN (1970), de telles opérations ont été réalisées chez les Hélicidés et les Achatinidés.

Chez les Hélicidés, SANCHEZ et SABLIER (1962) après l'ablation des quatre tentacules sensoriels constatent que les processus de spermatogenèse et d'ovogenèse se déroulent normalement mais les divisions goniales sont moins nombreuses et les faisceaux de spermatozoïdes moins denses. De plus, les oeufs dégénèrent bien avant leur maturité. Les auteurs attribuent ces faits comme étant le résultat d'une dénutrition de la glande génitale consécutive à une perturbation de la régulation du métabolisme au niveau de l'hépto-pancréas.

KUHLMANN et NOLTE (1967), à la suite de détentaculations concluent à leur inefficacité sur la gamétogenèse d'H. pomatia après quatre mois d'expérimentation.

Après une observation portant sur un mois et demi, GOMOT, GRIFFOND et GUYARD (inédit) n'obtiennent aucune différence significative quant à la gamétogenèse d'H. aspersa sur des animaux opérés après avoir été tirés de l'hibernation.

Chez l'Achatinidé Achatina fulica Ferrussac, BERRY et CHAN (1968) obtiennent un accroissement du nombre des gros ovocytes en détentaculant des animaux d'âge déjà avancé.

Le tentacule oculaire a été testé chez d'autres Gastéropodes que les Pulmonés. CHOQUET (1969) admet que le tentacule juvénile du Prosobranché P. vulgata est inactif car il ne semble pas entraîner le déclenchement d'une spermatogenèse précoce. De plus, l'ablation chez les adultes n'entrave pas l'évolution des lignées mâle et femelle un ou deux mois après l'opération. Le tentacule serait donc également inactif pendant cette période.

Chez V. borrellianus (Soléolifère), RENZONI (1969) en procédant à des tentaculectomies dès l'âge de dix jours n'obtient au bout de six mois aucune différence relative à la numération ovocytaire chez les opérés.

VICENTE (1969), travaillant sur l'Opisthobranché A. rosea, remarque à la suite de résections tentaculaires une augmentation du nombre d'ovocytes.

A la suite de ces travaux, deux points sont à signaler. Les détentaculations n'ont jamais été effectuées dès l'éclosion, seules celles de RENZONI sont réalisées à dix jours. D'autre part, les auteurs, excepté SANCHEZ et SABLIER, ne se sont intéressés qu'à la numération des ovocytes et jamais au degré de maturation de ces derniers ni à la spermatogenèse.

Nos résultats sont en accord avec ceux de PELLUET et LANE (1961) et PELLUET (1964) mais en désaccord total avec ceux de GOTTFRIED et DORFMAN (1970); ils montrent que la privation de tentacules oculaires dès l'éclosion paraît lever une inhibition de l'ovogenèse, l'effet du tentacule étant essentiellement quantitatif. Corrélativement, le retard de spermatogenèse constaté chez les opérés fixés régulièrement se traduit par une diminution du nombre des spermatogonies et des mitoses spermatogoniales.

Il semble donc que le tentacule oculaire contrôle la gamétogenèse mais on ne peut dire si son effet est direct.

La tentaculectomie effectuée dès la naissance affecte également la croissance pondérale. De plus, la croissance réduite de la gonade passé l'âge de huit mois pourrait être la conséquence d'une dénutrition (SANCHEZ et SABLIER, 1962).

Le rôle du tentacule oculaire en phase immature reste énigmatique, les gonades de détentaculés fixés au bout de un mois présentant le même aspect histologique que celles des témoins.

IV - CONCLUSION

Les deux tentacules jouent un rôle équivalent et leur ablation, dès l'éclosion, a permis de démontrer leur action inhibitrice sur l'ovogenèse.

Les tentaculectomies effectuées à des stades plus avancés semblent prouver que, pendant la phase juvénile, le tentacule oculaire est actif et que l'"hormone" est présente à un taux élevé. Par contre, il serait inactif en phase femelle où l'"hormone" serait présente à un taux très bas ou même nul.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA REGENERATION GERMINALE CHEZ DES ANIMAUX CASTRES PRIVES OU NON DE TENTACULES OCULAIRES

INTRODUCTION

C'est LAVIOLETTE (1954) qui a observé le phénomène de régénération germinale en réalisant des castrations de jeunes A. rufus L. afin de compléter son étude du déterminisme humoral de la différenciation glandulaire du tractus génital. Il a montré que la gonade, réséquée au départ du canal hermaphrodite, était capable de régénérer chez des animaux âgés de un à six mois. Passé cet âge, l'opération n'est jamais suivie de régénération, ce qui confirme les résultats d'ABELOOS (1943) obtenus sur des animaux âgés de L. maximus. L'auteur pense qu'il y a alors ralentissement des processus de cicatrisation au niveau de la plaie.

BRISSE (1967), en opérant sur de jeunes individus, retrouve ce phénomène chez le Pulmoné Bulinus contortus (Michaud) truncatus (Audouin).

TARDY (1967), travaillant sur des Nudibranches du genre Aeolidiella, constate une régénération de la gonade à partir de cellules indifférenciées contenues dans les parois du canal hermaphrodite et de la vésicule séminale.

Cette possibilité qu'a la gonade de régénérer, chez les limaces, nous a permis de réaliser des castrations accompagnées ou non de détentaculations et d'observer la répartition des cellules germinales néoformées.

I - TECHNIQUE OPERATOIRE

Les animaux à opérer sont mis à jeûner vingt-quatre à quarante-huit heures avant l'intervention afin d'éviter les accidents dus à la réplétion du tube digestif.

Dans le cas où l'on effectue une détentaculation, celle-ci est réalisée deux jours avant la castration, afin que toute trace "hormonale" soit éliminée. Des résections régulières sont évidemment effectuées.

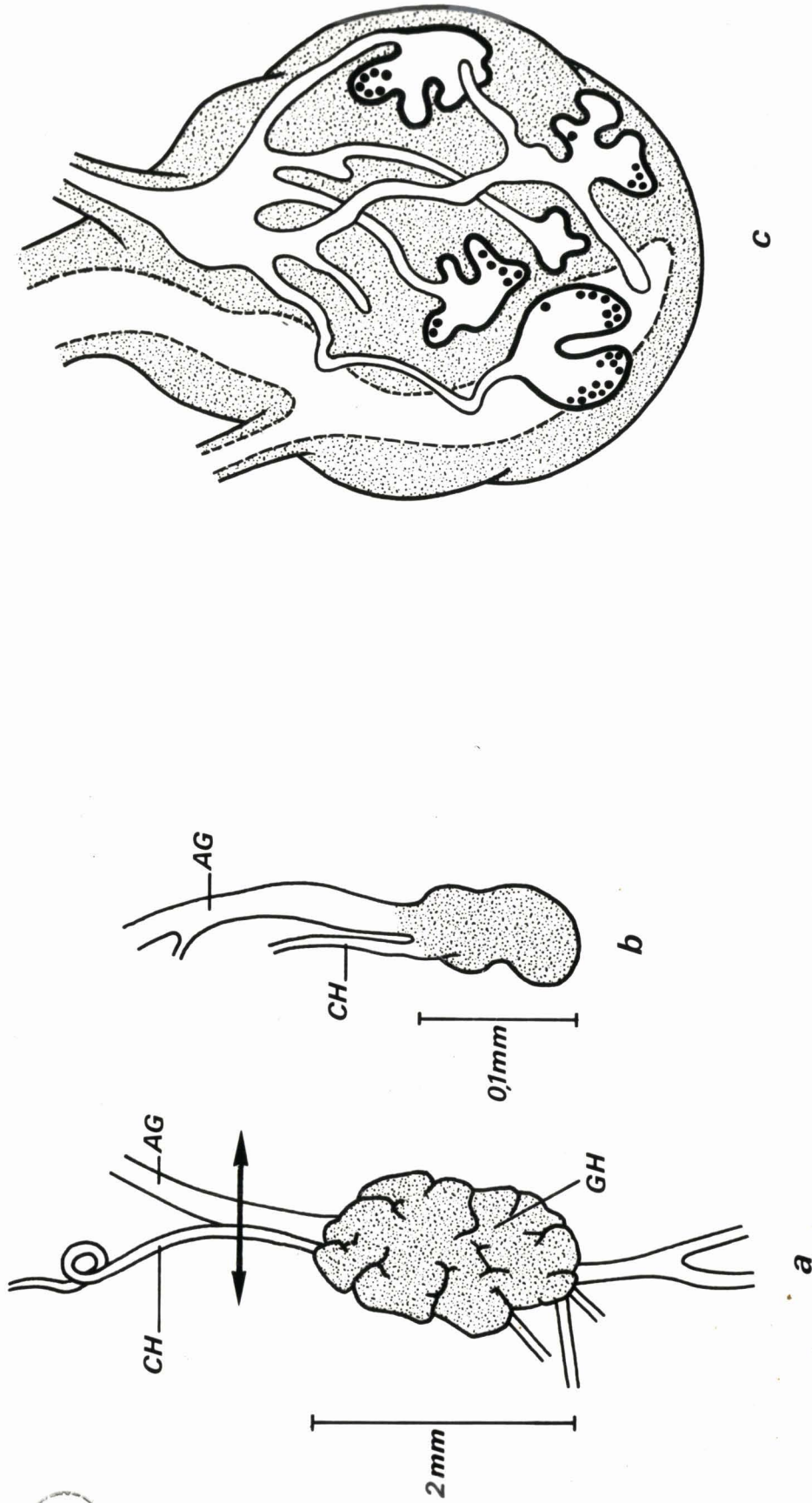


Figure 6 - La régénération germinale

a : Gonade au moment de l'ablation (le niveau de section est figuré par le trait fléché).

b : Régénérat de 6 semaines coiffant l'extrémité sectionnée de l'artère génitale et du canal hermaphrodite.

c : Reconstitution graphique simplifiée d'un régénérat au Stade IV : en traits pleins le canal hermaphrodite, les digitations et les cryptes dans lesquelles apparaissent les premières cellules germinales néoformées. En traits interrompus, l'artère génitale (d'après LAVIOLETTE chez *A. rufus* L.).

AG : artère génitale ; CH : canal hermaphrodite ; GH : glande hermaphrodite.

1 - Anesthésie

Elle a pour but de supprimer l'irritabilité des muscles de la paroi du corps et d'aboutir à un relâchement musculaire complet permettant la mise en place d'écarteurs en verre.

La technique, dérivée de celle préconisée par LAVIOLETTE (1954), comporte les temps suivants :

- a) Immersion dans une solution diluée d'acide nitrique et de formol (H₂O : 1000, NO₃H : 2, CHOH à 40 % : 3)

Ce mélange provoque une extension relativement rapide des animaux (7 à 8 minutes), s'accompagnant d'un rejet de mucus.

- b) Lavage à l'eau courante

Déposés dans un évier où un robinet entretient un courant d'eau abondant, les limaces rampent, en extension complète, et se débarrassent de leur gangue de mucus.

- c) Action de l'anhydride carbonique

En évitant autant que possible tout contact brutal qui le ferait aussitôt se rétracter, l'animal est transporté dans une boîte à fond d'ouate humidifiée, recouverte d'un opercule, et dans laquelle arrive le gaz. La durée de séjour est de l'ordre de trois minutes mais le comportement d'individus de même âge est sujet à des variations importantes.

- d) Action du froid

Afin d'achever la décontraction, les animaux sont soumis à l'action du froid par contact avec la glace fondante. Après quelques minutes, si le relâchement musculaire est convenable, l'opération proprement dite peut commencer. Deux cubes de glace, disposés de part et d'autre de la région antérieure du corps de l'opéré assurent, pendant la durée de l'intervention, l'entretien de l'anesthésie.

2 - Les actes opératoires

Après élimination de la couche de mucus recouvrant toujours le tégument, on pratique une incision médio-dorsale de trois millimètres de longueur que l'on pourra prolonger de un ou deux millimètres dans la direction convenable, étant donné la position très variable de la gonade par rapport au tégument.

Il faut agir rapidement, à cause de la réaction de l'opéré : rejet de mucus et contraction partielle de la musculature de la région lésée. Après la pose d'écarteurs en verre permettant de maintenir la plaie béante, on écarte les lobes de l'hépatopancréas à l'aide d'aiguilles de verre diversement coudées et terminées en boule et, quand la gonade est repérée, on procède à l'ablation proprement dite qui consiste en une section des différents vaisseaux maintenant en place la gonade. Le canal hermaphrodite, accolé à l'artère génitale est coupé en même temps qu'elle (Fig. 6 a).

La fragilité de l'épithélium hépatique fait qu'il est fréquent que la glande digestive soit lésée au cours des manoeuvres de dégagement de la gonade. L'emploi d'un électrocoagulateur y remédie, en opérant à faible puissance. A la dissection, on ne retrouve plus trace d'aucune lésion.

Les lobes de la glande digestive étant remis en place et les écarteurs enlevés, on suture la plaie à l'aide d'agrafes en fil d'argent de 0,1 mm à 0,2 mm de diamètre, selon la taille des opérés. Il suffit de placer environ une agrafe par millimètre.

3 - Soins post-opératoires

Les opérés sont installés dans des bocaux d'un demi-litre garnis de papier filtre humidifié d'eau distillée additionnée d'antibiotiques. On les y laisse jeûner pendant quelques jours alors que s'installent les processus de cicatrisation, période durant laquelle ils sont particulièrement fragiles.

Après environ cinq jours, les premières agrafes commencent à tomber d'elles-mêmes. Il est dès lors possible de nourrir à nouveau les opérés. La cicatrisation s'achève après environ deux semaines. La mortalité est de l'ordre de 30 p. 100.

III - RESULTATS

La régénération germinale n'étant possible que si l'ablation de la gonade est réalisée avant la puberté (LAVIOLETTE, 1954), les castrations sont réalisées sur des animaux âgés de quatre à cinq mois, se trouvant donc en phase juvénile.

LAVIOLETTE a défini quatre étapes dans la régénération de la glande génitale d'A. rufus L.

- Le Stade I correspondant à l'édification d'un nodule cicatriciel (Fig. 6 b).
- Le Stade II marqué par la formation de digitations du canal hermaphrodite.
- Le Stade III défini par l'apparition de cryptes provenant de la dilatation de l'extrémité de l'une ou de plusieurs de ces digitations.
- Le Stade IV remarquable par la présence de cellules germinales néoformées (Fig. 6 c).

Le tableau IV donne un aperçu chiffré de l'ovogénèse dans les deux séries d'opérés. Seuls y sont figurés les cas d'obtention de régénérats normaux. Nous avons éliminé les cas de régénérats abortifs chez lesquels après des délais compris entre deux mois et demi et quatre mois, le nodule cicatriciel n'a pas dépassé le stade I et ne présente, par conséquent, pas de cellules germinales néoformées. Etant retrouvés à la même fréquence chez les deux types d'opérés, il ne semble donc pas que le tentacule oculaire ait une influence sur le fait qu'il y ait ou non régénération. LAVIOLETTE (1954) chez A. rufus L. attribue l'incapacité qu'ont de tels individus de régénérer une gonade à une déficience physiologique ou à un choc opératoire mal supporté.

Les fixations se sont échelonnées de deux mois et demi à sept mois après opération, autrement dit alors que le stade IV est atteint.

TABLEAU IV - Evolution de l'ovogénèse chez des individus castrés et chez des individus détentaculés puis castrés.

Temps écoulé entre opération et fixation	Nombre de régénérats normaux fixés		N _o		∅ _o (en μ)	
	C	CD	C	CD	C	CD
2 mois 1/2	5	4	84	132	15 à 40	15 à 40
4 mois	5	6	211	613	15 à 50	15 à 60
7 mois	6	7	357	1512	15 à 70	15 à 90

N_o : nombre d'ovocytes ; ∅_o : diamètre ovocytaire ; C : animaux castrés ; CD : animaux détentaculés puis castrés.

1 - Fixation deux mois et demi après opération

Effectuée chez des animaux en début de stade IV, elle permet déjà de constater des différences entre les deux séries expérimentales. Chez les castrés simples, les cryptes se remplissent progressivement en cellules germinales, certaines ne renfermant que quelques spermatogonies (Pl. VIII, fig. a) alors que d'autres renferment ovocytes (généralement un par acinus) et spermatogonies (Pl. VIII, fig. a). Ainsi, l'on s'achemine vers la formation d'une gonade normale; les cryptes correspondant aux acini glandulaires et se trouvant reliées comme eux au canal hermaphrodite primitif.

A ce stade, les éléments mésenchymateux ne constituent alors, entre les différentes cryptes, que des travées qui s'amincissent progressivement. Les opérés détentaculés, par contre, présentent une tendance à la différenciation dans le sens femelle, certains acini pouvant déjà renfermer plusieurs ovocytes (Pl. VIII, fig. b). Néanmoins, il ne semble pas possible d'éliminer la lignée mâle représentée par des spermatogonies (Pl. VIII, fig. b).

2 - Fixation quatre mois après ablation de la gonade

Si l'on examine la gonade régénérée au bout d'une telle durée d'expérimentation, on constate que le phénomène ébauché précédemment chez les détentaculés se confirme.

L'étude histologique révèle chez les castrés un stade caractéristique d'une phase juvénile, se traduisant qualitativement par la présence d'acini mixtes dès lors bien remplis (Pl. VIII, fig. c) et numériquement par de nombreuses spermatogonies (Pl. VIII, fig. c) et des ovocytes, d'un diamètre compris entre 15 et 50 μ , se retrouvant à la fréquence de un ou deux par acinus.

Par contre, les animaux ayant subi une tentaculectomie présentent des poussées ovocytaires (Pl. VIII, fig. d) remarquables par l'apparition d'acini nettement féminisés (Pl. VIII, fig. d). Corrélativement, la lignée mâle régresse, bien que toujours figurée par des spermatogonies (Pl. VIII, fig. d).

Le calcul du nombre total d'ovocytes contenus dans des régénérats de cet âge prélevés sur les deux types d'opérés permet d'établir une nette différence (Tableau IV).

3 - Fixation sept mois après la castration

La multiplication des acini fait que la gonade nouvellement édiflée chez les deux types d'opérés est à présent plus importante. L'ovotestis

régénéré chez les castrats simples d'un tel âge montre l'aspect typique d'une phase juvénile avancée. Ainsi, l'on peut noter l'apparition de certains ovocytes (Pl. IX, fig. a) plus volumineux qu'au stade précédent (70 μ) et la présence de spermatogonies chez lesquelles les figures de mitoses sont assez fréquentes. Quantitativement, les ovocytes sont au nombre de un à deux par acinus (Pl. IX, fig. a), ce qui est assez semblable à ce que l'on retrouve chez les animaux d'élevage en phase juvénile avancée.

Chez les détentaculés, la poussée ovocytaire, amorcée précédemment, s'accroît et est à présent très nette (Pl. IX, fig. b, c, d). Elle se traduit par une augmentation du nombre d'ovocytes (Tableau IV). Ainsi, la plupart des acini sont bourrés d'ovocytes volumineux (80 à 90 μ de diamètre). On peut même très fréquemment en observer renfermant de véritables paquets ovocytaires (Pl. IX, fig. c). Les spermatogonies sont moins nombreuses que chez les castrés simples et les mitoses y sont peu fréquentes.

Ainsi, il semble que la privation des tentacules oculaires exerce un effet quantitatif sur l'ovogenèse se déroulant dans la gonade néoformée.

III - DISCUSSION

La régénération germinale, étudiée par LAVIOLETTE (1954) chez A. rufus L. comporte plusieurs étapes que l'on peut résumer ainsi :

- l'épithélium du canal hermaphrodite est susceptible de proliférer au niveau du plan de section
- le matériel épithélial ainsi accumulé est en mesure de perdre ses caractères de spécificité
- cette évolution cytologique prélude à une différenciation dans une direction entièrement nouvelle et aboutit à la reconstitution du tissu germinal.

Cet auteur pense que l'origine des cellules de régénération est l'épithélium du canal hermaphrodite, mais il ajoute qu'une telle hypothèse ne peut être contrôlée cytologiquement.

Cette possibilité de réédification d'une nouvelle gonade à partir de l'extrémité réséquée du canal hermaphrodite nous a permis de tester le rôle du tentacule oculaire dans la réalisation de l'ovogenèse. En effet, la régénération germinale n'avait jamais été envisagée en privant un individu d'un organe présumé endocrine.



Si une telle opération a mis en évidence l'influence du tentacule sur la lignée femelle, il ne semble cependant pas possible de faire disparaître la lignée mâle quoique celle-ci soit en régression. Ainsi, le rôle du tentacule oculaire sur la spermatogenèse n'est pas totalement éclairci. Des fixations plus tardives, alors que les castrés simples présenteront un ovotestis régénéré adulte, pourraient permettre de connaître le devenir de cette lignée à ce stade chez les détentaculés castrés.

IV - CONCLUSION

L'ablation des tentacules oculaires pratiquée dès l'éclosion chez A. subfuscus déclenche un accroissement du nombre d'ovocytes ; il en est de même lorsque l'opération est pratiquée corrélativement à une castration. La gonade régénérée présente un plus grand nombre d'ovocytes que chez les témoins. D'autre part, dans les deux types de tentaculectomie, la spermatogenèse paraît bloquée.

Ces résultats semblent démontrer que les tentacules oculaires d'A. subfuscus exercent une action inhibitrice sur l'ovogenèse, au moins pendant la phase juvénile ; ils n'autorisent pas cependant à conclure à un rôle hormonal de ces organes. En effet, pour confirmer ou infirmer cette hypothèse il conviendra de recourir à des implantations de tentacules ou à des injections d'extraits.

D'autre part l'action des tentacules peut être indirecte et intervenir par l'intermédiaire du cerveau dont le rôle reste à étudier in vivo. Ces recherches qui réclament un grand nombre d'animaux de tous âges n'ont pu être entreprises.

Une première étape a été abordée par la méthode des cultures organotypiques dont les résultats sont exposés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE IV

ETUDE EXPERIMENTALE PAR LA METHODE DES CULTURES ORGANOTYPIQUES

INTRODUCTION

Grâce à cette technique, nous avons tenté d'éclaircir les mécanismes contrôlant l'expression de l'hermaphroditisme chez la limace A. subfuscus en cultivant des gonades isolées ou associées à des organes présumés endocrines.

I - TECHNIQUES DE LA CULTURE ORGANOTYPIQUE

1 - Isolement des animaux

Une semaine avant la mise en culture, les limaces sont isolées dans des cristallisoirs stériles, dont le fond est recouvert de papier filtre stérile, humidifié d'eau bidistillée stérile additionnée de Pénicilline (100 000 UI pour 200 centimètres cubes d'eau), Streptomycine (1 goutte pour 200 ml d'eau) et Polymyxine (50 000 U pour 200 cc d'eau). Papier filtre et eau bidistillée sont renouvelés pendant la durée de l'isolement. Ces conditions se révèlent absolument nécessaires, particulièrement chez les animaux ayant déjà atteint une taille assez importante où, malgré ces précautions, la contamination reste l'une des causes majeures des difficultés rencontrées.

2 - Milieux de culture

Nous avons (1) testé les milieux gélosés G_1 , G_2 et Ch mis au point par GOMOT et GUYARD (1967, 1969), ainsi qu'un milieu R. Ils sont dérivés du milieu standard de WOLFF et HAFFEN (1952). Le jus d'embryon de poulet y est remplacé par le milieu synthétique 199 de MORGAN, MORTON et PARKER (1950), modifié et livré stérile par l'Institut Pasteur. Ce milieu est complété par un apport protéique constitué de peptones et d'un échantillonnage de vitamines et d'oligoéléments représenté par un extrait de levure, également fourni par l'Institut Pasteur.

(1) Cette étude a été réalisée avec la collaboration technique de Mme L. MEUNIER puis de Melle N. DROUX.

De plus, BENEX (1965) ayant montré que les sulfamides peuvent intervenir dans la différenciation cellulaire d'explants d'A. glabratus, nous avons réduit la fraction antibiotique du milieu, tout au moins chez les jeunes animaux.

Nous avons également abandonné l'emploi d'un antifongique, la fungizone que nous utilisions lors de nos premières mises en culture.

Adjoint au liquide de Tyrode adopté comme solution de base (milieu G₁), le milieu 199 associé au liquide de Hanks (milieu G₂), de Chiarandini (milieu Ch) ou de Roach (milieu R) permet des survies de plus de trois semaines, mais les milieux G₂ et R se révèlent le mieux convenir aux limaces.

La pression osmotique du milieu de culture doit être proche de la valeur moyenne in vivo. Le pH est ajusté à 7,5 grâce à l'emploi de bicarbonate de Soude. ROACH chez A. ater (1963) et BAILEY (1971) chez A. agrestis ont signalé des valeurs de pH légèrement supérieures chez ces limaces, mais les variations individuelles sont importantes.

Chaque salière reçoit 7 gouttes de milieu gélifié, 6 gouttes de liquide physiologique, 100 UI de Pénicilline et 25 UI de Polymyxine (cette dernière uniquement pour les animaux d'âge avancé).

Le milieu gélifié se compose de gélose (Difco) dissoute dans le liquide de Gey (1%). Une même proportion de peptone (Difco) est ajoutée. La composition du liquide physiologique varie avec le milieu utilisé.

TABLEAU V - Composition du liquide de Hanks.

Composants	Poids en grammes pour 1 litre de solution
Rouge de Phénol	0,02
NaCl	8,00
KCl	0,40
CaCl ₂	0,14
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	0,10
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,10
Na ₂ HPO ₄ , 2 H ₂ O	0,06
KH ₂ PO ₄	0,06
Glucose	1,00
NaHCO ₃	0,35

TABLEAU VI - Composition du liquide de Roach

Composants	Poids en grammes pour 1 litre de solution
NaCl	2,52
KCl	0,26
CaCl ₂ , 6 H ₂ O	0,66
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	1,00
Na ₂ HPO ₄	0,03
NaHCO ₃	0,76
NaOH	0,064
Na ₂ SO ₄	0,53
Glucose	11,50

Les liquides **physiologiques** des milieux G₂ et R se composent ainsi :

1 - milieu 199	63 parties
2 - Bicarbonate de soude à 3 ‰	85 parties
3 - Liquide de Hanks (pour le milieu G ₂) ou de Roach (pour le milieu R)	850 parties
4 - Extrait de levure	2 parties

La composition finale des milieux G₂ et R, neutres au point de vue hormonal, est la suivante, les doses étant données pour une salière :

- milieu gélifié	7 gouttes
- liquide physiologique	6 gouttes
- Antibiotiques	
* Specilline G (Specia)	100 UI
* Polymyxine B (Pfizer)	25 UI

3 - Explantation et entretien des cultures

Si l'anesthésie se révèle obligatoire chez les spécimens d'assez grande taille pour prélever les tentacules en extension et afin d'éviter les contractions brutales accompagnées de rejets de mucus qui rendraient l'animal inopérable, elle n'est pas nécessaire chez les jeunes animaux. Avant dissection, les individus sont passés à l'alcool à l'aide d'un tampon d'ouate. Le prélèvement des organes a lieu le plus stérilement possible et s'effectue dans des boîtes de Pétri à fond de paraffine, l'animal épinglé étant immergé dans le liquide physiologique de CHIARANDINI (1964), déterminé à partir de dosages

effectués chez Cryptomphallus aspersa Agassiz et dont la composition est figurée dans le tableau VII, ou dans celui de ROACH (1963) établi chez A. ater (Tableau VI). La solution est toujours additionnée de Pénicilline, Streptomycine et Polymyxine, employées aux mêmes doses que pour l'isolement.

TABLEAU VII - Composition du liquide de CHIARANDINI.

Composants	Poids en grammes pour 1 litre de solution
NaCl	6,45
KCl	0,36
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,94
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,86
NaHCO ₃	1,54

Lorsque la taille de la gonade le permet, on prélève un fragment témoin. Les cultures sont placées à l'obscurité dans une étuve réglée à la température de 20° C. Au début de la culture, il faut assécher les explants. Le repiquage ne se révèle pas nécessaire.

4 - Comportement des explants en culture

Dans le cas des associations d'organes, la soudure s'effectue assez rapidement.

Au bout de quinze jours, le tentacule oculaire reste sensible à la lumière et au contact des pinces. A la fixation, les cellules en collier montrent toujours nettement leurs grains de sécrétion.

Selon GUYARD (1971), un maintien de quinze jours est une durée de culture efficace à ne pas dépasser pour les ganglions nerveux.

La fixation des explants est échelonnée entre neuf et vingt-quatre jours.

Excepté chez les jeunes animaux, où le taux de contamination est pratiquement nul, la proportion d'infections peut atteindre 25 % aux stades plus avancés ; particulièrement dans les cas d'associations avec les complexes céphaliques ou les tentacules oculaires, ces derniers, organes externes, en étant le plus souvent la cause.

II - RESULTATS

Les explants gonadiques cultivés ont essentiellement été prélevés au stade juvénile (Pl. XI, fig. a), où les deux lignées sont présentes.

1 - Culture de la gonade isolée en milieu an hormonal

a) Explantation au Stade Immature (Stade 1)

De telles gonades âgées de dix à vingt jours ont pu être cultivées neuf jours sur milieu R (Pl. X, fig. a).

La taille réduite des explants ne permet pas de prélèvement de fragments témoins. Les gonades de jeunes du même âge provenant d'une même ponte sont alors utilisées comme témoins.

Au moment de l'explantation, la gonade figurée sous forme d'amas cellulaires bordant l'artère génitale ne renferme que des spermatogonies, aucun ovocyte n'étant discernable. Elle se trouve ainsi à un stade défini comme étant le stade 1 (Pl. I, fig. a).

Neuf jours après la mise en culture, on peut constater l'apparition de quelques jeunes ovocytes pariétaux (Pl. X, fig. b). Ainsi, il se pourrait qu'au stade 1, qualifié de mâle par SMITH et LÛSIS, la glande génitale renferme des cellules indifférenciées susceptibles d'évoluer dans le sens femelle.

Néanmoins, de nombreuses spermatogonies sont encore présentes. Seule une culture plus prolongée pourrait confirmer ce début de poussée femelle bien que chez A. subfuscus la différenciation en spermatogonies étant très précoce, il serait utile de pouvoir cultiver des embryons ou de prélever la gonade dès l'éclosion.

b) Explantation en phase juvénile (Stade 2)

Chez les témoins, les deux lignées gamétogénétiques sont représentées et les ovocytes, de diamètre compris entre 15 et 60 μ , sont au nombre de un à deux par acinus.

Cultivé vingt-quatre jours sur milieu G₂ (Pl. X, fig. c), l'ovotestis juvénile révèle la présence de certains gros ovocytes de 90 μ de diamètre (Pl. X, fig. d). Par contre, le nombre d'ovocytes n'augmente pas et la spermatogénèse ne semble que peu affectée.

c) Explantation en phase femelle (Stade 5)

L'évolution en condition anormonale d'un tel explant n'affecte aucunement celui-ci. Le nombre et la structure des ovocytes matures restent inchangés après vingt-quatre jours de culture sur milieu G₂.

2 - Associations autologues de la gonade avec d'autres organes

a) Associations, en phase juvénile (Stade 2), avec le complexe céphalique

Dans ce cas d'association triple (Pl. XI, fig. b), on remarque après quinze jours de culture sur milieu G₂ que l'aspect histologique de l'ovotestis est semblable à celui de fragments témoins. Il semble donc que dans la différenciation sexuelle n'interviendraient que deux organes : le tentacule oculaire et le cerveau.

b) Associations avec les tentacules oculaires

α) Explantation en phase juvénile (Stade 2)

Après quinze jours de culture sur milieu G₂ (Pl. XI, fig. c), ces explants gonadiques présentent une spermatogenèse active. Par contre, la lignée femelle semble affectée, ce qui se traduit par l'apparition d'ovocytes en dégénérescence, reconnaissables à un début de vacuolisation du cytoplasme (Pl. XI, fig. d).

β) Explantation en phase femelle (Stade 5)

Durant les quinze jours de culture sur milieu G₂ le tentacule oculaire, prélevé au stade femelle, semble inefficace vis à vis de la lignée femelle ; une telle association n'entraînant aucune variation quantitative ou qualitative (apparition d'ovocytes dégénérés ou nouvelle poussée ovocytaire).

c) Associations, en phase juvénile (Stade 2), avec le cerveau

Une gonade juvénile associée au cerveau (ganglions cérébroïdes + masse sous-oesophagienne) révèle, au bout de quinze jours de culture sur milieu G₂, la présence d'ovocytes de diamètre supérieur à celui des témoins, plus particulièrement en bordure des ganglions cérébroïdes (Pl. XI, fig. e). De plus, quelques acini peuvent renfermer plusieurs ovocytes (Pl. XI, fig. f).

III - DISCUSSION

Les résultats obtenus sont groupés dans le Tableau VIII.

TABLEAU VIII - Tableau récapitulatif des cultures effectuées

TC : association avec le complexe céphalique

TO : association avec les tentacules oculaires

C : association avec le cerveau

	Gonade isolée			Associations autologues de la gonade avec d'autres organes			
	Stade 1	Stade 2	Stade 5	TC	TO	C	
				Stade 2	Stade 2	Stade 5	Stade 2
Nombre de cultures réalisées ayant présenté une survie normale	11	21	8	11	26	8	12
Durée de culture (en jours)	9	24	24	15	15	15	15
Evolution de la lignée mâle par rapport aux témoins	0	+	X	0	0	X	±
Evolution de la lignée femelle							
Nombre d'ovocytes en bon état	+	0	0	0	-	0	+
par rapport aux témoins							
Taille des ovocytes	+	+	0	±	(en dégression)	0	+

Légende : 0 : même état que les témoins

+ : augmentation

- : régression

± : Assez proche des témoins, mais variable selon les explants

Après neuf jours de culture sur milieu R, on aboutit dans une gonade immature à l'apparition de quelques jeunes ovocytes. Néanmoins, on ne peut parler d'autodifférenciation ovocytaire comparable à ce qu'ont démontré chez les Mollusques hermaphrodites STREIFF (1967) chez C. sinensis et GUYARD (1969) chez H. aspersa. Seule une culture plus prolongée pourrait permettre de déterminer si cette poussée femelle s'accroît.

Une manipulation à effectuer serait de cultiver un fragment de canal hermaphrodite juvénile isolé et d'étudier la régénération germinale ; elle permettrait de se rendre compte de l'état de la gonade nouvellement constituée en conditions anhormonales et ainsi pourrait-on conclure sur l'existence ou non d'une autodifférenciation ovocytaire chez les Arionidés. Cependant, si la durée prolongée (2 mois 1/2) de la culture risque d'être un obstacle à sa réalisation, ce dernier pourrait être surmonté grâce à des repiquages successifs.

Si l'action du tentacule oculaire semble définie en phase juvénile (Tableau VIII), il reste à confirmer son inefficacité en phase femelle par l'association hétérologue gonade juvénile-tentacules oculaires "femelles", rendue complexe vu la difficulté d'obtenir à une même époque des individus de ces deux stades.

Le cerveau juvénile paraît déjà stimuler la lignée femelle (Tableau VIII). Chez A. rufus Drap., BADINO (1967) admet qu'il serait également actif à un stade que l'on peut présumer mature, ce qui reste à confirmer étant donné que cet auteur ne signale pas à quel stade il a réalisé ses explantations.

Ainsi, il nous reste à établir le rôle du tentacule oculaire et du cerveau durant le stade 1 (Immature). Le cerveau infantile est-il déjà actif ? Selon QUATTRINI (1963), chez M. gagates, des animaux sacrifiés dès l'éclosion semblent déjà présenter des processus neurosécrétoires.

De plus, il nous faudra également, par associations auto et hétérologues, essayer de définir l'action du tentacule et du cerveau lors de la phase mâle.

IV - CONCLUSION

La méthode des cultures organotypiques nous a permis d'apporter quelques éléments de réponse quant au rôle du tentacule et du cerveau dans la différenciation sexuelle d'A. subfuscus.

Le rôle du tentacule oculaire en phase juvénile semble bien résolu : il exerce un rôle inhibiteur sur l'ovogenèse. Cependant, on peut se demander si cet organe possède un rôle inhibiteur de la lignée femelle ou un rôle de contrôle de cette dernière par l'intermédiaire du cerveau qui, à ce stade, paraît actif et dont il conviendra de déterminer la région efficace.

En phase femelle, le tentacule oculaire paraît inefficace.

Ces quelques résultats préliminaires complétés par les associations autologues restant à effectuer déboucheront sur la réalisation d'associations hétérologues qui devraient permettre de définir l'action précise du tentacule oculaire et du cerveau à un stade donné.

Si les cultures organotypiques confirment nos résultats obtenus in vivo par ablations de tentacules oculaires, elles mettent en plus en évidence un rôle du cerveau ne pouvant être démontré in vivo, l'ablation de cet organe étant actuellement irréalisable.

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE

L'expérimentation in vivo et in vitro a permis de démontrer le rôle inhibiteur du tentacule oculaire vis à vis de la lignée femelle durant toute la phase juvénile.

Son rôle durant la phase immature reste à établir.

Le rôle du cerveau, essentiellement abordable in vitro, doit être précisé notamment en phase immature. In vivo, l'injection de broyats sera à envisager.

Ainsi, si l'étude endocrinologique de la différenciation de la glande hermaphrodite d'A. subfuscus démontre le rôle inhibiteur du tentacule oculaire sur la lignée femelle, elle pose un problème qui ne pourra être résolu que par la culture prolongée d'ébauches gonadiques. La sexualisation dans le sens femelle est-elle an hormonale, comme l'a montré GUYARD (1971) chez H. aspersa, ou résulte-t-elle d'une action du cerveau qui semble qualitativement actif en phase juvénile ?

TROISIEME PARTIE

INFLUENCE DE LA LUMIERE SUR LA CROISSANCE

ET LA MATURITE SEXUELLE D'A. SUBFUSCUS

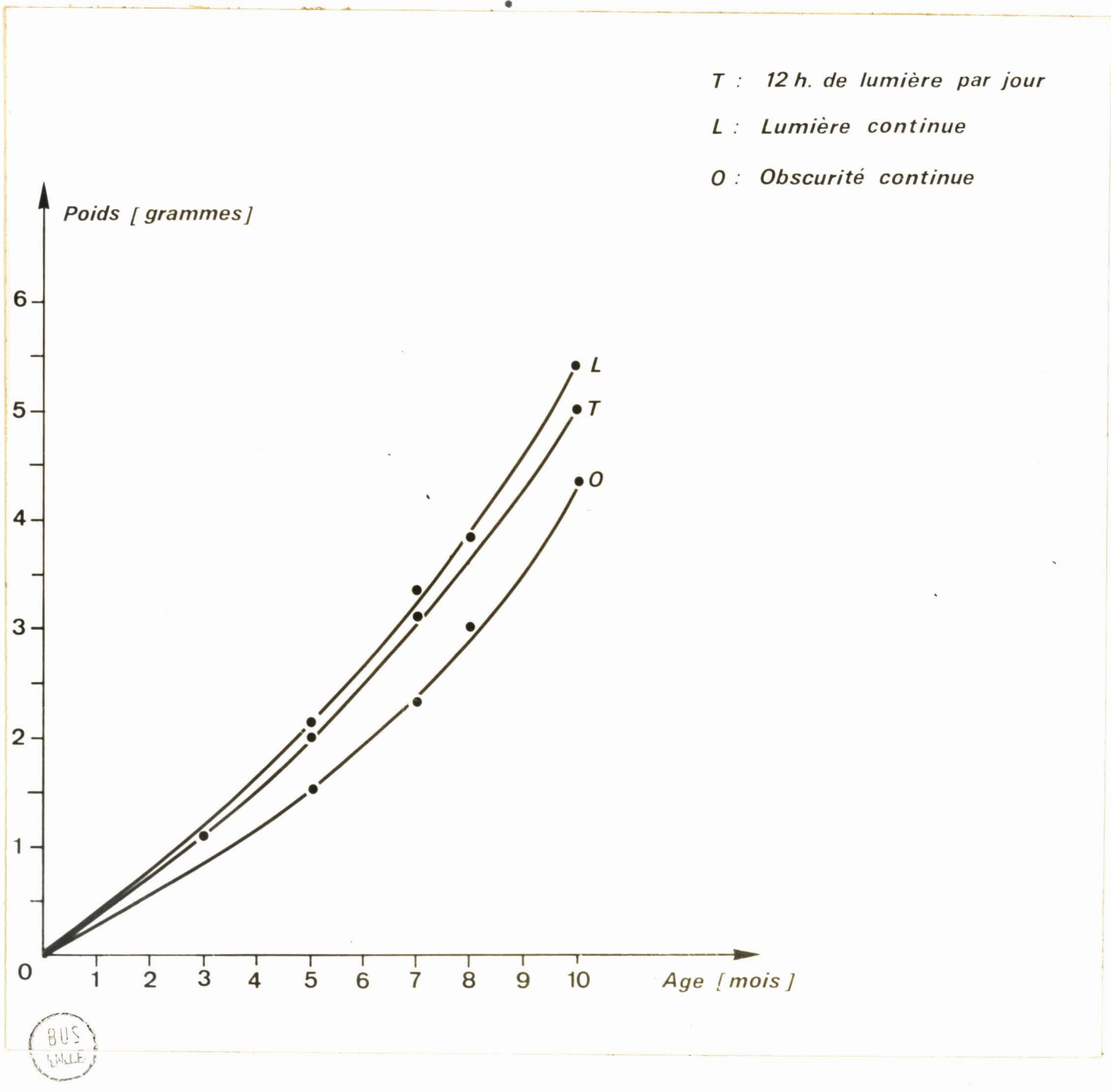


Figure 7 - Evolution pondérale moyenne d'A. subfuscus exposés dès l'éclosion à un photopériodisme différent.

Les tentacules exerçant une influence sur la gamétogenèse, il était normal de penser que, dans les conditions naturelles, la lumière constitue le stimulus qui intervient directement sur les processus présumés endocrines. Dans ces conditions, nous avons testé l'influence de l'éclairement sur l'ovotestis d'A. subfuscus. Nous avons réalisé, à température constante (15° C), des élevages soumis dès l'éclosion à diverses photopériodes, à savoir : lumière ou obscurité continues et lumière douze heures sur vingt-quatre (cette dernière série pouvant être considérée comme témoin).

I - METHODES

Des tubes néon sont utilisés comme source lumineuse. L'obscurité continue est obtenue en enfermant les aquariums, contenant les individus en expérience, dans une boîte hermétiquement close. Le nettoyage et le renouvellement de la nourriture s'effectuent le plus rapidement possible et en lumière atténuée.

Les animaux, provenant d'une même ponte, sont installés, à la température constante de quinze degrés centigrades, dans des chambres climatiques que Monsieur BOURIQUET, Professeur de Biologie Végétale à la Faculté des Sciences de Lille, nous a aimablement permis d'utiliser.

II - RESULTATS

Les pesées et les fixations ont été effectuées cinq, sept, huit et dix mois après l'éclosion.

1 - Influence sur la croissance pondérale

Les poids successifs des individus sont reportés dans le Tableau IX, les courbes de croissance étant représentées sur la Figure 7.

TABLEAU IX - Evolution pondérale d'animaux soumis, dès l'éclosion, à un photopériodisme différent.

Age de l'animal en mois	Nombre d'animaux	Poids du corps en grammes		
		T	L	O
Eclosion	5	0,012	0,012	0,012
3	3	1,1		
5	15	2	2,1	1,5
7	12	3,1	3,3	2,3
8	12	3,5	3,8	3
10	9	5,0	5,3	4,3

T : animaux soumis à 12 heures de lumière par jour.

L : animaux exposés à une lumière continue.

O : animaux subissant une obscurité continue.

La lecture de la figure 7 aboutit à la conclusion que les jours longs semblent légèrement stimuler la croissance pondérale, alors que l'obscurité paraît entraîner un retard de cette même croissance. Il faut remarquer que ceci se rapproche de ce qui se passe dans la nature où la croissance a essentiellement lieu en période de jour long.

Rapprochée des courbes réalisées à la suite de détentaculations effectuées dès l'éclosion, on peut considérer que si la courbe de croissance des animaux subissant une obscurité continue est inférieure à celle des témoins, il en était de même à la suite de la privation de tentacules où le phénomène était encore plus net.

Dans les deux cas, l'influence éventuelle d'une variation dans la prise de nourriture reste possible ; elle est délicate à préciser.

2 - Effet sur la différenciation et la maturité sexuelles

a) Fixation cinq mois après l'éclosion

* Animaux soumis à douze heures de lumière par jour

Maintenues dans de telles conditions, les limaces présentent une gamétogenèse normale et leur gonade présente l'aspect caractéristique d'une phase juvénile avec la présence d'ovocytes en phase d'accroissement, mesurant de 15 à 50 μ (Pl. XII, fig. a).

* Animaux maintenus en lumière continue

La glande hermaphrodite de tels individus renferme de très nombreux ovocytes en dégénérescence caractérisés par une coloration sombre, un cytoplasme vacuolisé et un noyau parfois pycnotique (Pl. XII, fig. b). Si ce phénomène existe dans la nature et dans nos élevages, particulièrement en fin de phase juvénile, il est nettement moins marqué que dans le cas présent où la presque totalité des ovocytes présente une telle évolution. La spermatogenèse ne semble pas affectée, les spermatogonies étant toujours en nombre important.

* Animaux subissant une obscurité continue

Trois des cinq animaux fixés à cet âge montrent une ovogénèse plus développée que chez les témoins tant au point de vue quantitatif que qualitatif, des ovocytes de 50 μ étant très fréquemment retrouvés dans leur glande génitale. De plus, leur spermatogenèse est quantitativement en régression (Pl. XII, fig. c).

Les différences sont moins marquées dans l'ovotestis de deux autres limaces sacrifiées où la lignée mâle apparaît semblable à celle des contrôles.

b) Fixation sept mois après l'éclosion

Si elle confirme, chez les animaux exposés à une lumière continue, les observations effectuées à cinq mois, par contre les variations entre les témoins et les quatre individus placés à l'obscurité ne sont que peu marquées, seuls quelques ovocytes étant plus gros en absence de lumière.

c) Fixation huit mois après l'éclosion

Chez les Arions exposés à douze heures de lumière par jour, le stade histologique de la gonade est caractéristique d'un stade 3 (présence de spermatoocytes et de spermatides). Par contre, la glande génitale de tous les expérimentés soumis à une lumière continue a l'aspect typique d'un stade 4 avec présence de spermatoocytes, spermatides, spermatozoïdes et de quelques ovocytes (Pl. XII, fig. d). C'est dire que la lumière continue provoque une maturité plus précoce chez les limaces.

L'ovotestis de trois animaux placés à l'obscurité continue est assez semblable à celui des témoins, celui d'un quatrième étant encore au stade juvénile.

d) Fixation dix mois après l'éclosion

L'aspect de la glande hermaphrodite des individus exposés à une lumière continue est le même que celui des témoins, caractéristique d'un stade 4. Ainsi il n'est pas possible, malgré la maturité plus précoce, de provoquer une ponte anticipée chez de tels animaux.

Les gonades des individus mis à l'obscurité continue sont légèrement plus petites mais renferment néanmoins des spermatozoïdes et se trouvent donc également au stade 4.

3 - Neurosecrétion

a) Les cellules en collier du tentacule oculaire

En microscopie optique, la densité des grains de sécrétion paraît constante quelles que soient les conditions imposées, notamment chez les individus exposés à une lumière continue et fixés à l'âge de huit mois.

Cependant, seule une étude ultrastructurale permettrait d'établir une éventuelle variation du nombre de ces granules en fonction d'un photopériodisme imposé.

b) Le cerveau

Nous avons trouvé, par la méthode de CLARK, des cellules Fuchsine Paraldéhyde positives dans cet organe et plus particulièrement des groupes de petites cellules dans la masse sous-oesophagienne d'animaux fixés à l'âge de dix mois. Néanmoins, leur colorabilité par la fuchsine paraldéhyde n'autorise pas à conclure qu'elles sont neurosecrétrices.

De plus, avant de définir un éventuel cycle neurosecréttoire sous l'influence d'un photopériodisme différent, il conviendra de définir les différents types de cellules neurosecrétrices rencontrés ; SMITH (1967) ayant chez A. ater trouvé de nombreuses cellules neurosecrétrices cérébrales.

III - DISCUSSION

SMITH (1966) sur A. ater, soumet des animaux à une lumière continue, sous différentes conditions de température, mais ses expériences débutent sur des individus déjà âgés et sont plus brèves. De plus, il n'est parfois pas aisé d'y discerner l'effet de la température et du photopériodisme. Ainsi, ses résultats sont difficilement comparables aux nôtres, l'expérimentation du présent travail ayant commencé dès l'éclosion.

Par contre, HENDERSON et PELLUET (1960) obtiennent chez D. reticulatum par application d'une lumière continue la formation de spermatocytes binucléés et de spermatides multinucléées. Ils signalent également l'apparition d'ovogonies à cytoplasme vacuolisé. Une remise dans des conditions normales des individus chez lesquels ces changements ont été induits provoque, en six semaines, un retour à l'état normal de la gonade. Même si l'on considère que la maturation de ce Limacidé survient plus rapidement que chez les Arionidés, il n'en reste pas moins qu'il y a stimulation de la lignée mâle, ce qui se rapproche de nos observations à huit mois à savoir une maturité mâle plus précoce. De plus, l'apparition d'ovogonies à cytoplasme vacuolisé peut être comparée à la présence d'ovocytes dégénérés, retrouvés très fréquemment en phase juvénile chez des animaux subissant une lumière continue.

L'effet de l'obscurité continue a été étudié par SMITH (1966) chez A. ater, sous différentes conditions de température. Il obtient à 10° C un retard de maturation et à 25° C un aspect normal de la glande hermaphrodite cependant marquée par une résorption des cellules contenues dans les acini. Dans le premier cas, l'auteur attribue ce retard à l'effet de la température. Dans le second cas, la mortalité est importante (60 %) et l'effet d'une telle température tout à fait anormale doit être prépondérant car des animaux élevés à 25° C et recevant seize heures de lumière par jour donnent une réponse semblable. Le seul cas comparable à notre expérimentation est celui où les animaux sont placés à une température constante de 18° C en complète obscurité. Dans de telles conditions, SMITH obtient une maturation plus précoce que dans la nature, ce qui diffère de nos résultats puisque la maturation semble survenir chez nos expérimentés au même âge que chez les témoins.

Nos résultats obtenus à la suite de l'application d'une lumière continue montrent que la photopériode exerce une influence sur le déroulement de la gamétogenèse.

Par contre, les observations effectuées sur des animaux mis à l'obscurité n'amènent que peu de précisions après cinq mois ; on aurait en effet pu s'attendre à ce que cette dernière favorise l'ovogenèse, les pontes ayant lieu en période de jours courts. Les nettoyages répétés, bien qu'effectués rapidement et en lumière atténuée, ont pu fausser l'expérimentation. Il n'est ainsi pas possible de vérifier si l'obscurité continue a le même effet qu'une ablation de tentacules oculaires, quoique la fixation à cinq mois paraisse se traduire par un début d'accélération de l'ovogenèse.

On pourrait penser que la lumière stimule les cellules en collier du tentacule oculaire. Ainsi, le rôle prépondérant de cet organe en phase juvénile expliquerait l'apparition d'ovocytes en dégénérescence et l'apparition d'une maturité mâle précoce. Cependant, un éventuel effet de la lumière sur le cerveau n'est pas à rejeter; il pourrait peut-être expliquer l'apparition d'un stade 4 précoce avec présence de quelques ovocytes de 90 μ à 8 mois. Il n'est néanmoins pas possible de faire apparaître une phase femelle précoce.

Ainsi, un éclaircissement permanent déterminant une dégénérescence ovocytaire en phase juvénile, on peut émettre l'hypothèse que la lumière, dans les conditions naturelles, tout au moins durant ce stade, exerce une influence inhibitrice sur l'ovogenèse.

IV - CONCLUSION

Les résultats obtenus dans les expériences poursuivies en lumière continue semblent confirmer ceux enregistrés après détentaculation ; en effet, pendant la phase juvénile, dans le premier cas on assiste à une inhibition de l'ovogenèse et dans le deuxième à une stimulation. On pourrait donc penser que la lumière agisse sur le tentacule oculaire en renforçant l'activité inhibitrice des cellules responsables de cette action.

Par contre, l'influence d'une obscurité continue est plus difficilement interprétable, ce qui est vraisemblablement dû à la difficulté d'obtention d'une obscurité continue parfaite.

Les changements induits dans la gonade des Arionidés, animaux nocturnes, sont imputables aux altérations de la durée de la période lumineuse mais on ne peut encore conclure définitivement à l'influence de la photopériode sur la différenciation et la maturation sexuelles des limaces.

CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION

Quoique le développement de l'ovotestis puisse être influencé par des facteurs externes tels que l'humidité (ROSENWALD, 1927 ; LÜSIS, 1966) et la température (LÜSIS, 1966), cette dernière retardant si elle baisse le développement des deux sortes de gamètes et ayant, si elle est élevée, une action défavorable sur les deux lignées et plus particulièrement la lignée femelle, le déterminisme de la différenciation sexuelle chez les Arionidés apparaît comme étant de nature endocrine.

L'influence du cerveau reste à préciser. PELLUET et LANE (1961) puis PELLUET (1964) avaient conclu, à la suite d'injections de broyats chez A. ater, A. subfuscus et Milax sp. à son action féminisante. BADINO (1967), par la méthode des cultures organotypiques paraît confirmer ce rôle chez des A. rufus Drap. adultes. Nos résultats obtenus in vitro semblent montrer qu'il serait également actif en phase juvénile, son rôle au stade immature restant inconnu. Cependant, seule la réalisation, in vivo, d'ablations de cet organe permettrait de vérifier son rôle présumé.

Le rôle du tentacule oculaire a été plus discuté. PELLUET et LANE (1961) et PELLUET (1964), à la suite d'ablations et d'injections de broyats réalisées chez A. ater, A. subfuscus et Milax sp. émettent l'hypothèse qu'il sécrèterait une hormone inhibitrice de l'ovogenèse et stimulatrice de la spermatogenèse. Chez les jeunes individus son action prédominerait celle de l'hormone cérébrale qui serait féminisante. Cette dernière augmenterait ses potentialités, au moment de la poussée de maturité sexuelle, permettant ainsi le développement des ovocytes.

GOTTFRIED et DORFMAN (1969) après avoir isolé de la glande génitale d'A. californicus deux stéroïdes (Dehydroepiandrosterone, 11-kétostostérone) interprètent l'évolution de l'ovotestis de la façon suivante : le facteur tentaculaire contrôle la phase mâle et sa décharge est conditionnée par les stéroïdes de la gonade. Ils pensent d'autre part que les plantes seraient la source des stéroïdes et étayent leur hypothèse sur le fait que la capacité de biosynthèse des stérols et des stéroïdes est limitée chez les Mollusques. Or, ces stéroïdes seraient essentiels.

Ces mêmes auteurs, à la suite de nouvelles expériences d'injections de stéroïdes (1970) considèrent le tentacule oculaire comme un régulateur du développement de la gonade. L'ablation de ces organes provoque une spermatogenèse précoce.

Nos résultats paraissent étayer l'hypothèse de PELLUET et LANE relative à l'existence d'une substance d'origine tentaculaire exerçant une influence inhibitrice sur la lignée femelle. Les opérations réalisées in vivo, sur la gonade en croissance ou en cours de régénération, démontrent le rôle inhibiteur du tentacule oculaire sur l'ovogenèse en phase juvénile. Par contre, cet organe semble inefficace en phase femelle. Ainsi, on pourrait émettre l'hypothèse que le taux d'"hormone" tentaculaire diminuerait progressivement au cours de la vie pour devenir nul au moment du stade femelle. Les résultats obtenus en culture organotypique confirment le rôle inhibiteur exercé par le tentacule oculaire sur l'ovogenèse.

Par contre, in vivo ou in vitro, il a été impossible de mettre en évidence un effet stimulateur net sur la spermatogenèse comme le prétendent PELLUET et LANE.

Il reste néanmoins à préciser comment agit le tentacule : son effet inhibiteur sur l'ovogenèse est-il direct ou s'effectue-t-il par l'intermédiaire du cerveau sur lequel il pourrait avoir un rôle de contrôle ?

L'influence du tentacule a également été envisagée chez d'autres Gastéropodes. L'expérimentation a apporté des résultats différents quant à son rôle dans le contrôle de la gamétogenèse. Ce dernier a été bien établi par CHOQUET et GUYARD.

CHOQUET (1969) a démontré que le tentacule de P. vulgata était inhibiteur de la lignée mâle. En effet, en effectuant en culture l'association de tentacules oculaires à des gonades prélevées à différents stades, il empêche toute reprise de la spermatogenèse.

Pour GUYARD (1971), le facteur d'origine tentaculaire a, chez H. aspersa, pour effet principal d'inhiber la tendance des gonocytes à l'auto-différenciation ovocytaire, celle-ci ne se manifestant pas si la gonade est associée aux tentacules oculaires.

D'autre part, STREIFF (1966) chez C. sinensis puis LEBRETON (1969) et LUBET et STREIFF (1969) chez C. fornicata et Littorina littorea L., démontrent son intervention dans la différenciation du tractus génital.

Ainsi, le rôle du tentacule chez les Gastéropodes apparaît très variable suivant l'espèce étudiée. Néanmoins, il semble jouer un rôle inhibiteur dans la gamétogenèse.

En conclusion, une étude ultrastructurale est nécessaire chez les Arionidés. Elle permettra de bien définir le stade immature, à la suite de quoi il sera possible d'expérimenter en culture quant au rôle du tentacule oculaire à ce stade. De plus, l'action du cerveau au cours du cycle vital devra être précisée. Dès lors, il faudra envisager des opérations accompagnées ou non d'injections de broyats de ces deux organes.

BIBLIOGRAPHIE

- ABELOOS (M.), 1942 - Les étapes de la croissance chez la limace rouge (Arion rufus L.).
C. R. Acad. Sc. Paris, 215, 38.
- ABELOOS (M.), 1943 - Effets de la castration chez un Mollusque (Limax maximus).
C. R. Acad. Sc. Paris, 216, 90-92.
- ABELOOS (M.), 1944 - Recherches expérimentales sur la croissance. La croissance des Mollusques Arionidés.
Bull. Biol., 78, 215-256.
- ANCEL (P.), 1903 - Sur le déterminisme cytosexuel des gamètes.
Arch. Zool. exp. et gen., 4, 106-115.
- AUBRY (R.), 1954 c - La lignée mâle dans la glande hermaphrodite de Lymnaea stagnalis adulte.
C. R. Soc. Biol., 148, 1856-1858.
- AUBRY (R.), 1962 - Etude de l'hermaphrodisme et de l'action pharmacodynamique des hormones de Vertébrés chez les Gastéropodes Pulmonés.
Thèse de Sciences, Strasbourg, n° 211, 81 p.
- BACCI (G.), 1951 b - Ermafroditismo e intersessualità nei Gasteropodi e Lamelibranchi.
Arch. Zool. Ital., 7, 57-151.
- BADINO (G.), 1967 - I fattori della gametogenesi di Arion rufus studiati con il metodo della cultura in vitro.
Arch. Zool. Ital., 52, 271-275.
- BAILEY (T.G.), 1969 - A new anaesthetic technique for slugs.
Experientia, 25/11, 1225.
- BAILEY (T.G.), 1971 - Osmotic pressure and pH of slug haemolymph.
Comp. Biochem. Physiol., A, 40, 1, 83-88.
- BENEX (J.), 1965 - Action comparée de certains sulfamides à noyau pyrimidique sur des explants de Mollusques maintenus en culture organotypique.
C. R. Acad. Sc. Paris, 261, 5233-5236.

- BERN (H.A.), 1963 - The secretory neuron as a doubly specialised cell. In :
"The general physiology of cell specialisation" D. MAZIA et A. TYLER,
349-392, Mac Graw Hill.
- BERN (S.H.L.) et NISHIOKA (R.S.), 1963 - Inclusions in the neurons of Aplysia californica.
J. Comp. Neur., 121 (2), 237-258.
- BERRY (A.J.) et CHAN (L.C.), 1968 - Reproductive condition and tentacle extirpation in Malayan Achatina fulica (Pulmonata).
Austr. J. Zool., 16, 849-855.
- BIERBAUER (J.) et TÖRÖK (L.J.), 1968 - Histophysiological study of the optic tentacle in Pulmonates. I. Histological examination of the optic tentacle with special regard to the morphology of the collar and lateral cells.
Acta biol. Acad. Sc. Hung., 19 (2), 133-143.
- BIERBAUER (J.) et VIGH-TEICHMANN (I.), 1970 - Histophysiological examination of the optic tentacle of Pulmonates. II. Cytochemistry of the special and secretory cells.
Acta biol. Acad. Sc. hung., 21 (1), 11-24.
- BOER (M.H.), 1963 - A preliminary note on the histochemistry of the neurosecretory material of the snail Lymnaea stagnalis.
Abstracts of papers, 2nd Conf. Europ. comp. Endocrinol., p. 7.
- BRACHET (J.), 1933 - Recherches sur la synthèse de l'acide thymonucléique pendant le développement de l'oeuf d'oursin.
Arch. Biol., 44, 519-576.
- BRIDGEFORD (H.B.) et PELLUET (D.), 1952 - Induced changes in the cells of the ovotestis of the slug, Deroceras reticulatum (Müller), with special reference to the nucleolus.
Canad. J. Zool., 30, 323-337.
- BRISSON (P.), 1967 - La castration chirurgicale chez Bulinus contortus (Michaud) truncatus (Audouin) (Mollusque Gastéropode Pulmoné).
C. R. Acad. Sc. Paris, 264, 131-133.

- CHETAIL (M.), 1956 - Caractères histologiques du blastème de régénération tentaculaire chez A. rufus.
C. R. Acad. Sc. Paris, 242, 1655-1656.
- CHETAIL (M.), 1963 - Etude de la régénération du tentacule oculaire chez un Arionidae (Arion rufus L.) et un Limacidae (Agriolimax agrestis).
Arch. Anat. micr. Morph. exp., 52 (suppl.), 130-203.
- CHEVALLIER (H.), 1969 - Taxonomie et biologie des grands Arion de France (Pulmonata : Arionidae).
Proc. 3rd Europ. Malac. Congr., Malacologia, 9 (1), 73-78.
- CHIARANDINI (D.J.), 1964 - A saline solution for Pulmonate Molluscs.
Life Science, 3, 1513-1518.
- CHOQUET (M.), 1969 - Contribution à l'étude du cycle biologique et de l'inversion du sexe chez Patella vulgata L. (Mollusque Gastéropode Prosobranche).
Thèse de Sciences, Lille, n° 185, 234 p.
- CLARK (R.B.), 1955 - The posterior lobes of the brain of Nephtys and the mucous glands of the prostomium.
Quart. J. Microscop. Sci., 96, 545-565.
- COE (W.R.), 1945 - Development of the reproductive system and variations in sexuality in Pecten and other Pelecypods molluscs.
Contr. Scripps Inst. Oceanogr. Univ. California, new series, 255, 673-700.
- COWDEN (R.R.), 1962 - Further cytochemical investigations on the growth and development of slug ovocytes.
Growth, 26, 209-234.
- DURCHON (M.), 1952 - Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides Polychètes : l'épitoque et la stolonisation.
Ann. Sc. Nat., 11e série, 14, 117-206.
- GALANGAU (V.), 1964 - Le cycle annuel de Milax gagates Drap. (Gastéropode Pulmoné) et ses deux pontes.
Bull. Soc. Zool. Fr., 89, 510-513.

- GALANGAU (V.), 1969 - Etude au microscope électronique de la gamétogenèse de Milax gagates Draparnaud 1801 (Gastéropodes - Pulmonés - Limacidae) Evolution des ultrastructures au cours de la spermatogenèse chez différents types de Mollusques.
Thèse de Sciences, Montpellier, C.N.R.S. Ao 3746, 151 p.
- GERMAIN (L.), 1930 - Mollusques terrestres et fluviatiles.
in : "Faune de France" n° 21, Le Chevalier Ed., Paris, 2 tomes, 477 p.
- GOMOT (L.) et GUYARD (A.), 1967 - La culture organotypique appliquée à l'endocrinologie d'un Mollusque Gastéropode Pulmoné : Helix aspersa Müll.
2nd International Colloquium on Invertebrates tissue culture -Istituto Lombardo : Fondazione Baselli, 22-31.
- GOTTFRIED (H.) et DOREFMAN (R.I.), 1969 - The steroid biochemistry of the molluscan ovotestis : A general concept of reproductive control mechanisms.
Proceedings of the third Congress of Endocrinology, Mexico 1968.
Excerpta Medica Foundation, 368-376.
- GOTTFRIED (H.) et DOREFMAN (R.I.), 1970 - Steroids of Invertebrates. IV. On the optic tentacle - gonadal axis in the control of the male-phase ovotestis in the slug (Ariolimax californicus).
Gen. and Comp. Endocr., 15, 101-119.
- GRAINGER (J.H.R.), 1952 - Histological observations on galactogen.
Stain Tech., 27, 81-85.
- GRIFFOND (B.), 1969 - Survie et évolution, en culture in vitro, des testicules de Viviparus viviparus L., Gastéropode Prosobranche à sexes séparés.
C. R. Acad. Sc. Paris, 268, 263-265.
- GUYARD (A.), 1967 - Féminisation de la glande hermaphrodite juvénile d'Helix aspersa Müll. associée in vitro au ganglion cérébroïde d'escargot adulte ou de Paludine femelle.
C. R. Acad. Sc. Paris, 265, 147-149.
- GUYARD (A.), 1969 - Elaboration d'un milieu synthétique enrichi destiné à la culture d'organes de Mollusques.
C. R. Acad. Sc. Paris, 268, 162-164.

- GUYARD (A.), 1969 - Autodifférenciation femelle de l'ébauche gonadique de l'escargot Helix aspersa Müll. cultivé sur milieu an hormonal.
C. R. Acad. Sc. Paris, 268, 966-969.
- GUYARD (A.), 1971 - Etude de la différenciation de l'ovotestis et des facteurs contrôlant l'orientation sexuelle des gonocytes de l'escargot Helix aspersa Müller.
Thèse de Sciences, Besançon, n° 56, 187 p.
- HEKSTRA (G.P.) et LEVER (J.), 1960 - Some effects of ganglion extirpations in Lymnaea stagnalis.
Konink. Nederl. Akad. Wetens, Proc. Ser. C, 63, 271-282.
- HENDERSON (N.E.) et PELLUET (D.), 1960 - The effect of visible light on the ovotestis of the slug Deroceras reticulatum (Müller).
Can. J. Zool., 38, 173-178.
- HERLANT-MEEWIS (H.) et VAN MOL (J.J.), 1959 - Phénomènes neurosécrétoires chez Arion rufus et Arion subfuscus.
C. R. Acad. Sc., 249, 321-322.
- HEYDER (P.), 1909 - Zur Entwicklung der Lungenhöhle bei Arion. Nebst Bemerkungen über die Entwicklung der Urniere, des Pericards und Herzens.
Zeit. Wiss. Zool., 93, 90-156.
- 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.), BOER (M.H.), CORNELISSE (J.), 1968 - Gametogenesis and oviposition in Lymnaea stagnalis as influenced by γ -irradiation and hunger.
Symp. Zool. Soc. Lond., 22, 213-235.
- JOOSSE (J.) et GERAERTS (W.J.), 1969 - On the influence of the dorsal bodies and the adjacent neurosecretory cells on the reproduction and metabolism of Lymnaea stagnalis.
Gen. Comp. Endocr., 13, 511 (Abstracts).
- JOOSSE (J.) et LEVER (J.), 1959 b - Techniques of narcotization and operation for experiments with Lymnaea stagnalis (Gastropoda Pulmonata).
Proc. Kon. Nederl. Ak. Watens. C, 62 (2), 145-149.

- KAPLAN (H.M.), 1969 - Anesthesia in Invertebrates.
Federation Proceedings, 28 (4), 1557-1569.
- KRAUSE (R.), 1960 - Untersuchungen über die Neurosekretion im Schlundring von Helix pomatia.
Z Zellforsch., 51, 748-776.
- KUHLMANN (D.), 1963 - Neurosekretion bei Heliciden.
Z. Zellforsch., 60, 909-932.
- KUHLMANN (D.) et NOLTE (A.), 1967 - Spermio-genese, Eireifung und Neurosekretion.
Untersuchungen an der Weinbergschnecke Helix pomatia L. (Gastropoda).
Z. Wiss. Zool., A, 176 (3-4), 271-286.
- KUPFERMANN (I.), 1970 - Stimulation of egg laying by extracts of neuroendocrine cells (bag cells) of abdominal ganglion of Aplysia.
J. Neurophysiol., 33 (6), 877-881.
- LANE (N.J.), 1962 - Neurosecretory cells in the optic tentacles of certain Pulmonates.
Quart. J. micr. Sci., 103, 211-226.
- LANE (N.J.), 1964 b - The fine structure of certain secretory cells in the optic tentacles of the snail Helix aspersa.
Quart. J. micr. Sci., 105, 35-47.
- LANE (N.J.), 1964 d - Further observations on the secretory cells in the optic tentacles of Helix, with special reference to the results of vital staining.
Quart. J. micr. Sci., 105, 61-72.
- LANE (N.J.), 1964 e - Semper's organ, a cephalic gland in certain Gastropods.
Quart. J. Micr. Sci., 105, 331-342.
- LAVIOLETTE (P.), 1954 - Etude cytologique et expérimentale de la régénération germinale après la castration chez Arion rufus L., Gastéropode Pulmoné.
Ann. Sc. Nat. Zool., 11^{ème} série, 16, 427-535.
- LAVIOLETTE (P.), 1954 b - Rôle de la gonade dans le déterminisme humoral de la maturité glandulaire du tractus génital chez quelques Gastéropodes Arionidae et Limacidae.
Bull. Biol., 88, 310-332.

- LEBRETON (J.), 1969 - Analyse expérimentale comparée des facteurs déterminants du cycle du tractus génital mâle chez un Gastéropode hermaphrodite Crepidula fornicata Phil. et chez un Gastéropode gonochorique Littorina littorea L.
Thèse de 3ème cycle Sciences, Caen, 113 p.
- LEVER (J.), JAGER (J.C.) et WESTERVELD, (A.), 1964 - A new anaesthetization technique for fresh water snails, tested on Lymnaea stagnalis.
Malacologia, 1, 331-338.
- LUBET (P.) et STREIFF (W.), 1969 - Etude expérimentale de l'action des ganglions nerveux sur la morphogenèse du pénis et sur l'activité génitale de Crepidula fornicata Phil. (Mollusque Gastéropode).
In : "Cultures d'organes d'Invertébrés" H. LUTZ, p. 141-160, Coll. "Cours et Documents de Biologie", Gordon et Breach Ed. Paris, London, New-York.
- LUBET (P.), STREIFF (W.), SILBERZAHN (N.) et LEBRETON (J.), 1969 - Mise en évidence de quelques aspects du rôle neurohumoral des différentes paires ganglionnaires du complexe cervical chez un Mollusque hermaphrodite protandre Crepidula fornicata Phil.
Bull. Soc. Zool. Fr., 94, 300-301.
- LÜSIS (O.), 1961 - Postembryonic changes in the reproductive system of the slug Arion ater rufus L.
Proc. Zool. Soc. London, 137, 433-468.
- LÜSIS (O.), 1966 - Changes induced in the reproductive system of Arion ater rufus L. varying environmental conditions.
Proc. malac. Soc. Lond., 37, 19-26.
- MARTOJA (M.), 1964 - Développement de l'appareil reproducteur chez les Gastéropodes Pulmonés.
Ann. Biol., III, 5-6, 199-232.
- MEENAKSHI (V.R.) et SCHEER (B.T.), 1969 - Regulation of galactogen synthesis in the slug Ariolimax columbianus.
Comp. Biochem. Physiol., 29, 841-845.
- MICHELSON (E.H.), 1958 - A method for the relaxation and immobilization of pulmonate snails.
Trans. Amer. micr. Soc., 77, 316-319.

- MORGAN (J.F.), MORTON (H.J.) et PARKER (R.C.), 1950 - Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (New-York), 73, 1-8.
- NOLTE (A.), 1967 - The mode of release of neurosecretory material in the fresh-water Pulmonate Lymnaea stagnalis L. (Gastropoda). Symposium on Neurobiology of Invertebrates 1967, 123-133.
- NOLTE (A.) et KUHLMANN (D.), 1964 - Histologie und Sekretion der Cerebraldrüse adulter Stylommatophoren (Gastropoda). Z. Zellforsch., 63, 550-567.
- NOURTIER (C.), 1971 - Méthodes d'estimation quantitative au service de la cytologie. Ann. Biol., 4e série, 10, (5-6), 242-277.
- PABST (H.), 1914 - Entwicklung des Genitalapparats von Arion empiricorum. Zool. Jahrb., 38, 465-508.
- PELLUET (D.), 1964 - On the hormonal control of cell differentiation in the ovotestis of slugs (Gasteropoda Pulmonata). Canad. J. Zool., 42, 195-199.
- PELLUET (D.) et LANE (N.J.), 1961 - The relation between neurosecretion and cell differentiation in the ovotestis of slugs (Gasteropoda Pulmonata). Canad. J. Zool., 39, 789-805.
- PELSENEER (P.), 1895 - L'hermaphrodisme chez les Mollusques. Arch. Biol., 14, 33-62.
- PENTREATH (V.W.) et COTTRELL (G.A.), 1970 - The blood supply to the central nervous system of Helix pomatia. Z. Zellforsch., 111, 160-178.
- PLATNER (G.), 1885 - Über die Spermatogenese bei Pulmonaten. Arch. mikrosk. Anat., 25, 564-580.
- QUATTRINI (D.), 1963 - La neurosecrezione nei Gastropodi Polmonati (Osservazioni in Milax gagates). Monit. Zool. Ital., 70-71, 56-96.
- QUATTRINI (D.), 1970 - La riproduzione di Milax gagates (Draparnaud), Mollusca Gastropoda Pulmonata. Bolletino della società Italiana di Biologia sperimentali, 46 (19), 802-805.

- QUATTRINI (D.) et LANZA (B.), 1965 - Ricerche sulla biologia dei Veronicellidae (Gastropoda, Soleolifera). II. Struttura della gonade, ovogenesi e spermatogenesi in Vaginulus borellianus (Colosi) e in Laevicaulis alte (Férussac).
Monit. Zool. Ital., 73, 3-60.
- RENZONI (A.), 1969 - Observations on the tentacles of Vaginulus borellianus Colosi (Mollusca : Gastropoda : Soleolifera).
Veliger, 12, 176-181.
- REYGROBELLET (D.), 1970 - Les effets du jeûne sur l'hépatopancréas de Limax maximus L.
Bull. Soc. Zool. Fr., 95, 2, 329-333.
- RICHTER (E.), 1935 - Der Bau der Zwitterdrüse und die Entstehung der Geschlechtszellen bei Agriolimax agrestis.
Iena Zeit. Naturwiss, 69, 507-544.
- RIPPLINGER (J.) et JOLY (M.), 1968 - Application d'une technique d'anesthésie à l'escargot (Helix pomatia) en vue d'interventions sur les organes de la région céphalo-pédieuse.
C. R. Soc. Biol., 154, 1003-1005.
- ROACH (D.K.), 1963 - Analysis of the haemolymph of A. ater L.
J. exp. Biol., 40, 4, 613-623.
- RÖHLICH (P.) et BIERBAUER (J.), 1966 - Electron microscopic observations on the special cells of the optic tentacle of Helicella obvia (Pulmonata).
Acta. biol. Acad. Sc. hung., 17, 359-373.
- RÖHNISCH (S.), 1964 - Untersuchungen zur Neurosekretion bei Planorbarius corneus (Basommatophora).
Z. Zellforsch. mikr. Anat., 63, 767-798.
- ROSE (M.) et HAMON (M.), 1939 - Sur l'influence des hormones sexuelles de synthèse chez le Mollusque Gastéropode Pulmoné Milax gagates Drap.
C. R. Soc. Biol., 131, 937-939.
- ROSENWALD (K.), 1927 - Beeinflussung der Geschlechtswechsel von Limax laevis.
Z. indukt. Abstamm. Vereblehre, 43, 238-251.

- RUNHAM (N.W.) et HUNTER (P.J.), 1970 - Terrestrial slugs.
Hutchinson University Library London, 184 p.
- RUNHAM (N.W.), ISARANKURA (K.) et SMITH (B.J.), 1965 - Methods for narcotizing and anesthetizing Gastropods.
Malacologia, 2, 231-238.
- RUNHAM (N.W.) et LARYEA (A.A.), 1968 - Studies on the maturation of the reproductive system of Agriolimax reticulatus (Pulmonata - Limacidae).
Malacologia, 7 (1), 93-108.
- SANCHEZ (S.), 1963 - Histophysiologie neuro-hormonale chez quelques Mollusques Gastéropodes. I. Complexes neuro-endocriniens.
Bull. Soc. Zool. Fr., 87, 309-319.
- SANCHEZ (S.) et BORD (C.), 1958 - Origine des cellules neurosécrétrices chez Helix aspersa Müll.
C.R. Acad. Sc. Paris, 246, 845-847.
- SANCHEZ (S.) et SABLIER (H.), 1962 - Histophysiologie neurohormonale chez quelques Mollusques Gastéropodes. II. Corrélations hormonales.
Bull. Soc. Zool. Fr., 87, 319-330.
- SMITH (B.J.), 1966 - Maturation of the reproductive tract of Arion ater (Pulmonata - Arionidae).
Malacologia, 4, 325-249.
- SMITH (B.J.), 1966 - The structure of the central nervous system of the slug Arion ater (Linn.) with notes on the cytoplasmic inclusions of the neurones.
J. Comp. Neurol., 126, 437-445.
- SMITH (B.J.), 1967 - Correlation between neurosecretory changes and maturation of the reproductive tract of Arion ater (Gastropoda, Stylommatophora, Arionidae).
Malacologia, 1, 73-114.
- STREIFF (W.), 1966 - Etude endocrinologique du déterminisme du cycle sexuel chez un Mollusque hermaphrodite protandre Calyptraea sinensis L.
I. Mise en évidence par culture in vitro de facteurs hormonaux conditionnant l'évolution du tractus génital mâle.
Ann. Endocrinol., 27, 3 bis, suppl., 385-400.

- STREIFF (W.), 1967 - Etude endocrinologique du déterminisme du cycle sexuel chez un Mollusque hermaphrodite protandre Calyptraea sinensis L. III. Mise en évidence par culture in vitro de facteurs hormonaux conditionnant l'évolution de la gonade.
Ann. Endocrinol., 28, 5, 641-656.
- TARDY (J.), 1967 - Régénération de la gonade après castration chirurgicale chez quelques Aelidiidae (Mollusques Nudibranches).
C.R. Soc. Biol., 161, 10, 2013-2016.
- TUZET (O.), SANCHEZ (S.) et PAVANS DE CECCATY (M.), 1957 - Données histologiques sur l'organisation neuroendocrine de quelques Mollusques Gastéropodes.
C. R. Acad. Sc. Paris, 244, 2962-2964.
- VAN MOL (J.J.), 1960 - Phénomènes neurosécrétoires dans les ganglions cérébroïdes d'Arion rufus.
C. R. Acad. Sc. Paris, 250, 2280-2281.
- VAN MOL (J.J.), 1960 - Etude histologique de la glande céphalique au cours de la croissance chez Arion rufus Linné.
Ann. Soc. Roy. Zool. Belg., 91 (1), 45-55.
- VAN MOL (J.J.), 1967 - Etude morphologique et phylogénétique du ganglion cérébroïde des Gastéropodes Pulmonés.
Acad. Roy. Belg. Cl. Sc. Mém., 37, fasc. 5, 168 p.
- VIANEY-LIAUD (M.), 1970 - Evolution de l'ovotestis d'Australorbis glabratus Say. (Gastéropode Pulmoné) cultivé seul ou en association avec le système nerveux central.
Bull. Soc. Zool. Fr., 95, n° 2, 249-258.
- VICENTE (N.), 1963 - Ablations des ganglions nerveux et osmorégulation chez Aplysia rosea Rathke (Gastéropode Opisthobranch).
C. R. Acad. Sc. Paris, 256, 2928-2930.
- VICENTE (N.), 1969 - Contribution à l'étude des Gastéropodes Opisthobranches du Golfe de Marseille. II. Histophysiologie du système nerveux. Etude des phénomènes neurosécrétoires.
Rec. Trav. St. Mar. Endoume, 46, 13-101.

WATTS (A.H.G.), 1952 - Spermatogenesis in the slug Arion subfuscus.

J. Morphol., 91, n° 1, 54-77.

WOLFF (E.) et HAPFEN (K.), 1952 - Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro.

Texas Rep. Biol. Med., 10, 463-472.

ZANNINI (M.A.), 1960 - La succezione dei fenomeni di differenziamento citosessual nella gonade giovanile di Helix cincta Müll.

Caryologia, 13, 285-296.

P L A N C H E I

Evolution de l'ovotestis d'A. subfuscus.

Stades 1 et 2

(Bouin Hollande, Hémalun-Eosine)

Fig. a - Gonade d'animal au Stade Immature (St. 1).

Les acini sont nettement délimités et disposés le long de la paroi de l'artère génitale (a.g.). Ils renferment des spermatogonies.

Fig. b - Gonade d'animal au Stade Juvénile (St. 2).

Les deux lignées coexistent dans les acini.

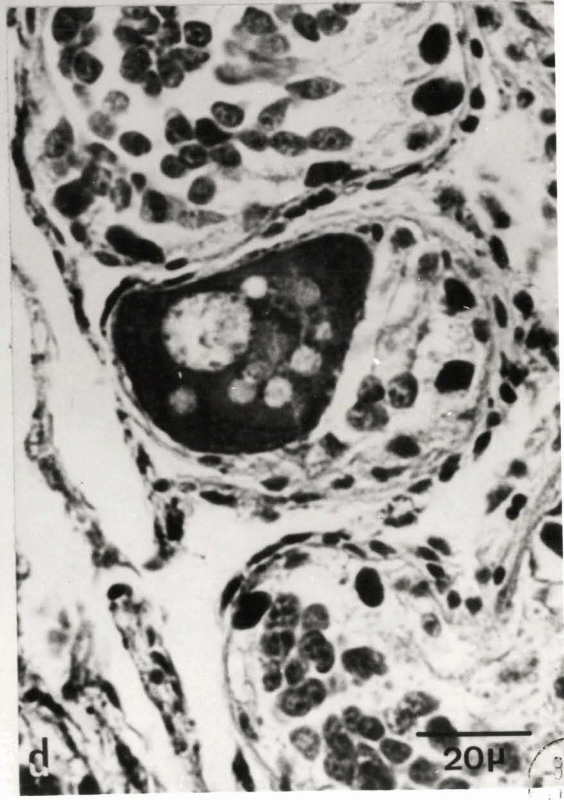
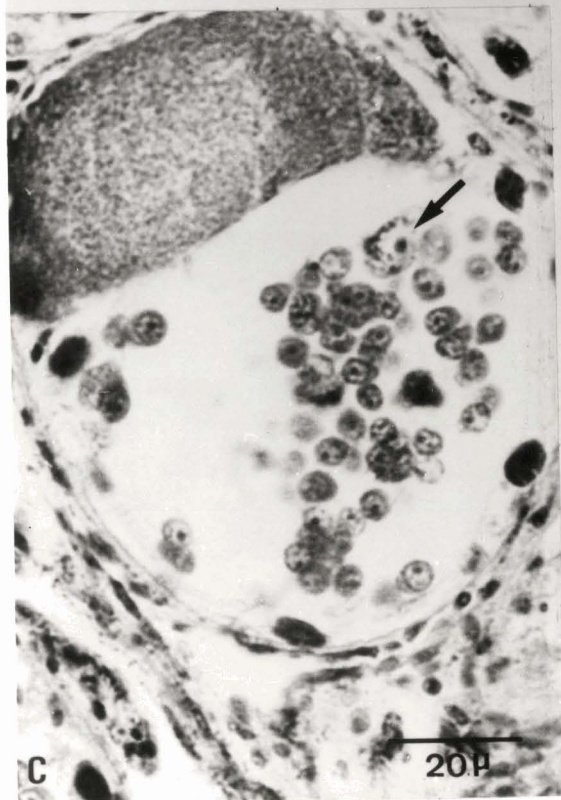
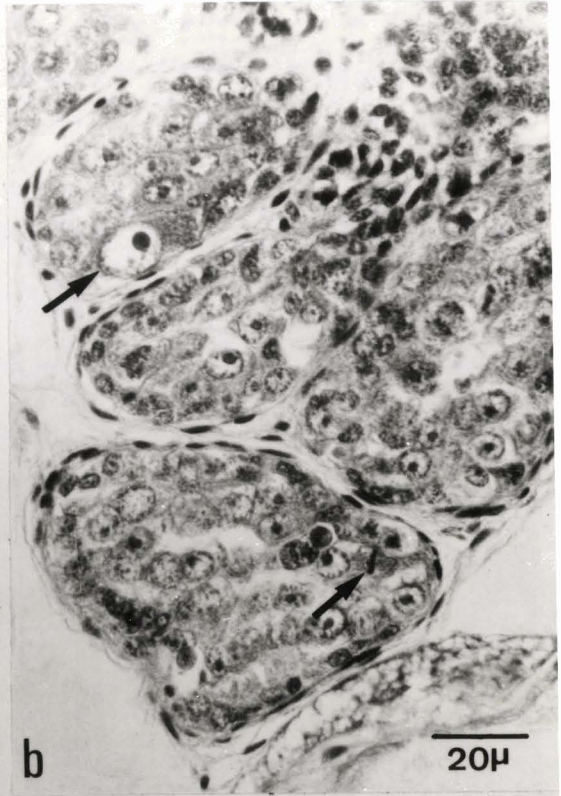
Remarquer un jeune ovocyte et une mitose spermatogonale (flèches).

Fig. c - Ovogonie et spermatogonies dans la gonade juvénile (St. 2).

Observer une ovogonie (flèche) moins colorable et de taille supérieure aux spermatogonies.

Fig. d - Gonade d'animal en fin de phase juvénile (St. 2).

Noter la présence d'un ovocyte, à cytoplasme vacuolisé, en début de dégénérescence.



BUS
LIVRE

P L A N C H E II

Evolution de l'ovotestis d'A. subfuscus.

Stade 4

(Bouin Hollande, Azan (a, b, c), Hémalum-Eosine (d, e, f)).

Fig. a - Gonade d'animal en tout début de Stade 4.

Les spermatocytes (sc) et les spermatides (st) sont disposés autour d'une cellule nourricière.

Fig. b - Gonade d'animal en début de Stade 4.

Remarquer quelques spermatozoïdes attachés à une cellule nourricière (flèche).

Fig. c, d, e, f - Gonades d'animaux en Stade 4 avancé.

c - Noter la présence d'un ovocyte et de spermatozoïdes.

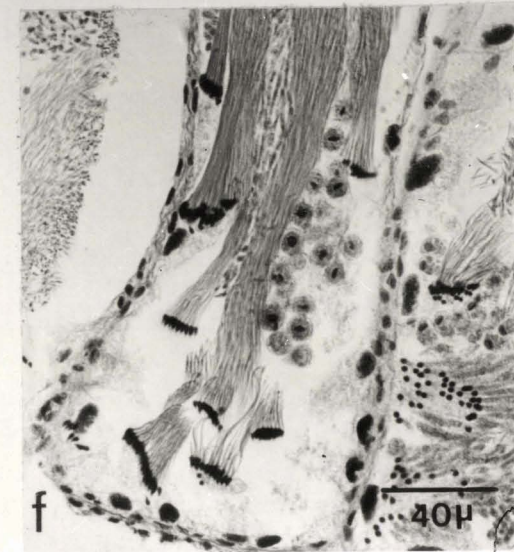
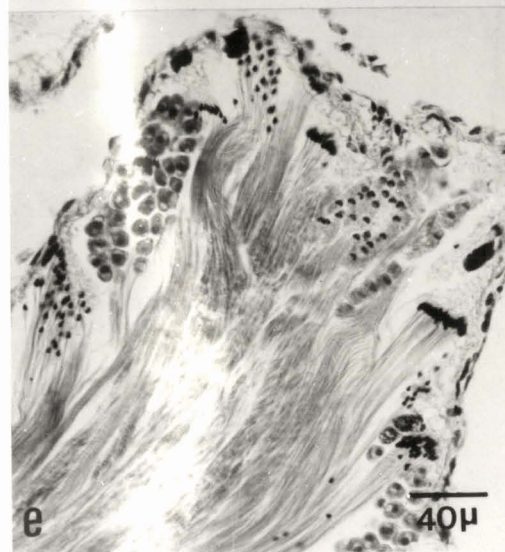
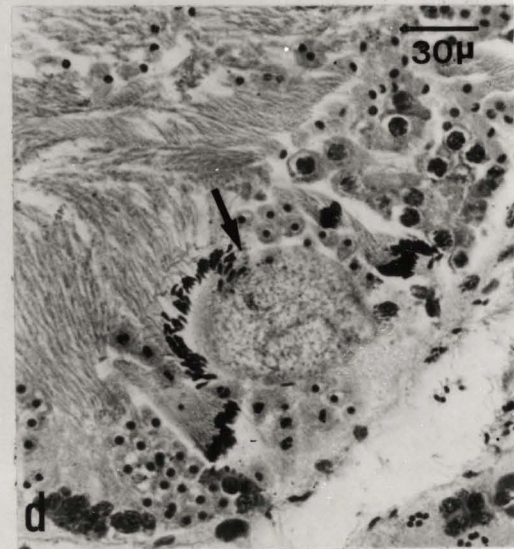
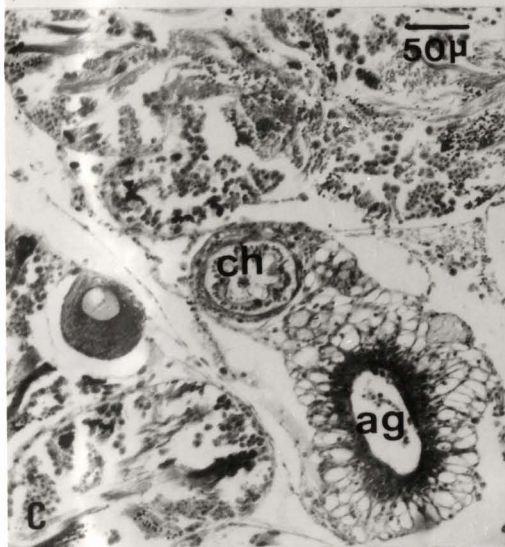
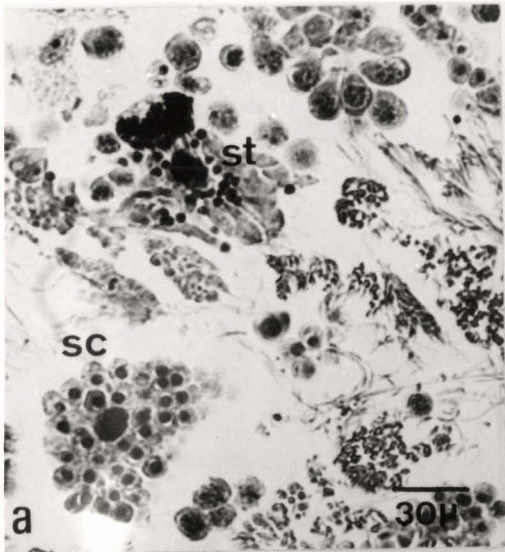
a.g : artère génitale

c.h : canal hermaphrodite

d - Observer la disposition des spermatozoïdes autour d'un ovocyte (flèche).

e - Les spermatocytes et les spermatides sont présents dans la gonade et les spermatozoïdes nombreux.

f - Remarquer la disposition des spermatozoïdes en faisceaux.



BUS
CIRCLE

P L A N C H E I I I

Evolution de l'ovotestis d'A. subfuscus.

Stades 5 et 6.

(Bouin Hollande, Hémalun-Eosine (a), triple coloration de Prenant (b, c, d)).

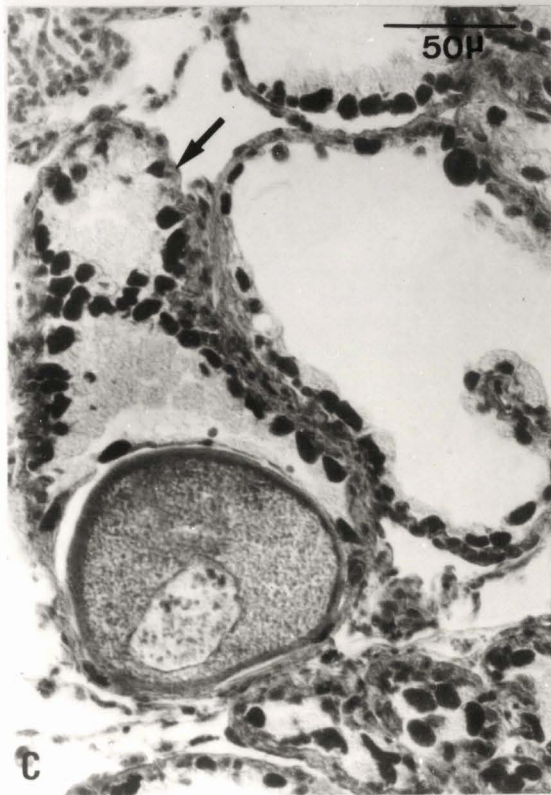
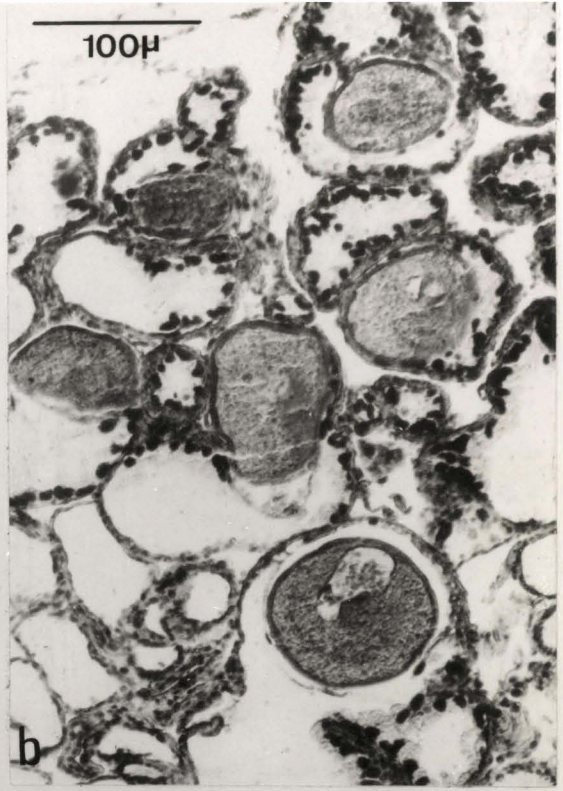
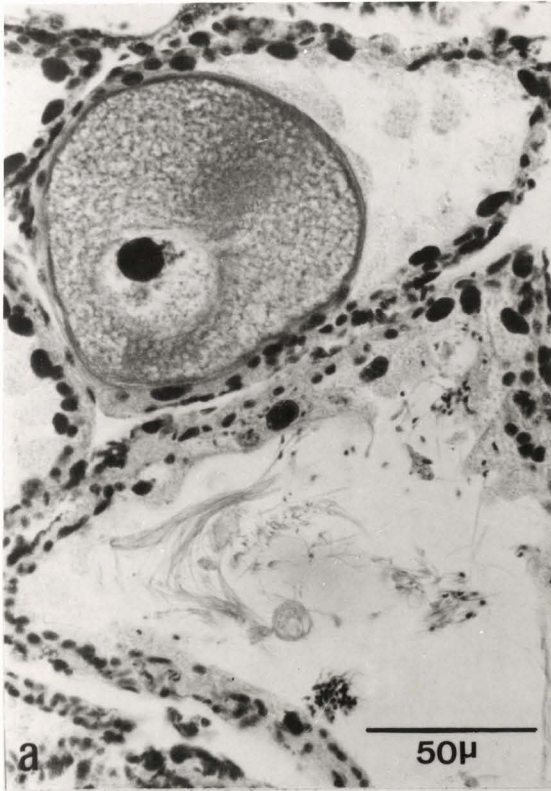
Fig. a - Gonade d'animal au début de la phase femelle (St. 5).
Quelques rares spermatozoïdes n'ont pas été éliminés.

Fig. b - Gonade d'animal en phase femelle (St. 5).
Les acini renferment généralement un ovocyte.

Fig. c - Gonade en fin de phase femelle (St. 5).
Remarquer les trois stades d'évolution : acinus renfermant un ovocyte, acinus vide (l'ovocyte a été pondue), acinus obturé par les cellules nourricières (flèche).

Fig. d - Gonade d'animal au stade atrophie (St. 6).
Les acini s'oblitérent. On ne retrouve aucun gamète.





BUS
LCC

P L A N C H E I V

Etude histologique du tentacule oculaire d'A. subfuscus.
(Bouin Hollande sans acide acétique - Coloration de Clark).

Fig. a - L'extrémité du tentacule oculaire.

Les neurones périphériques (n.p) au ganglion central digité
(gcd) envoient des axones dans la masse fibreuse centrale
(flèches).

C.C : cellules en collier.

Fig. b - Localisation des cellules en collier.

O : Oeil

C.C : cellules en collier.

Fig. c - Localisation des cellules latérales.

Noter leur taille inférieure à celle des cellules en collier
(Cf. Fig. e).

Fig. d - Détail des cellules en collier.

Les granulations cytoplasmiques sont sphériques et les
cellules possèdent des prolongements.

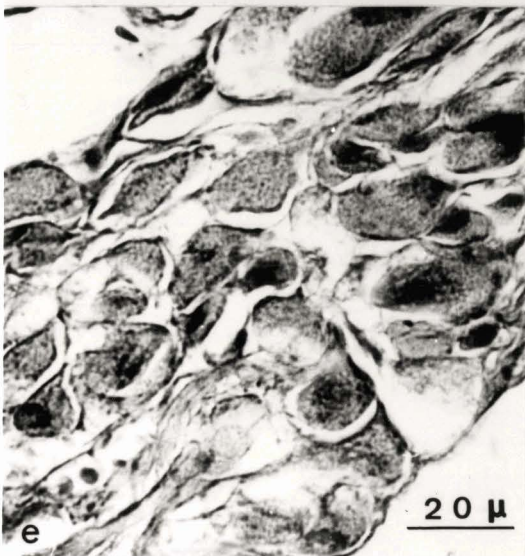
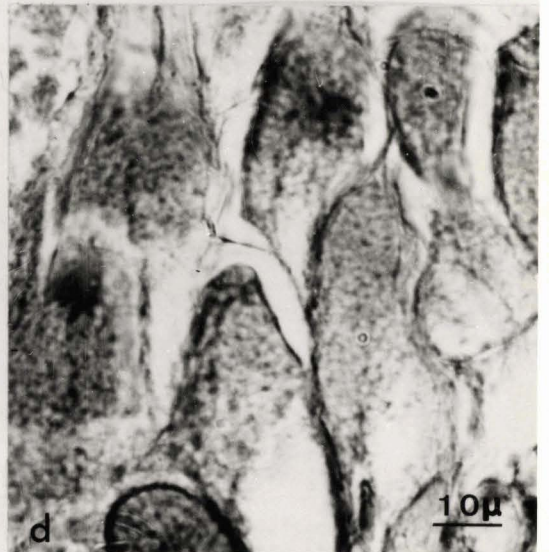
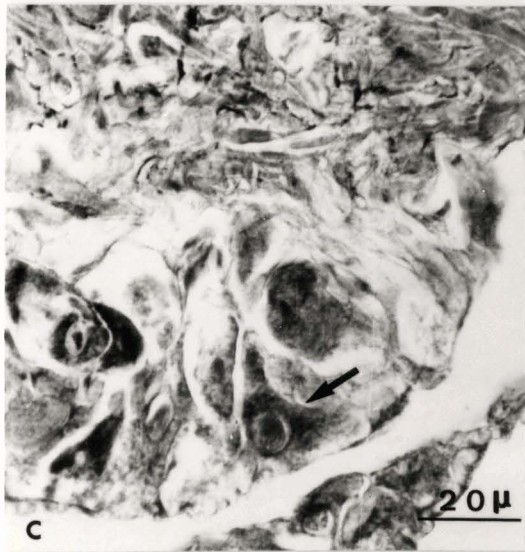
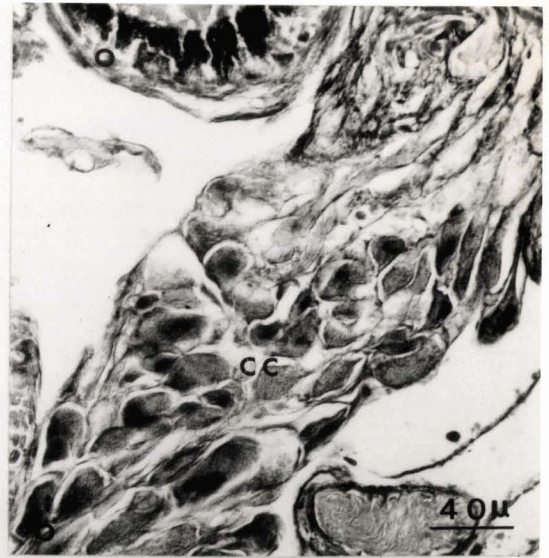
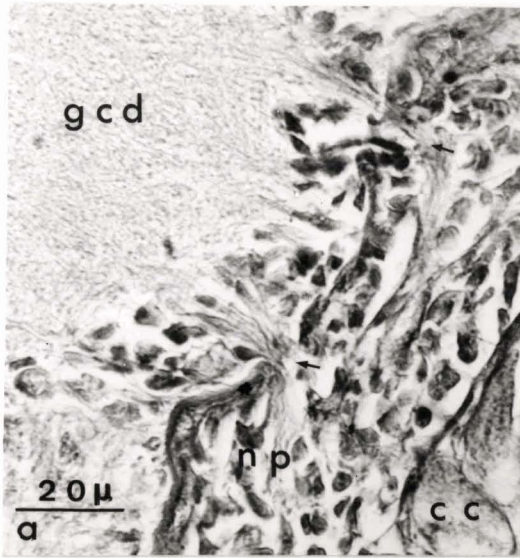
Fig. e - Cellules en collier d'un jeune animal.

Les granulations sphériques sont en nombre important.

Fig. f - Cellules en collier d'un animal en phase femelle.

Les granulations sont moins nombreuses que chez le jeune
animal.





BUS
L. 1954

P L A N C H E V

Etude histologique de la gonade d'A. subfuscus détentaculés dès l'éclosion et fixés à l'âge de trois mois.
(Bouin Hollande, Hémalun-Eosine).

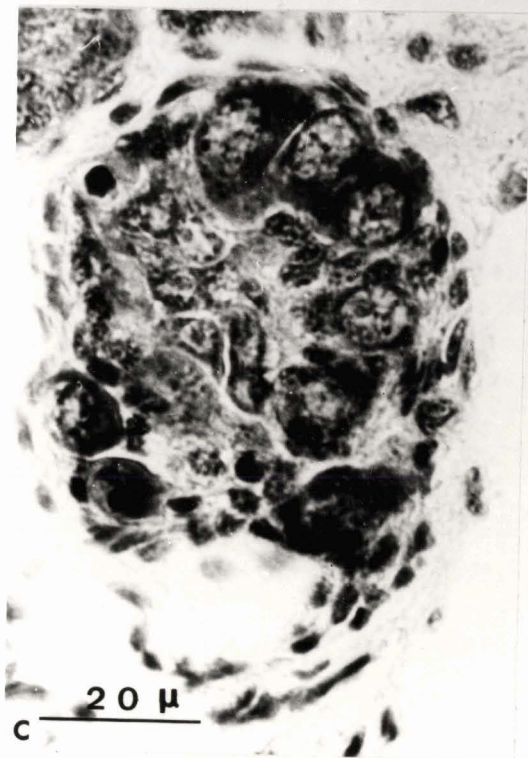
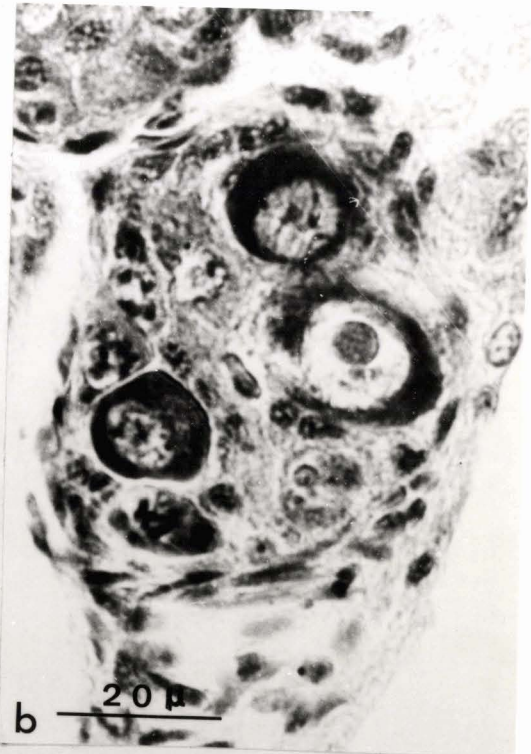
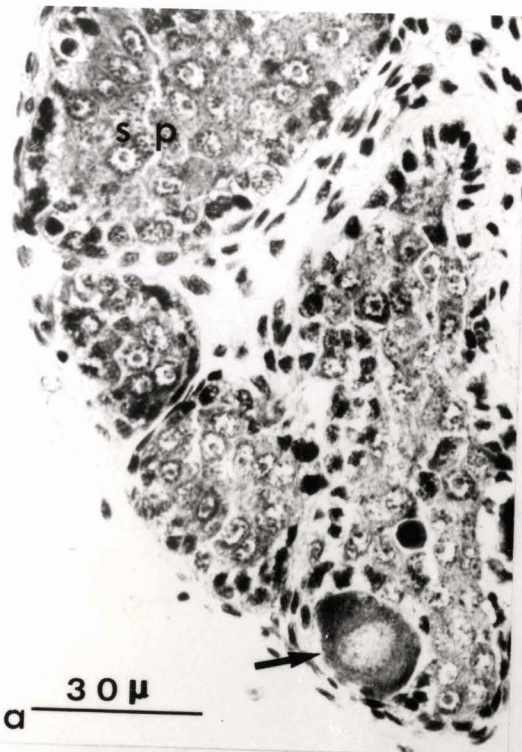
Fig. a - Gonade d'un animal témoin.

Présence de spermatogonies (sp) et d'un ovocyte (flèche)
par acinus.

Fig. b, c, d - Gonades d'animaux opérés.

Remarquer les trois stades d'évolution : acini à prédominance femelle plus ou moins marquée (fig. b et c) et acinus totalement féminisé (fig. d).





P L A N C H E VI

Etude histologique de la gonade d'A. subfuscus détentaculés dès l'éclosion et fixés à l'âge de trois mois (Fig. a, b, c) et de détentaculés en phase juvénile fixés après un mois d'expérimentation (Fig. d).

(Bouin Hollande, Hémalun-Eosine).

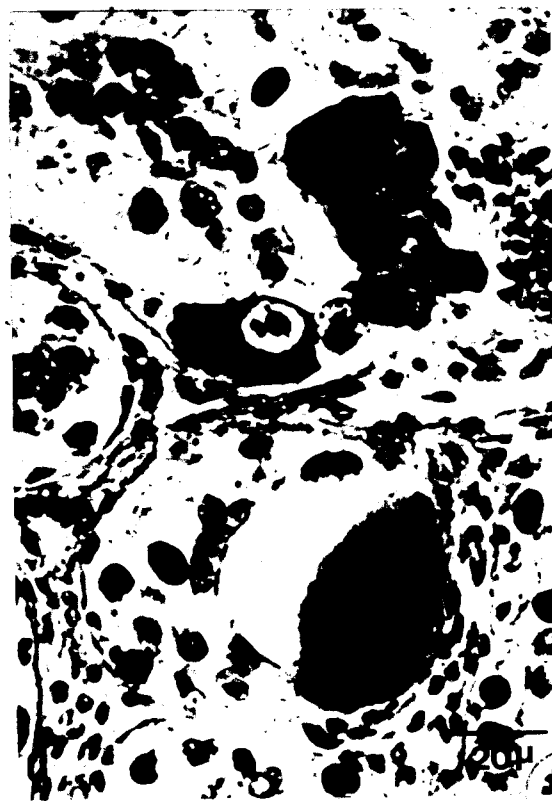
Fig. a - Apparition d'ovocytes de diamètre nettement supérieur à celui des témoins (Cf. Pl. V, fig. a).

Fig. b - Acinus renfermant trois ovogonies (flèches).

Fig. c - Stades de préméiose ovocytaire (flèches).

Fig. d - Poussée de jeunes ovocytes pariétaux dans la gonade d'un animal détentaculé en phase juvénile, après un mois d'expérimentation.





C



P L A N C H E VII

Etude histologique de la gonade d'A. subfuscus détentaculés dès l'éclosion et fixés à l'âge de huit et dix mois.

(Bouin Hollande, Hémalun-Eosine (a, b, c) - Triple coloration de Prenant (d, e) - Carmin de Best (f)).

Fig. a - Gonade d'un animal témoin ~~fixée~~ à l'âge de huit mois.

Des spermatocytes et quelques spermatides (flèche) sont présents.

Fig. b - Gonade d'opéré fixée à l'âge de huit mois.

Remarquer l'apparition de volumineux ovocytes.

Fig. c - Gonade d'un animal témoin fixée à l'âge de dix mois.

Tous les stades de la spermatogenèse sont observables : spermatocytes, spermatides, spermatozoïdes.

Fig. d et e - Gonades d'opérés fixées à l'âge de dix mois.

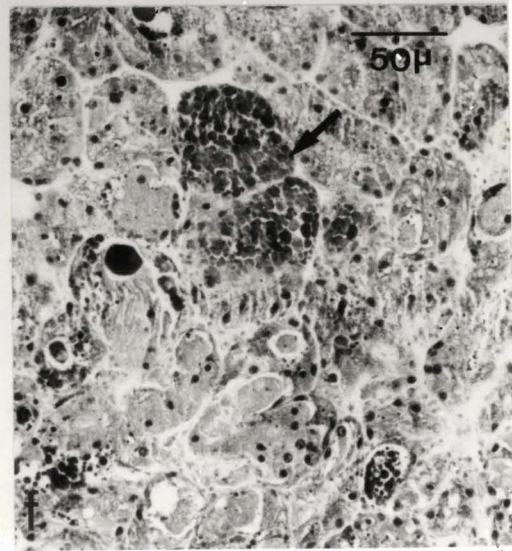
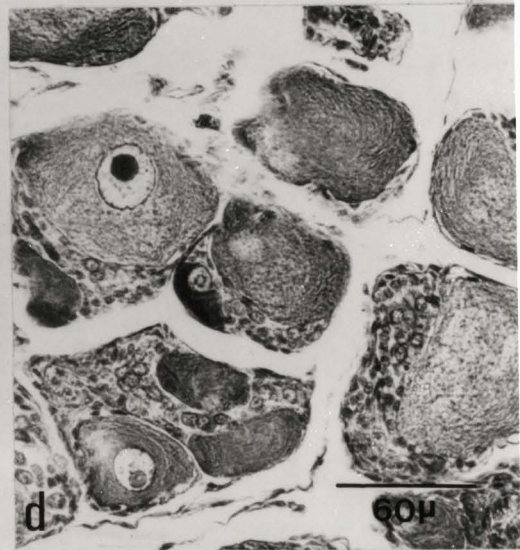
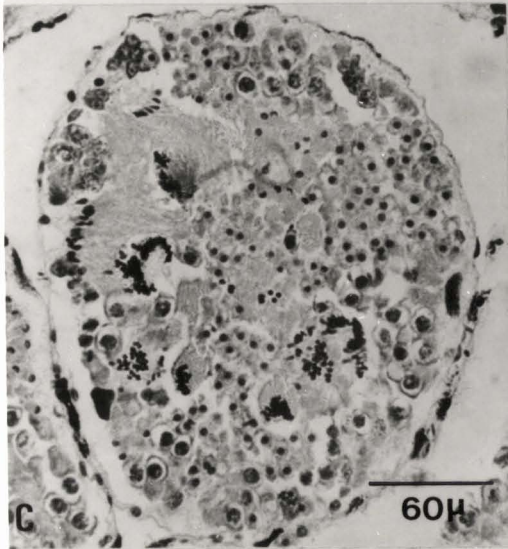
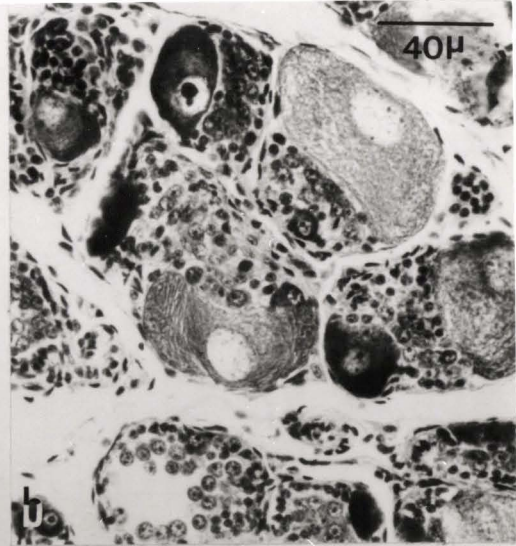
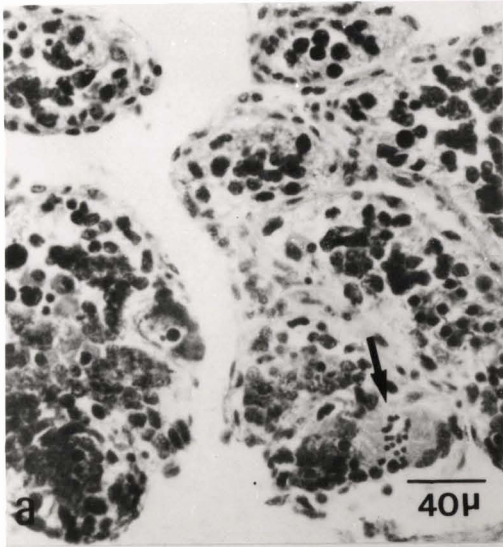
d - Les ovocytes d'un diamètre de 90 μ sont fréquents, certains acini sont féminisés. Les spermatogonies sont assez peu nombreuses.

e - Aspect d'un gros ovocyte apparu à la suite de la détentaculation.

Fig. f - Glande de l'albumine d'un opéré fixée à l'âge de dix mois.

Noter la présence d'amas de galactogène (flèche), mis en évidence par le Carmin de Best.





P L A N C H E VIII

Etude histologique de la régénération germinale chez A. subfuscus après castration précédée ou non de détentaculation.

Fixations deux mois et demi et quatre mois après opération.

(Bouin Hollande, Hémalun-Eosine).

Fig. a - Régénérat de deux mois et demi obtenu après castration simple.

Certaines cryptes commencent à se remplir de cellules germinales. D'autres renferment déjà des spermatogonies et des ovocytes (flèche).

Fig. b - Régénérat de deux mois et demi obtenu après castration précédée de détentaculation.

Noter la présence d'acini renfermant plusieurs jeunes ovocytes (flèches).

Fig. c - Régénérat obtenu au bout de quatre mois chez un castrat simple.

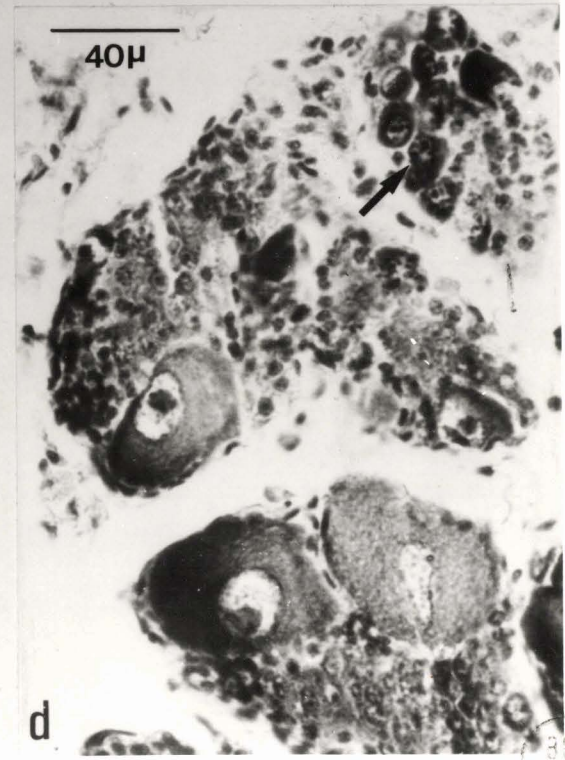
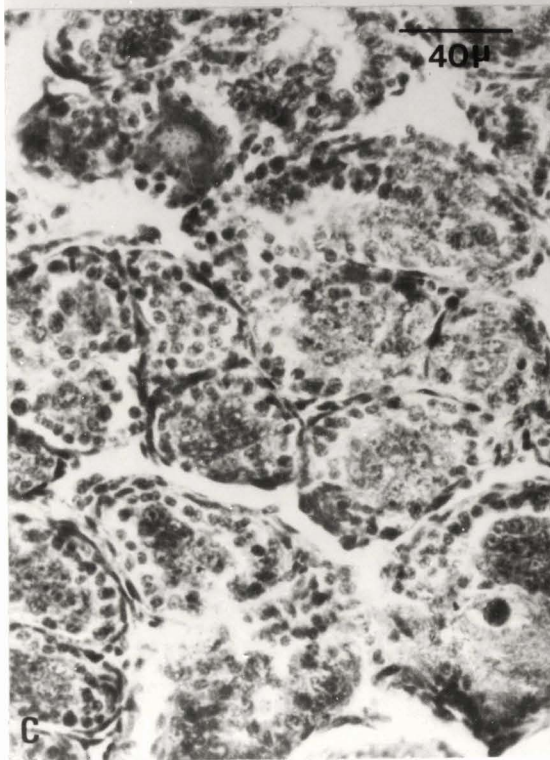
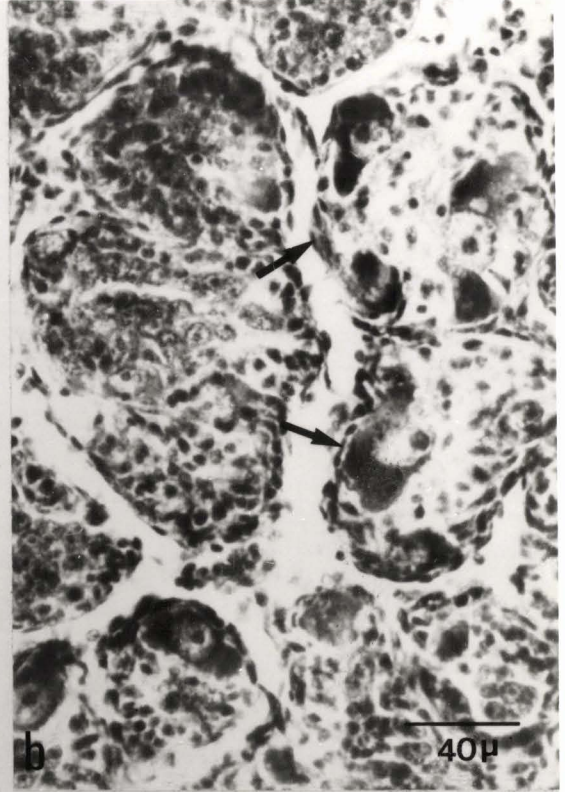
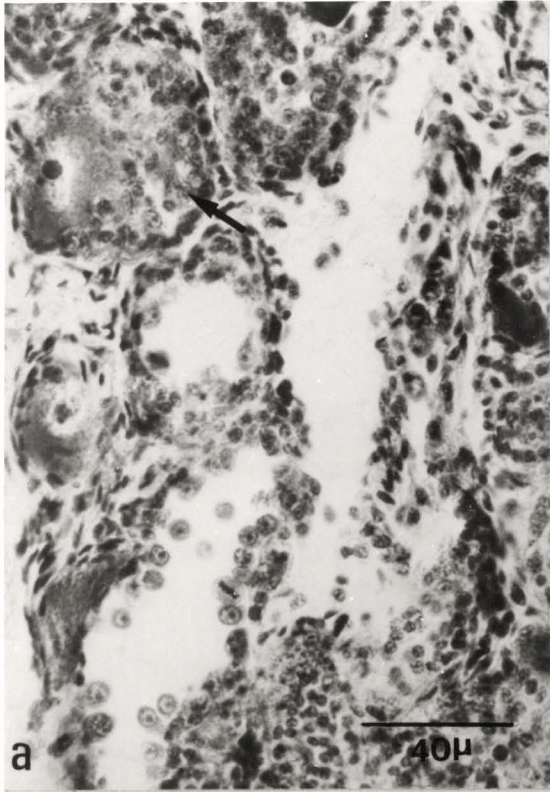
Certains acini sont mixtes et tous sont dès lors bien remplis.

Fig. d - Régénérat de quatre mois prélevé chez un animal détentaculé puis castré.

La poussée ovocytaire se traduit par la présence d'acini nettement féminisés (flèche) et d'ovocytes plus gros que chez les castrats simples.

Néanmoins, les spermatogonies sont toujours présentes.





BUS
LITHO

P L A N C H E IX

Etude histologique de la régénération germinale chez A. subfuscus après castration précédée ou non de détentaculation.

Fixations sept mois après opération.

(Bouin Hollande, Triple coloration de Prenant).

Fig. a - Aspect d'une gonade régénérée chez un castré simple.

Les spermatogonies sont nombreuses et les ovocytes généralement retrouvés à la fréquence d'un par acinus.

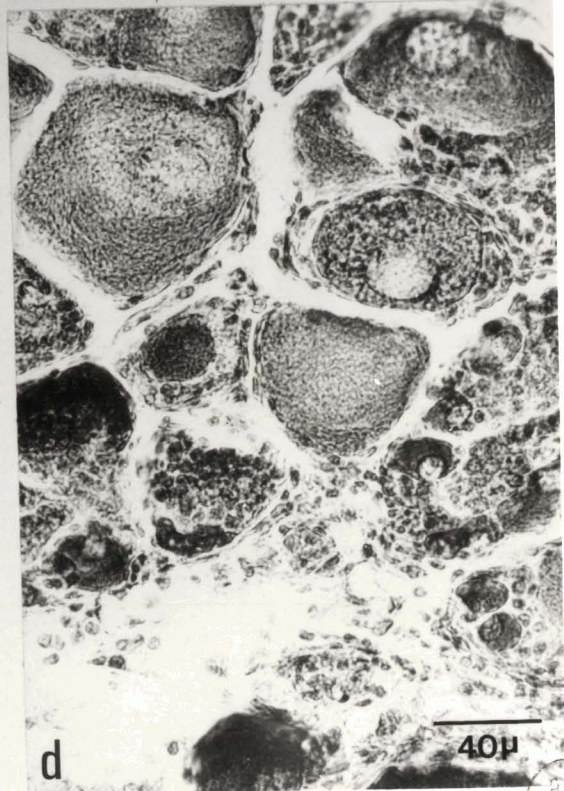
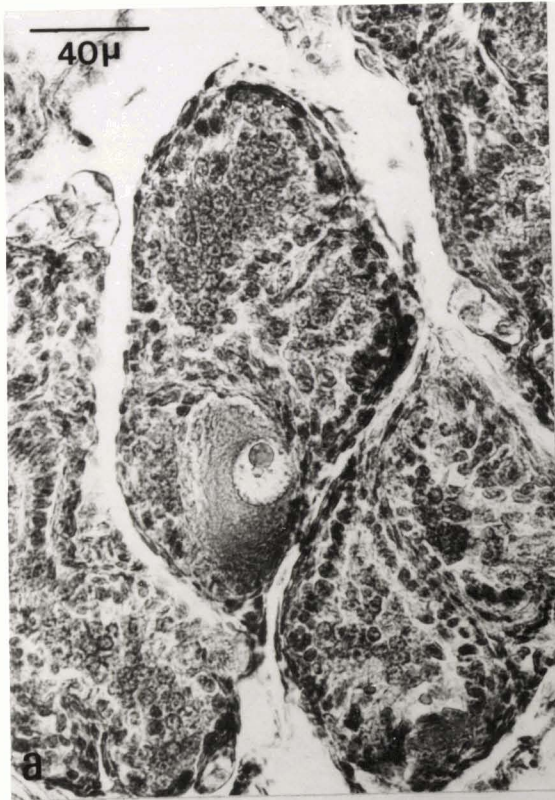
Fig. b - Vue d'ensemble d'un régénérat d'animal détentaculé puis castré.

La gonade est nettement féminisée.

Fig. c et d - Détails de la figure b.

Certains acini renferment plusieurs ovocytes, d'autres sont complètement féminisés.





BUS
LIFE

P L A N C H E X

Etude histologique de gonades d'A. subfuscus cultivées isolément.
(Bouin Hollande, Triple coloration de Prenant (a, b) - Hémalum-
Eosine (c,d)).

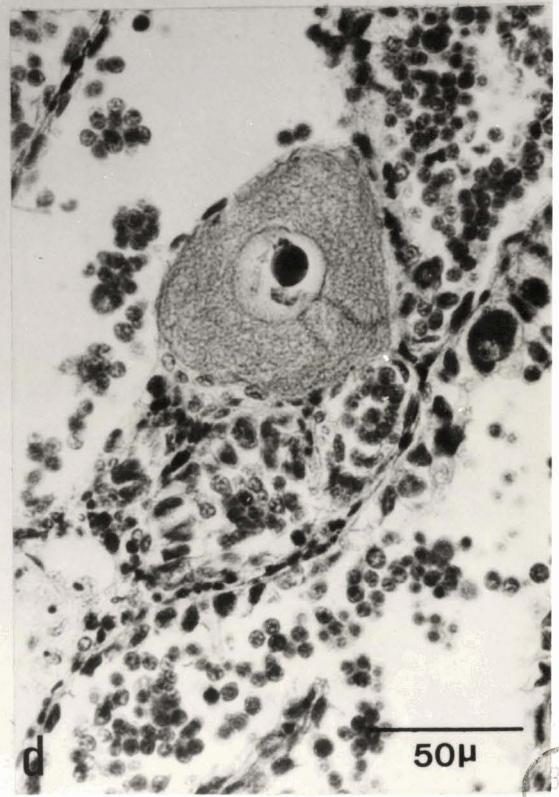
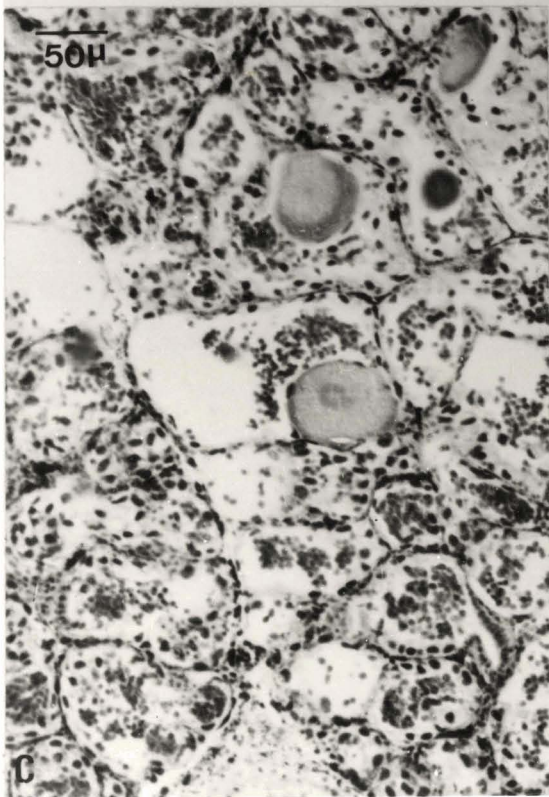
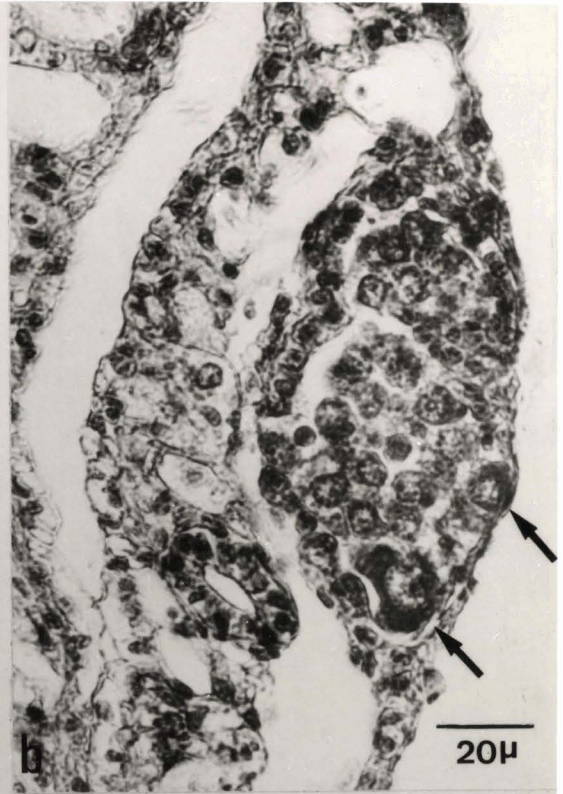
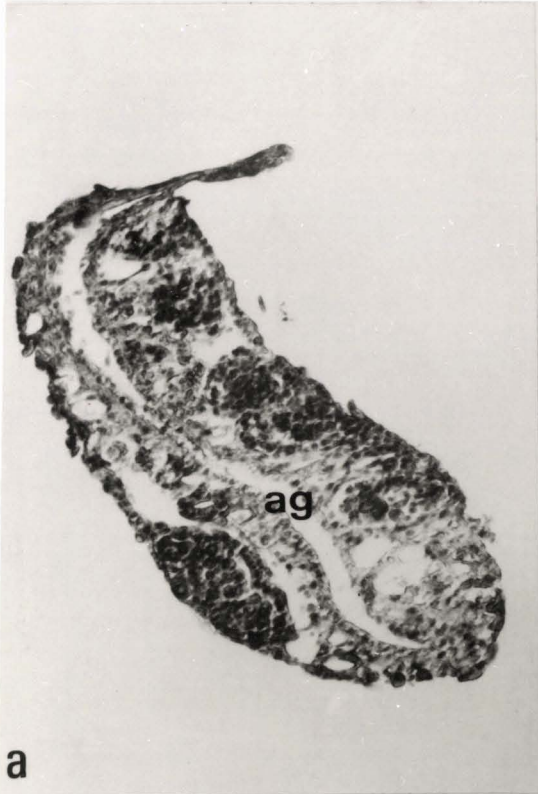
Fig. a - Aspect d'ensemble d'un explant prélevé sur un animal âgé
de vingt jours et cultivé neuf jours sur milieu R.
a.g : artère génitale.

Fig. b - Remarquer l'apparition de jeunes ovocytes pariétaux (flèches)
dans une gonade au stade immature, après neuf jours de cultu-
re sur milieu R.

Fig. c - Aspect d'une gonade juvénile après vingt quatre jours de
culture sur milieu G₂.
Noter la présence de quelques gros ovocytes.

Fig. d - Gros ovocyte apparu dans une gonade juvénile cultivée vingt-
quatre jours sur milieu G₂.





P L A N C H E X I

Etude histologique de gonades juvéniles d'A. subfuscus cultivées quinze jours sur milieu G₂ associées au complexe céphalique, aux tentacules oculaires ou au cerveau.

(Bouin Hollande, Hémalun-Eosine (a, b) - Triple coloration de Prenant (c, d, e, f)).

Fig. a - Aspect d'une gonade juvénile.

Remarquer la présence des deux lignées gamétogénétiques et les mitoses spermatogoniales (flèche).

Fig. b - Association autologue de la gonade juvénile avec le complexe céphalique.

L'ovotestis reste au stade juvénile.

Fig. c - Association autologue, en phase juvénile, de la gonade avec les tentacules oculaires (t.o).

Fig. d - Même association à un plus fort grossissement.

Noter un ovocyte dégénéré (flèche) en bordure du tentacule oculaire (t.o).

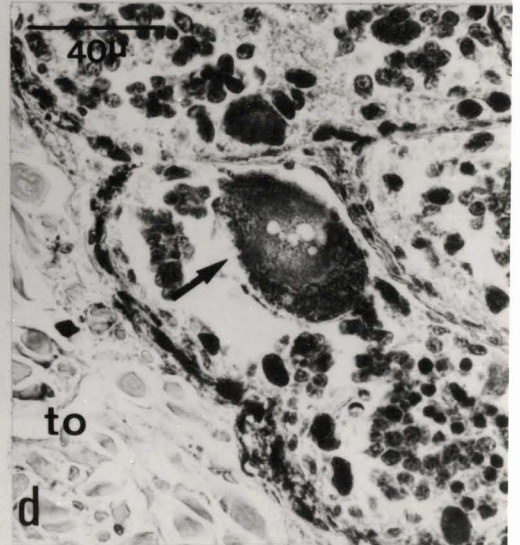
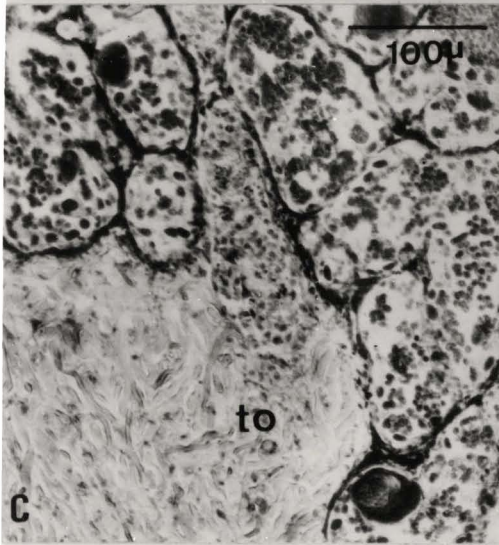
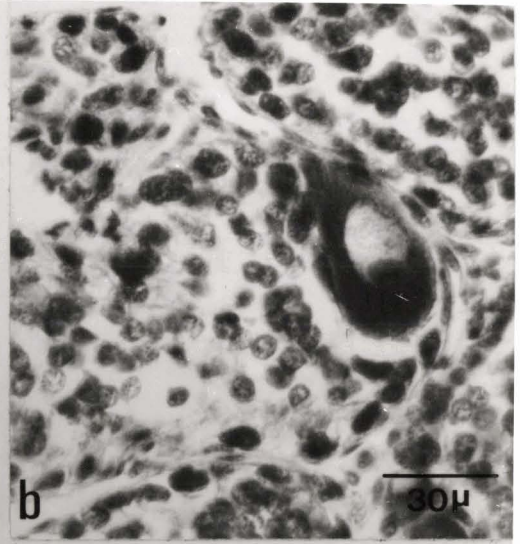
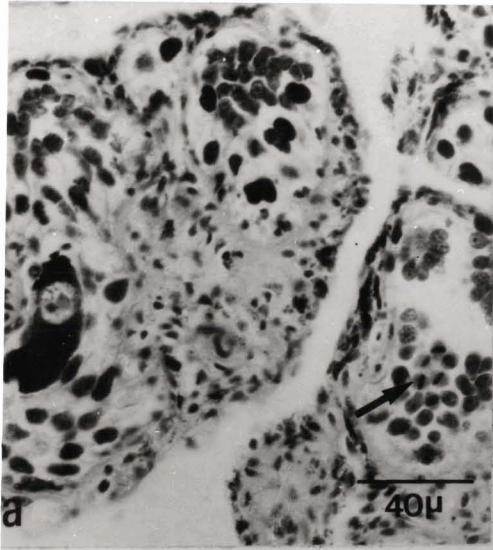
Fig. e - Association autologue, en phase juvénile, de la gonade avec le cerveau.

En bordure des ganglions cérébroïdes (g.c), les acini sont féminisés.

Fig. f - Détail de la figure précédente.

Remarquer un acinus renfermant quatre ovocytes (flèche).





P L A N C H E X I I

Etude histologique de la gonade d'A. subfuscus soumis, dès l'éclosion, à diverses conditions d'éclairement.

(Bouin Hollande, Hémalun-Eosine).

Fig. a, b, c - Fixations à l'âge de cinq mois.

a - Exposition à douze heures de lumière par jour.

Spermatogonies et ovocytes en phase d'accroissement remplissent les acini.

b - Exposition à la lumière continue.

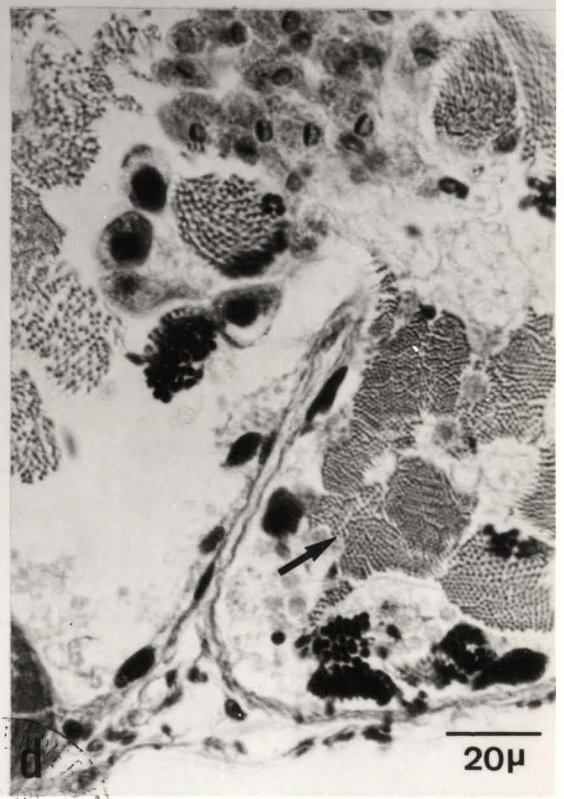
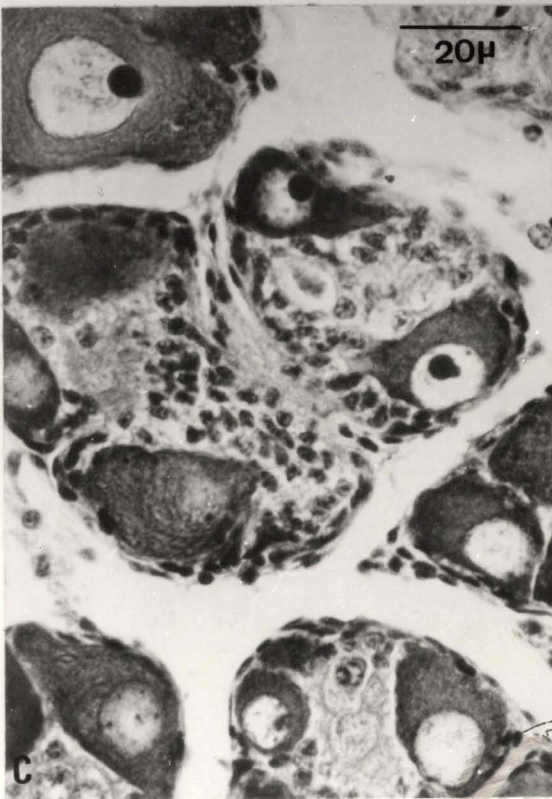
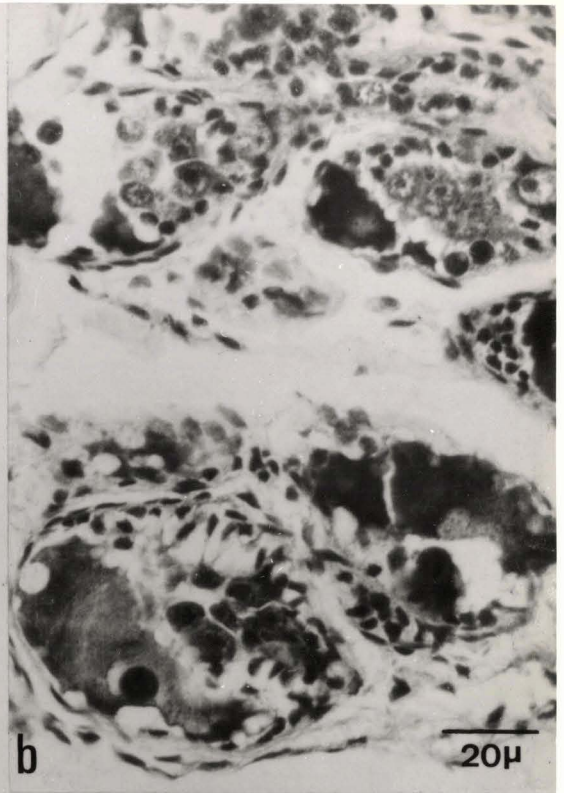
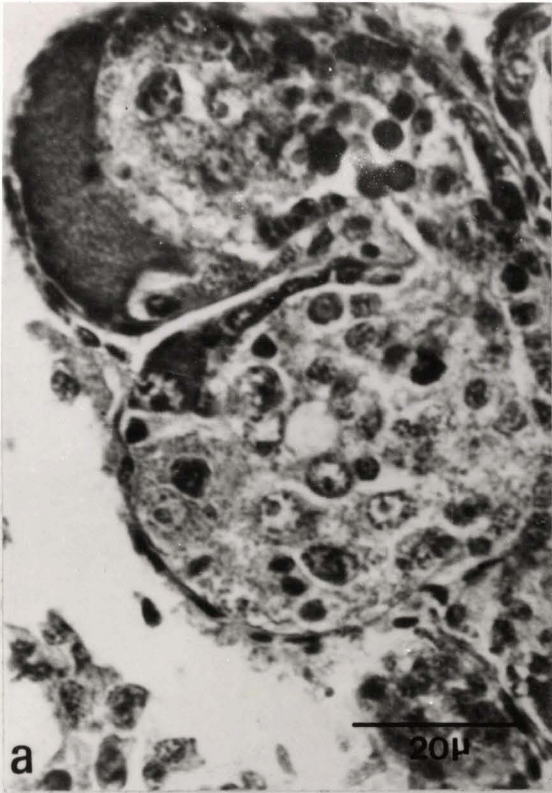
Noter la présence de nombreux ovocytes en dégénérescence.

c - Imposition d'une obscurité continue.

Des acini renferment plusieurs ovocytes, la lignée mâle est peu représentée.

Fig. d - Gonade d'un animal de huit mois soumis à une lumière continue.

Elle se trouve au stade 4. Y remarquer la présence de spermatozoïdes (flèche).



BIEN
BIEN
VILLE