

50376
1980
52

N° d'ordre: 478

50376
1980
52

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques de Lille
pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences Naturelles

par

Christian WATTEZ

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

SUR LE DÉTERMINISME DE LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE ET DU FONCTIONNEMENT DE LA GONADE CHEZ LE PULMONÉ STYLOMMATOPHORE HERMAPHRODITE ARION SUBFUSCUS DRAPARNAUD



Soutenue le 7 mai 1980 devant la Commission d'examen

Président, Directeur du Travail et Rapporteur:

M. M. DURCHON, *Professeur à l'Université de Lille*

Rapporteurs:

M. A. RICHARD, *Professeur à l'Université de Lille*

M. W. STREIFF, *Professeur à l'Université de Caen*

Examineurs:

M. L. GOMOT, *Professeur à l'Université de Besançon*

M. M. PORCHET, *Professeur à l'Université de Lille*

Membre invité:

M. J. JOOSSE, *Professeur à la Vrije Universiteit d'Amsterdam*

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale

M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Sciences de la Terre
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Sciences de la Terre
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale

M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUBRULLE Alain	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. HOUDART René	Mathématiques
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEMAIRE Jean	Physique
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M. LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGÉ Francis	Electronique
M. MACKÉ Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquée
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislav	Electronique
M. RICHARD Alain	Biologie

M. RIETSCH François	Chimie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M. SCHAMPS Joël	Physique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Biologie
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Chimie
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
Mme ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

A mes parents.

A Agnès

AVANT-PROPOS

Avant de commencer l'exposé de ce travail réalisé au Laboratoire de Biologie Animale de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, il m'est particulièrement agréable de remercier Monsieur le Professeur M. DURCHON, Membre Correspondant de l'Académie des Sciences, qui m'a proposé dans le cadre du Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 148 (Endocrinologie comparée des Invertébrés), dont il est le Directeur, un sujet de recherches relatif aux limaces. Il m'a accueilli dans son laboratoire et a accepté de diriger mes travaux. Je lui suis très reconnaissant d'avoir suivi avec sollicitude mes premiers pas de chercheur en me faisant bénéficier de sa grande compétence. Généreux de son temps et de ses connaissances, il n'a jamais cessé de témoigner un vif intérêt à mon travail et par ses conseils éclairés, ses critiques et les corrections apportées à mes manuscrits m'a été d'un précieux soutien. Ma gratitude à son égard est profonde et sincère.

Mes plus vifs remerciements vont également à Madame M. MARTOJA, Maître de Recherche au C.N.R.S., qui a bien voulu accepter de me parrainer au C.N.R.S. Sa parfaite connaissance des Gastéropodes m'a aidé à mieux saisir les problèmes posés par les Mollusques hermaphrodites.

Monsieur le Professeur J. JOOSSE de la Vrije Universiteit d'Amsterdam m'a, malgré ses nombreuses occupations, fait l'honneur d'accepter de participer à ce Jury. Ses recherches sur la limnée, ainsi que celles de ses collaborateurs, représentent pour les malacologistes du monde entier un guide particulièrement précieux. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma respectueuse considération.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait l'un des pionniers de la culture organotypique chez les Mollusques, Monsieur le Professeur W. STREIFF, Directeur de l'U.E.R. de Biologie de l'Université de Caen, en consentant à juger ce travail. C'est l'analyse de ses travaux relatifs à la sexualité des Gastéropodes Prosobranches qui m'a communiqué le désir d'expérimenter sur les Mollusques. Je lui exprime, avec ma profonde admiration, ma respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur L. GOMOT de la Faculté des Sciences et des Techniques de Besançon a accepté de faire partie de ce jury. Son expérimentation *in vitro* chez le Pulmoné *Helix aspersa* et ses mises au point régulières ont contribué à améliorer mes connaissances sur les Gastéropodes. Qu'il soit assuré de mon profond respect.

Je suis particulièrement reconnaissant à Monsieur le Professeur A. RICHARD, de l'Université de Lille, de siéger à ce jury et de me faire profiter de son grand savoir sur la biologie des Mollusques et plus particulièrement celle des Céphalopodes.

Monsieur le Professeur M. PORCHET, Directeur de l'U.E.R. de Biologie de l'Université de Lille et spécialiste de l'endocrinologie des Annélides a bien voulu s'intéresser à ce travail et se joindre à mon jury de Thèse. Je l'en remercie très vivement.

A ces remerciements, j'associe tous les membres du Laboratoire de Biologie Animale qui ont su créer autour de moi une ambiance de chaude camaraderie et m'ont aidé, chacun à leur façon, à mener à bien ce travail. Monsieur G. MONTAGNE s'est occupé des techniques de microscopie et à certaines époques de l'entretien des élevages. Mesdemoiselles N. DROUX et M. HERIVEAUX, ainsi que Madame M.-Ch. SLOMIANNY m'ont aidé avec dévouement et compétence dans les tâches ingrates que nécessitent les cultures organotypiques. Madame F. BONET a assuré avec gentillesse l'essentiel de la dactylographie de ce mémoire et, par ses initiatives judicieuses, m'en a facilité la réalisation. Madame Y. HIMPENS a effectué une partie de la dactylographie ; Monsieur G. HIMPENS a confectionné les dessins ; Madame A. AUGER et Monsieur D. LAZARECKI se sont chargés des reproductions photographiques. Que tous soient assurés de mon amicale reconnaissance.

Enfin, je ne saurais oublier ma compagne Agnès. Par sa présence à mes côtés et son aide efficace, elle a grandement contribué à la présentation de cet ouvrage.

"La marche de l'expérience est si lente, qu'un physicien qui voudrait attendre pour publier le résultat de ses travaux qu'il en fût entièrement satisfait, risquerait d'arriver au bout de sa carrière sans avoir rempli la tâche qu'il s'était imposée et sans avoir rien fait pour la science et pour la société ; il faut donc avoir le courage de donner des choses imparfaites, de renoncer au mérite d'avoir fait tout ce qu'on pouvait faire, d'avoir dit tout ce qu'on pouvait dire ; enfin savoir sacrifier son amour-propre au désir d'être utile et d'accélérer le progrès des sciences"

LAVOISIER

(Premier Mémoire sur la destruction du diamant, 1772).

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p. 1
MATERIEL ET TECHNIQUES	p. 5
PREMIERE PARTIE : LA GONADE	p. 12
I - DEVELOPPEMENT DE LA GONADE	p. 13
A - Origine	p. 13
B - Localisation et aspect	p. 14
C - Croissance	p. 17
II - LA GONADE, ORGANE ENDOCRINE	p. 17
III - CYCLE SEXUEL : RESULTATS PERSONNELS RELATIFS	
A LA GAMETOGENESE	p. 19
A - La gonade embryonnaire	p. 19
B - La gonade post-embryonnaire	p. 20
1 - La phase infantile (stade 1)	p. 20
2 - La phase juvénile (stade 2)	p. 22
3 - Le début de la phase mâle (stade 3)	p. 25
4 - La phase mâle mature (stade 4)	p. 26
5 - La phase femelle (stade 5)	p. 26
6 - La phase d'atrophie complète de la gonade (stade 6)	p. 27
C - Caractéristiques de l'hermaphrodisme chez <i>Arion</i> <i>subfuscus</i>	p. 27
1 - L'hermaphrodisme chez les Mollusques Gastéropodes	p. 27
2 - L'hermaphrodisme chez <i>Arion subfuscus</i>	p. 28

IV - INFLUENCE DES FACTEURS EXTERNES SUR LE DEROULEMENT DE LA GAMETOGENESE	p. 28
A - Influence de l'humidité	p. 28
B - Influence du régime alimentaire	p. 29
C - Influence de la température	p. 29
D - Influence de la lumière	p. 30
V - DISCUSSION et CONCLUSION	p. 30
A - Notion d'épithélium germinatif	p. 30
B - Notions de cellule-souche et de protogonie	p. 31
C - La différenciation des deux lignées germinales (mâle et femelle)	p. 32
1 - Evolution topographique	p. 32
2 - Caractères distinctifs	p. 32
D - L'ovogenèse	p. 32
DEUXIEME PARTIE : ETUDE DU DETERMINISME ENDOCRINE DE LA DIFFERENCIATION SEXUELLE ET DU FONCTIONNEMENT DE LA GONADE	p. 34
INTRODUCTION	p. 35
CHAPITRE I - EXPERIMENTATION <u>IN VIVO</u>	p. 41
INTRODUCTION	p. 42
I - MATERIEL ET TECHNIQUES	
COMPORTEMENT DES ANIMAUX EN EXPERIENCE	p. 45
A - Animaux	p. 45
B - Techniques opératoires	p. 45
1 - Ablation des tentacules oculaires	p. 45
2 - Castrations	p. 45
C - Soins post-opératoires	p. 47
1 - Castrats	p. 47

2 - Animaux détentaculés (cas des castrats et des animaux normaux ayant subi l'ablation des tentacules)	p. 47
D - Injections d'extraits	p. 47
E - Conditions expérimentales	p. 48
F - Comportement des animaux en expérience	p. 48
1 - Mortalité	p. 48
2 - Activité des opérés	p. 48
3 - Prise de nourriture	p. 49

II - EVOLUTION DE LA GONADE EN CROISSANCE OU EN COURS DE REGENERATION CHEZ DES ANIMAUX DETENTACULES OU NON ET RECEVANT DES INJECTIONS REPETEES D'EXTRAITS TENTACULAIRES p. 49

A - Séries expérimentales	p. 49
1 - Injections à des castrats (séries 1 à 4)	p. 50
2 - Injections à des individus tentaculectomisés à l'éclosion et à des animaux normaux (séries 5 à 14)	p. 50
B - Résultats	p. 52
1 - Etude de la régénération germinale chez des animaux privés ou non de leurs tentacules oculaires et subissant des injections d'extraits tentaculaires ou de solution physiologique (séries 1 à 4)	p. 52
2 - Etude expérimentale de la différenciation génitale chez des animaux normaux ou tentaculectomisés à l'éclosion, recevant des injections répétées d'extraits tentaculaires ou de solution physiologique (séries 5 à 14)	p. 54
C - Discussion et conclusion	p. 59

III - EVOLUTION DE LA GONADE EN CROISSANCE OU EN COURS DE REGENERATION CHEZ DES ANIMAUX TENTACULECTOMISES OU NON ET RECEVANT DES INJECTIONS REPETEES D'EXTRAITS CEREBRAUX, TOTAUX OU PARTIELS p. 62

A - Séries expérimentales	p. 63
1 - Injections à des castrats (séries 1 à 22)	p. 63
2 - Injections à des animaux normaux ou privés de leurs tentacules à l'éclosion (séries 23 à 38)	p. 65

B - Résultats	p. 67
1 - Etude expérimentale de la régénération germinale chez des animaux castrés privés ou non de leurs tentacules oculaires et subissant des injections répétées de solution physiologique ou d'extraits cérébraux totaux ou partiels obtenus à partir de cerveaux de limaces infantiles, juvéniles ou adul- tes (séries 1 à 22)	p. 67
2 - Evolution de la gonade en croissance d'animaux normaux ou détentaculés dès l'éclosion et rece- vant des injections répétées de solution physio- logique ou d'extrait cérébral partiel ou total préparé à partir de cerveaux prélevés sur des limaces adultes (séries 23 à 38)	p. 71
C - Discussion et conclusion	p. 73
CHAPITRE II - EXPERIMENTATION <u>IN VITRO</u>	p. 76
INTRODUCTION	p. 77
I - TECHNIQUES DE LA CULTURE ORGANOTYPIQUE	p. 82
A - Provenance des animaux	p. 82
B - Isolement des animaux	p. 82
C - Explantations	p. 82
D - Milieu de culture	p. 82
E - Technique de préparation des extraits	p. 84
F - Dose et fréquence de renouvellement des extraits	p. 84
G - Entretien et comportement des cultures	p. 84
II - RESULTATS	p. 85
A - Cultures de gonades infantiles	p. 85
1 - Cultures de gonades infantiles isolées	p. 86
2 - Cultures de gonades infantiles en association avec tout ou partie de complexes céphaliques autologues ou hétérologues (prélevés sur des animaux en phase femelle)	p. 86

3 - Cultures de gonades infantiles en présence d'extraits hétérologues tentaculaires, cérébraux ou mixtes obtenus à partir d'animaux en phase mâle	p. 88
4 - Discussion et conclusion	p. 91
B - Cultures de gonades juvéniles	p. 92
1 - Cultures sur milieu gélosé	p. 93
2 - Cultures sur milieu liquide	p. 95
3 - Discussion et conclusion	p. 98
III - DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES	p. 99
A - L'autodifférenciation femelle	p. 99
B - Le rôle du complexe céphalique tentacules oculaires- cerveau	p. 100
CHAPITRE III - LE COMPLEXE CEPHALIQUE TENTACULES OCULAIRES-CERVEAU	p. 103
INTRODUCTION	p. 104
I - LES TENTACULES OCULAIRES	p. 104
A - Observations personnelles	p. 104
B - Nature "endocrine" du tentacule	p. 105
II - LE CERVEAU	p. 106
A - Structure	p. 106
B - Position du problème concernant le lieu d'origine de la substance responsable de l'influence des ganglions cérébroïdes sur le fonctionnement de la gonade . . .	p. 107
1 - La neurosécrétion cérébrale	p. 107
2 - Les corps dorsaux	p. 108
III - CONCLUSION	p. 109
CONCLUSION GENERALE	p. 110

I N T R O D U C T I O N

L'intérêt des chercheurs s'est porté depuis plus d'un siècle sur les Mollusques hermaphrodites qui semblaient se prêter à des études intéressantes sur les problèmes de reproduction et de différenciation sexuelle.

L'endocrinologie des Mollusques, qui a pris naissance en 1935 avec la description par B. SCHARRER de cellules neurosécrétrices dans les ganglions cérébroïdes des Opisthobranches *Aplysia limacina*, *Aplysia depilans* et *Pleurobrancha meckeli*, a eu un départ plus lent et plus tardif que celle des Insectes, des Crustacés et des Annélides. En effet, de nombreux problèmes (corps contractile, production de mucus et présence chez certaines espèces d'une coquille) se sont posés au niveau des interventions chirurgicales ; ils ont longtemps retardé le développement de l'endocrinologie expérimentale dans cet embranchement. Il a fallu attendre LAVIOLETTE (1954 a et b) et ses expériences élégantes et minutieuses chez plusieurs espèces de limaces pour véritablement enregistrer une approche purement expérimentale. Depuis, et plus particulièrement au cours de ces quinze dernières années, le développement de techniques nouvelles (anesthésie, cultures organotypiques, mises au point de techniques chirurgicales fines, cautérisations locales du système nerveux) a permis l'essor de l'endocrinologie de la reproduction des Mollusques où de grands progrès ont été réalisés malgré les difficultés rencontrées.

En ce qui concerne les Gastéropodes Prosobranches et Pulmonés, les recherches entreprises dans plusieurs laboratoires (Amsterdam, Bangor, Besançon, Caen, Lille, Münster, Rochester) ont enrichi nos connaissances dans le domaine de l'endocrinologie sexuelle ; elles sont essentiellement relatives à la différenciation et au fonctionnement de la gonade et du tractus génital.

Si l'étude des mécanismes endocriniens contrôlant l'hermaphroditisme et le fonctionnement génital avait été entreprise chez divers Gastéropodes (recherches de STREIFF, GOMOT, GUYARD et JOOSSE), peu d'analyses expérimentales avaient jusqu'ici été tentées chez les limaces où un travail initial réalisé par PELLUET et LANE (1961) puis par PELLUET (1964) chez *Arion ater*, *Arion subfuscus* et *Milax* sp. avait permis de prendre conscience d'une possible influence du complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau dans la différenciation sexuelle et le fonctionnement de la gonade des limaces.

Reprenant une expérience facile à réaliser, l'ablation des tentacules oculaires, qui avait été effectuée dès 1764 par SPALLANZANI chez l'escargot et en 1771 par VOLTAIRE qui s'était livré à des amputations de la "tête" chez les limaçons et les "limaces incoques", PELLUET et LANE avaient montré que cette opération provoquait un accroissement du nombre d'ovocytes

dans la gonade des opérés. A la suite d'injections d'extraits tentaculaires, cérébraux ou mixtes à des animaux privés ou non de leurs tentacules, ils concluaient à l'influence d'un système neuro-endocrinien sur le développement de la gonade et émettaient l'hypothèse de l'intervention de deux hormones : un facteur cérébral contrôlant la production d'ovocytes et un facteur tentaculaire inhibiteur de l'ovogenèse et stimulateur de la spermatogenèse. Selon l'interprétation de ces auteurs, les deux substances seraient produites chez le jeune, mais ces animaux étant protandres, l'hormone tentaculaire prédominerait alors sur l'hormone cérébrale féminisante. Le taux d'hormone cérébrale augmenterait au moment de la maturité sexuelle permettant ainsi le développement des ovocytes qui atteignent alors leur grande taille caractéristique.

Cependant, les expériences de PELLUET et LANE manquaient de précision et leurs résultats s'opposaient à ceux de GOTTFRIED et DORFMAN (1970) qui obtenaient chez de jeunes *Ariolimax californicus* tentaculectomisées depuis vingt-et-un jours un développement accéléré de la spermatogenèse pouvant être corrigé par injection d'extrait tentaculaire. Ces deux raisons nous ont conduit à reprendre ces expériences et à les compléter en tenant compte de la possibilité de régénération germinale chez les limaces et en effectuant des cultures organotypiques pour tenter de discerner les rôles respectifs des tentacules oculaires et du cerveau au sujet desquels les hypothèses retenues étaient contradictoires et permettaient de formuler trois questions :

- Le tentacule oculaire émet-il une substance inhibitrice de l'ovogenèse ou de la spermatogenèse ou agit-il comme un simple régulateur du développement de la gonade ?
- Le cerveau intervient-il dans la différenciation sexuelle et dans le fonctionnement de la gonade ?
- Si ces organes sont actifs, le sont-ils durant toute la vie de l'animal ?

C'est dans ce cadre de recherches que nous avons poursuivi nos travaux en nous intéressant, sur les conseils de Monsieur DURCHON, à un Arionidé. Notre choix s'est porté sur *Arion subfuscus*, Gastéropode Pulmoné terrestre, dont l'hermaphrodisme naturel en faisait un matériel de choix pour l'étude des problèmes concernant la différenciation sexuelle et le fonctionnement de la gonade.

Nous ne pouvions tenter d'apporter une réponse aux questions posées que par une approche expérimentale.

Celle-ci nécessitait tout d'abord la mise en place d'un élevage permettant l'obtention d'animaux d'âge connu ; la partie Matériel et Techniques y sera en partie consacrée.

Une fois résolu le problème de l'élevage, un tel travail exigeait une bonne connaissance du cycle sexuel de cette limace. Celui-ci fait l'objet de la première partie de cette thèse où sont regroupées les données indispensables à une meilleure compréhension du déroulement de notre expérimentation et à l'interprétation des résultats expérimentaux.

La deuxième partie de ce travail est consacrée au déterminisme de la différenciation sexuelle et du fonctionnement de la gonade.

L'étude expérimentale comprend deux volets : le Chapitre I concerne l'expérimentation *in vivo*, le chapitre II l'expérimentation *in vitro*.

Le chapitre III comporte une étude descriptive sommaire du complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau et donne un bref aperçu des structures pouvant être impliquées dans l'effet des tentacules oculaires et des ganglions cérébroïdes.

Enfin, la conclusion générale intégrera les résultats obtenus dans le cadre de l'endocrinologie de la reproduction des Mollusques.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

I - MATERIEL

A - ESPECE UTILISEE

Notre expérimentation a porté sur un Mollusque Gastéropode Pulmoné terrestre, la limace* *Arion subfuscus* Draparnaud. Cette dernière appartient à l'Ordre des Stylommatophores et possède donc des yeux situés au sommet des tentacules supérieurs.

La détermination de cet Arionidé est réalisée à l'aide de la "Faune de France des Mollusques terrestres et fluviatiles" de GERMAIN (1930).

Le cycle reproducteur d'*Arion subfuscus* est annuel. Après l'accouplement (se reporter à QUICK, 1946) à fécondation réciproque, chaque partenaire jouant un rôle mâle et un rôle femelle, la ponte s'effectue et les géniteurs ne lui survivent qu'exceptionnellement. De ce fait, en hiver et au printemps, les populations ne comprennent que des individus infantiles ou juvéniles.

B - SOINS D'ELEVAGE

La réalisation d'un élevage était de toute première importance pour effectuer une expérimentation précise. Nous avons procédé de la manière suivante :

Dès l'éclosion, les jeunes sont installés dans des boîtes de Pétri dont le fond est garni de papier filtre humidifié, renouvelé tous les deux jours. Quinze jours après l'éclosion, ils sont transférés dans des bocaux en verre d'un demi-litre. Dès l'âge de trois mois, les individus sont placés par groupes de douze au maximum dans des bacs de cinq litres puis vers l'âge de six mois dans des bacs de dix litres.

Le fond des bocaux et des bacs d'élevage est dans tous les cas garni de papier filtre et de coton hydrophile humidifiés et régulièrement changés. En effet, les limaces étant très vulnérables à la déshydratation, il faut maintenir un fort degré d'humidité.

Le jeûne et la sous-alimentation ont des effets importants sur la croissance pondérale des limaces, particulièrement sur les animaux en phase de croissance juvénile (*Arion rufus* : ABELODS, 1944 ; *Arion lusitanicus* : CHEVALLIER, 1969). En conséquence, la nourriture, composée de feuilles de laitues, est distribuée en excès et renouvelée deux fois par semaine.

* De λειμαζ : lieu humide, d'où les dérivés latins : *limus* (limon) et *limax* (limace).

Dans ces conditions et à une température d'élevage d'environ 15°C, la croissance s'effectue normalement si l'on assure une densité animale convenable en employant, pour un même nombre d'animaux, des récipients de plus en plus grands au fur et à mesure que la taille des limaces augmente. Cette précaution évite également l'apparition du cannibalisme que l'on observe fréquemment, particulièrement chez les adultes, dans des élevages de limaces effectués dans des conditions de surpeuplement (ROLLO et WELLINGTON, 1979).

Il est bien entendu nécessaire que les bacs d'élevage soient maintenus dans un état de propreté constante, ce qui nécessite un travail d'entretien important se traduisant par de fréquents nettoyages (deux à trois fois par semaine).

C - OBTENTION DES PONTES ET INCUBATION DES OEUFS

Les pontes sont obtenues à partir de limaces adultes capturées dans la nature. Le nombre d'oeufs émis par individu varie de trente à soixante, un même animal étant capable de fournir plusieurs pontes échelonnées.

Les oeufs recueillis sont disposés dans des boîtes de Pétri garnies de papier filtre humidifié. Les pontes en cours d'incubation doivent être surveillées régulièrement à la loupe binoculaire et l'on doit parfois laver les oeufs pour les débarrasser de moisissures.

Les limaces sont des Mollusques à développement direct. Si l'on extrait l'embryon de l'oeuf, on y reconnaît morphologiquement (figure 1) les annexes embryonnaires (vésicule céphalique et podocyste).

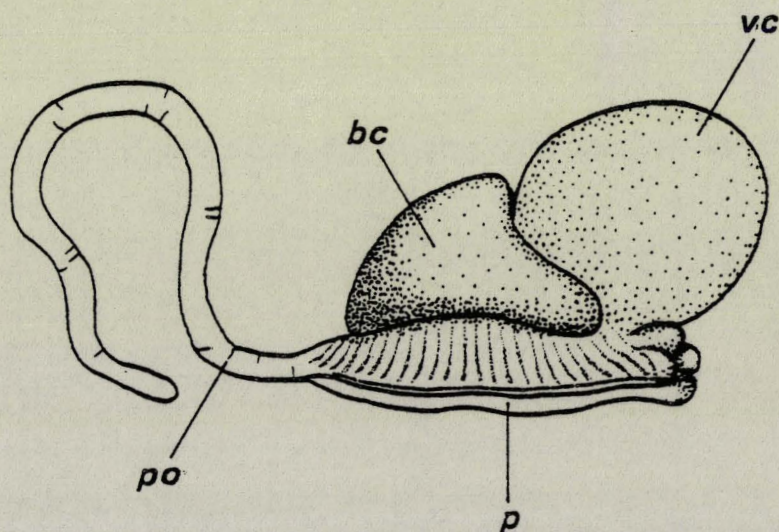


Figure 1 - Embryon d'*Arion subfuscus* âgé de 15 jours.
bc : bouclier céphalique ; p : pied ; po : podocyste ;
vc : vésicule céphalique.

La vésicule céphalique est située dorsalement par rapport à la masse buccale. A l'approche de l'éclosion, elle est peu à peu recouverte par le bouclier céphalique (partie antérieure du manteau).

Le podocyste, situé à l'extrémité postérieure de l'embryon est une expansion du pied. Chez des embryons âgés de quinze jours, il atteint un développement considérable. Il régresse ensuite progressivement et a totalement disparu au moment de l'éclosion.

La durée d'incubation des oeufs 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. Au laboratoire, à la température de 20°C, leur durée d'incubation est d'environ quatre semaines.

II - TECHNIQUES

1 - Anesthésie

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

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

Nous avons employé l'anhydride carbonique, préconisé par BAILEY (1969). Appliqué, à la température du laboratoire, pendant cinq à quinze minutes, selon l'âge des animaux, ce traitement permet de réaliser des castrations et de prélever des organes. Cependant, il 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.

Nous avons également essayé le chlorure de Succinylcholine utilisé par BURTON (1975) chez *Helix pomatia*. Injecté en solution à 1 mg/ml, il entraîne très rapidement une perte du réflexe de retrait des tentacules. Chez les adultes, où la quantité injectée est de 0,1 ml, ce produit peut se révéler utile pour le prélèvement des tentacules en extension. Par contre, il ne provoque pas l'extension de la tête.

2 - Etude histologique

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

TABLEAU I

COMPOSITION DU LIQUIDE DE CHIARANDINI.

Composants	Poids en grammes pour un 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

a) Microscopie photonique

Si l'on excepte le cas particulier des embryons qui sera exposé dans la première partie, l'examen a porté sur la gonade fixée au Bouin-Hollande acétique et sur le complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau après fixation au Bouin-Hollande sans acide acétique ou au Stieve.

Après inclusion dans la paraffine à 56°C, les blocs sont débités en coupes sériées d'une épaisseur de 6 µm.

Les colorations topographiques les plus couramment employées ont été les suivantes :

- . Triple coloration de Prenant (Trioxyhématéine ferrique-éosine-vert lumière).
- . Hémalun-éosine.
- . Azan.
- . Technique de Cleveland-Wolfe.

Pour l'étude du complexe céphalique, nous avons utilisé la Fuchsine paralaldéhyde selon la méthode de CLARK (1955).

b) Microscopie électronique

Les gonades sont fixées pendant trois heures à 4°C par la glutaraldehyde (TAAB) à 3 % dans un tampon phosphate 0,4 M puis lavées une nuit dans un tampon phosphate 0,4 M. Elles subissent alors une post-fixation par le tétroxyde d'Osmium à 1 % (LYON-ALEMAND LOUYOT) à la température du laboratoire pendant une heure.

La déshydratation s'effectue dans des bains successifs d'acétone, les pièces étant finalement incluses dans l'araldite.

Les coupes sont obtenues à l'ultramicrotome PORTER-BLUM MT 1 équipé de couteaux de verre. La confection de coupes semi-fines (0,5 à 1 µm) colorées par une solution de Bleu Azur à 1‰ permet de faire la correspondance entre les types cellulaires observés en microscopie photonique et ceux retrouvés en microscopie électronique.

Les observations ont été réalisées sur microscope SIEMENS Elmiskop I, les préparations étant contrastées à l'acétate d'uranyle puis au citrate de Plomb selon REYNOLDS (1963).

3 - Préparation des extraits

Les organes (tentacules et cerveaux) sont prélevés sur des individus d'un état génital donné et conservés à -70°C.

La technique de préparation des extraits est la suivante : les organes sont plongés dans la solution physiologique de CHIARANDINI (1964). Après homogénéisation au froid et centrifugation à 5 000 g pendant 15 minutes, le surnageant est recueilli. Mis en réserve à -20°C ou utilisé immédiatement, il sera injecté (opérations *in vivo*) ou ajouté au milieu de culture (expériences *in vitro*) après filtration sur filtres MILLIPORE 0,45 µm.

4 - Méthodes d'analyse des résultats fournis par l'expérimentation

a) Comptage du nombre d'ovocytes

- Dans l'expérimentation *in vivo*, nous avons interprété les résultats obtenus grâce à la réalisation de comptages ovocytaires effectués selon la méthode préconisée par LUSIS (1961) :

Pour chaque gonade, une coupe sur dix est examinée ; le nombre d'ovocytes présents est compté ce qui donne un nombre total Y. Le nombre total de coupes d'ovocytes dans la gonade est donc 10 x Y.

Les ovocytes apparaissant sur plusieurs coupes, il y a lieu d'effectuer une correction faisant intervenir l'épaisseur des coupes (t) et le diamètre moyen (Ø), tous deux exprimés en µm. Ce dernier est obtenu à partir de la mesure du diamètre de cinquante ovocytes choisis au hasard dans la glande génitale.

Le nombre véritable d'ovocytes (N) figurés dans l'ovotestis est obtenu grâce à la formule :

$$N = 10 Y \times t/\bar{\varnothing}$$

La comparaison des valeurs moyennes est effectuée selon le t test de STUDENT, pour un coefficient de sécurité de 95 %.

- Pour les cultures organotypiques, deux cas se présentent :

- . Dans celui des stades infantiles, il n'existe pas d'ovocyte au moment de la mise en culture. Nous avons donc simplement recherché leur éventuelle apparition dans l'explant gonadique.
- . Dans celui des stades juvéniles, étant donné que nous ne disposons que de fragments de taille variable, nous avons pratiqué sur une même pièce des comptages sur une quinzaine de champs de microscope pris au hasard sur plusieurs coupes ce qui nous a donné une évaluation du nombre d'ovocytes dans les fragments cultivés que l'on a pu comparer à celui trouvé dans le fragment témoin.

b) Mesure du diamètre ovocytaire

L'étude de l'évolution de l'ovogenèse dans les différentes séries expérimentales a été appréciée par la réalisation d'histogrammes où sont figurées les moyennes des pourcentages respectifs des différentes classes de taille ovocytaire trouvés dans chaque type d'animal expérimenté.

Les ovocytes sont répartis en six classes de taille.

Pour étudier la taille des ovocytes, on les mesure toutes les trois coupes jusqu'à ce qu'un total de cent ovocytes soit atteint. Le noyau occupant une position médiane, seuls les ovocytes présentant un nucléole dans le noyau sont mesurés afin de s'assurer qu'il s'agit bien de coupes médianes. Ainsi, les fréquences des différentes classes d'ovocytes sont exprimées en pourcentages.

In vitro, étant donné la taille des fragments cultivés, nous n'avons pas appliqué la méthode précédente et avons effectué des mesures de diamètre ovocytaire sur une quinzaine de champs de microscope pris au hasard sur plusieurs coupes correspondant à la même pièce, ce qui nous a donné, par comparaison avec les fragments témoins prélevés le jour de la mise en culture, une évaluation de l'évolution de l'accroissement ovocytaire dans les fragments cultivés.

PREMIÈRE PARTIE

LA GONADE

Dans cette première partie, nous envisagerons tout d'abord le développement de la gonade puis nous ferons le point des recherches consacrées à une mise en évidence de son rôle endocrine éventuel. Ensuite, nous décrirons le cycle sexuel d'*Arion subfuscus* et nous nous intéresserons aux facteurs externes pouvant influencer sur le déroulement de la gamétogenèse.

I - DEVELOPPEMENT DE LA GONADE

A - ORIGINE

L'étude du développement de l'appareil reproducteur chez les Pulmonés a fait l'objet de nombreux travaux pour tenter de répondre à la question formulée par MARTOJA (1964), FRANC (1968) et LUCHELT (1972 a) concernant la formation de la gonade : Quelle est l'origine des différentes parties de l'appareil génital ? Celle de la gonade chez les Pulmonés est controversée ; deux théories s'opposent quant à la formation de l'appareil reproducteur : la théorie dualiste et celle de l'ébauche unique.

Pour les partisans de la théorie uniciste, formulée par ROUZAUD (1885), la gonade serait de même origine que le tractus, c'est-à-dire ectodermique.

Pour ceux de la théorie dualiste, la glande hermaphrodite serait d'origine mésodermique, le tractus étant toujours ectodermique. EISIG (1869) en a exposé le principe ; selon cet auteur, la gonade et les voies génitales se forment de façon indépendante à l'origine et fusionnent ultérieurement.

Chez les limaces, les études entreprises sur l'Arionidé *Arion empiricorum* par HEYDER (1909) et PABST (1914) et sur le Limacidé *Agriolimax agrestis* par BROCK (1886), RICHTER (1935) et CARRICK (1938) plaident en faveur de l'hypothèse dualiste. Par contre les recherches de SIMROTH (1887) chez *Agriolimax laevis*, HOFFMANN (1922) sur *Limax maximus*, LAVIOLETTE (1954 a) chez *Arion rufus*, LUCHELT (1972 a) chez *Arion circumscriptus* et de RUNHAM et HOGG (1979) chez *Deroceras reticulatum* soutiennent la théorie de l'ébauche unique. Parmi les partisans de cette dernière théorie, LAVIOLETTE (1954 a) pense qu'en ce qui concerne l'origine de la gonade, l'immigration de cellules mésodermiques à un stade précoce du développement est une hypothèse qu'on ne peut pas exclure. LUCHELT (1972 a) quant à lui estime que les cellules de la gonade sont des dérivés ectodermiques mais que rien ne prouve

que des cellules mésodermiques ou endodermiques ne puissent migrer et être incorporées aux cellules ectodermiques avant le début de l'invagination qui donne naissance à la gonade.

Ainsi, il est encore à l'heure actuelle difficile d'opter pour l'une ou l'autre des deux théories, bien qu'il semble que les travaux les plus complets effectués chez les Stylommatophores soient en faveur de la théorie de l'ébauche unique. Néanmoins, comme le signale MARTOJA (1964) : "il faudrait connaître très exactement les lignées cellulaires issues du micromère 4d pour confirmer ou infirmer l'origine mésodermique de la gonade et de là, opter entre les deux théories".

B - LOCALISATION ET ASPECT

Chez les embryons, la gonade se présente sous la forme d'une ébauche située au voisinage de l'estomac et dont les dimensions n'excèdent pas 60 μ m. Ce massif cellulaire est entouré par les replis de l'épithélium hépatique dont les cellules sont distendues par les réserves albumineuses absorbées par l'embryon (Pl. I, fig. b et c).

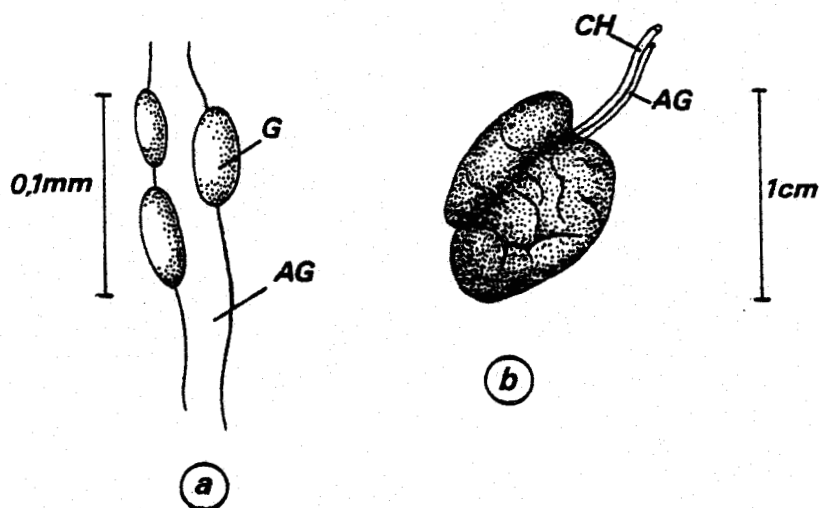


Figure 2 - Aspects de la gonade chez un animal âgé de huit jours (a) et chez un adulte (b).

AG : artère génitale ; CH : canal hermaphrodite ; G : gonade.

A l'éclosion et pendant le premier mois, la gonade est formée de plusieurs groupes de cellules disposés sur la paroi externe de l'artère génitale (figure 2 a) et s'étendant chez les limaces âgées de huit jours sur une longueur n'excédant pas 100 μ m. Ces amas cellulaires apparaissent comme des renflements minuscules et transparents. Ces ébauches séparées s'accroissent et à l'âge de deux mois la glande hermaphrodite possède la forme bilobée caractéristique de l'adulte.

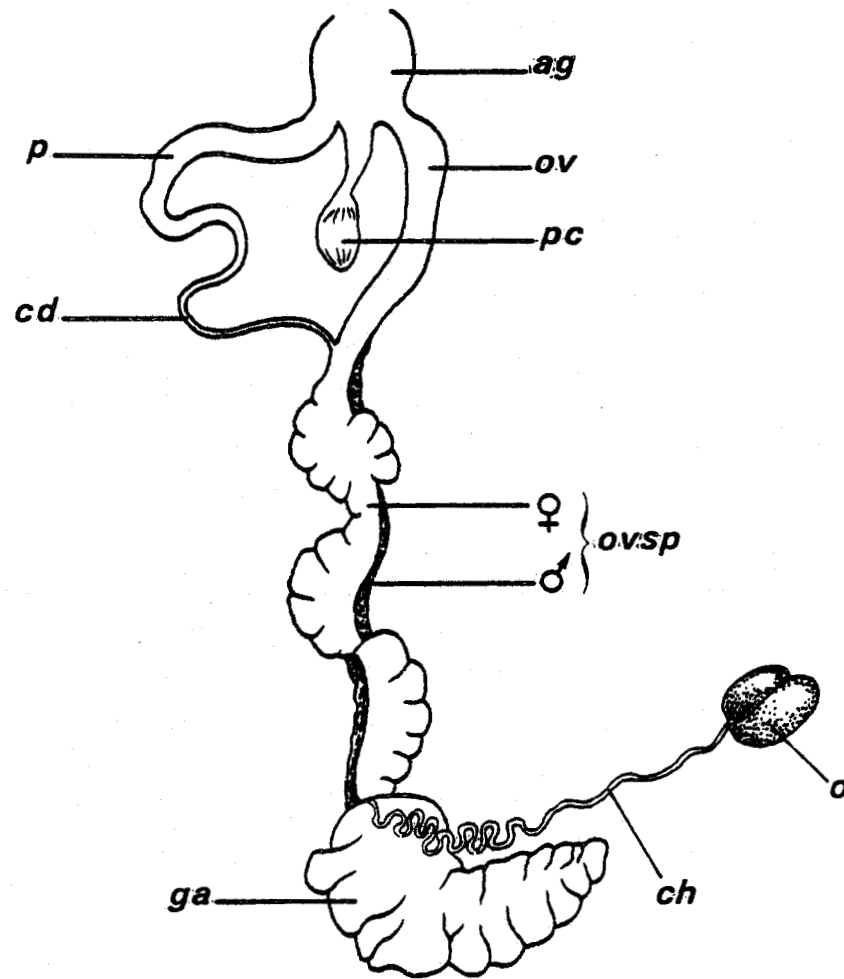


Figure 3 - Le tractus génital d'*Arion subfuscus*.

ag : atrium génital

cd : canal déférent

ch : canal hermaphrodite

ga : glande de l'albumine

o : ovotestis

ov : oviducte

ovsp : ovispermiducte (♂ : partie mâle ; ♀ : partie femelle)

p : pénis

pc : poche copulatrice



A maturité, la glande génitale qui s'est pigmentée (voir à ce sujet les observations de LUSIS, 1962, chez *Arion ater rufus*) est localisée au contact du cul-de-sac stomacal. Elle est recouverte par les lobes de l'hépatopancrées et traversée par l'artère génitale qui chemine au contact de l'estomac. Elle peut atteindre la taille d'un centimètre (figure 2 b). L'ovotestis est une glande en grappe. Il se subdivise en acini hermaphrodites que réunit une enveloppe conjonctive externe. Chacun des multiples acini se résoud en un canalicule efférent.

La première interprétation correcte de la physiologie de l'appareil génital des Pulmonés a été faite par BAUDELLOT (1863). Depuis, la morphologie, l'histologie et la physiologie de l'appareil reproducteur des Pulmonés ont fait l'objet de nombreuses études (se reporter à FRANC, 1968 et à DUNCAN, 1975). Chez les limaces, les espèces particulièrement bien étudiées à ce sujet ont été : *Arion empiricorum* (PABST, 1914), *Arion rufus* (ABELOOS, 1944 ; LAVIOLETTE, 1954 a), *Arion ater* (LUSIS, 1961 ; SMITH, 1965), *Agriolimax reticulatus* (= *Deroceras reticulatum*) [BAYNE, 1967 ; RUNHAM et LARYEA, 1968 ; RUNHAM et HUNTER, 1970 ; RUNHAM, 1978], *Deroceras laevis* (ELS, 1974), *Milax gagates* (QUATTRINI, 1967 ; FOCARDI et QUATTRINI, 1972), *Philomycus carolinianus* (KUGLER, 1965).

Afin de bien situer la gonade chez l'animal adulte, nous décrivons ici brièvement la morphologie de l'appareil génital chez ce dernier. La figure 3 représente schématiquement l'appareil reproducteur d'*Arion subfuscus* qui est typique des Stylommatophores. Celui-ci comprend l'ovotestis, le canal hermaphrodite, la glande de l'albumine, l'ovispermiducte, le spermiducte, le pénis, l'oviducte, l'atrium génital et la poche copulatrice.

- Le canal hermaphrodite (= ovotestis duct)*

Il naît de la confluence des canaux efférents des divers acini. Au sortir de l'ovotestis et dans la première partie de son trajet, il reste étroitement accolé à l'artère génitale. Il s'en sépare ensuite pour se diriger vers la glande de l'albumine. Filiforme et peu contourné pendant la phase juvénile, il est devenu chez l'adulte très apparent et très sinueux. Au moment de la maturité sexuelle, les cellules du canal acquièrent une ciliature fonctionnelle. Le canal hermaphrodite joue le rôle de véritable vésicule séminale. Au moment de l'émission des produits génitaux, spermatozoïdes et ovules l'empruntent successivement.

* Pour la terminologie concernant les différents composants du tractus génital des Pulmonés, se référer à BAYNE (1973).

- L'ovispermiducte (= canal godronné)*

Ce conduit mixte est formé par l'accolement de deux gouttières, mâle et femelle, communiquant sur toute leur longueur. Chacune d'elles comporte des annexes glandulaires pariétales très développées. Les glandes de la gouttière femelle lui confèrent son aspect contourné et boursoufflé ; celles de la gouttière mâle (glandes prostatiques) sont beaucoup moins apparentes.

- La glande de l'albumine (= glande à albumen)*

Elle débouche à la jonction du canal hermaphrodite et de l'ovispermiducte. C'est un organe volumineux de couleur jaune pâle qui présente une activité maximale au moment de la période de reproduction.

Chez les Stylommatophores, il semble bien que cette glande renferme trois composants biochimiques :

. du galactogène. Ce constituant a été mis en évidence (MAY, 1934) et bien étudié (NIELAND et GOUDSMIT, 1969) chez l'escargot *Helix pomatia*. On le retrouve chez les limaces (*Agriolimax reticulatus* : BAYNE, 1967 ; *Ariolimax columbianus* : MEENAKSHI et SCHEER, 1968). Il est utilisé pendant la ponte des oeufs. Chez les Pulmonés, on ne le décèle que dans la sécrétion de la glande de l'albumine et dans les oeufs (MAY, 1934 ; BAYNE, 1966 ; GOUDSMIT, 1972).

. des constituants protéiques (BAYNE, 1967),

. du glycogène (*Ariolimax columbianus* : MEENAKSHI et SCHEER, 1968 ; *Helix pomatia* : GRAINGER et SHILLITOE, 1952 ; GOUDSMIT, 1975).

- Le canal déférent (= spermiducte = *vas deferens*)*

Vers l'extrémité antérieure du corps, un peu en avant de l'orifice respiratoire, la gouttière mâle de l'ovispermiducte s'individualise et porte le nom de canal déférent. Celui-ci aboutit au pénis, organe d'accouplement susceptible de faire saillie par l'orifice génital.

- L'oviducte

Il provient de l'isolement de la voie femelle de l'ovispermiducte.

- L'atrium génital

Il représente la portion ultime du tractus génital ; à son niveau se réunissent oviducte et pénis. Il est dévaginable au moment de l'accouplement et s'ouvre à l'extérieur par un orifice génital situé en avant sur le côté droit du cou. Chez les Stylommatophores qui sont dits monauliques, ce pore génital est commun aux voies efférentes mâle et femelle.

* Pour la terminologie concernant les différents composants du tractus génital des Pulmonés, se référer à BAYNE (1973).

- La poche copulatrice (= Spermathèque = bursa copulatrix = receptaculum seminis)*

Annexée à l'atrium génital, elle se présente sous la forme d'une ampoule pédonculée à parois minces. Elle est destinée à recevoir le spermatophore de l'autre individu lors de l'accouplement. Cependant, les spermatozoïdes étrangers n'y séjournent pas (de LARAMBERGUE, 1939). Son rôle serait de libérer les spermatozoïdes du spermatophore qui s'y trouve introduit lors de la copulation (LAVIOLETTE, 1954 a ; BAYNE, 1973).

C - CROISSANCE

La glande hermaphrodite, généralement impondérable pendant la phase infantile, s'accroît pendant la phase juvénile et atteint son développement maximal à la puberté ; son poids décroît après émission des spermatozoïdes.

Les observations effectuées chez *Arion subfuscus* concordent donc avec celles enregistrées sur la même espèce par ABELOOS (1944) et sur d'autres limaces [Arionidés : *Arion rufus* (ABELOOS, 1944 ; LAVIOLETTE, 1950 b) ; *Arion hortensis* (ABELOOS, 1944) ; *Arion ater rufus* (LUSIS, 1961), Limacidé : *Agriolimax reticulatus* (RUNHAM et LARYEA, 1968)].

II - LA GONADE, ORGANE ENDOCRINE

Chez les Stylommatophores, une influence humorale de l'ovotestis sur la croissance des annexes glandulaires du tractus génital a été mise en évidence chez l'escargot *Helix* (FILHOL, 1938 ; GOMOT, 1976 a) et chez diverses espèces de limaces (ABELOOS, 1943 ; LAVIOLETTE, 1954 b ; RUNHAM, BAILEY et LARYEA, 1973).

Chez les limaces, à la suite des castrations effectuées par ABELOOS (1943), sur des adultes de l'espèce *Limax maximus*, qui avait établi que celles-ci provoquaient quatre mois après opération une régression de la glande de l'albumine et des annexes glandulaires de l'oviducte, LAVIOLETTE (1954 b) a repris l'étude de ce problème en utilisant plusieurs espèces d'Arionidés et de Limacidés dont le cycle présente un décalage dans le temps.

Il a montré que :

- . L'implantation de greffons de tissu germinal d'adultes de *Mesarion subfuscus* en spermiogenèse avancée chez de jeunes individus d'*Arion rufus* provoque chez l'hôte, un à deux mois après opération, une différenciation rapide et précoce des annexes glandulaires génitales.

* Pour la terminologie concernant les différents composants du tractus génital des Pulmonés, se référer à BAYNE (1973).

- . Les castrations effectuées chez des adultes de l'espèce *Limax maximus* entraînent, quatre à cinq mois après opération, une régression de la glande de l'albumine et de l'ovispermiducte ; par contre le pénis ne subit pas de variation de taille. D'autre part, une greffe de tissu germinal adulte, effectuée après la castration, assure une maturité glandulaire du tractus génital.
- . Des glandes de l'albumine ou des ovispermiductes prélevés chez de jeunes individus (*Arion rufus* et *Limax flavus*) implantés chez des hôtes adultes (*Mesarion subfuscus*, *Kobeltia hortensis*, *Limax flavus*) subissent un accroissement de volume important.

Ces résultats montrent qu'une corrélation existe entre l'état de différenciation de la gonade et le développement morphologique des différentes parties du tractus. Dans le cas des greffes réalisées, l'absence de lien anatomique entre le tissu germinal actif et l'organe effecteur permet de rejeter l'hypothèse d'une médiation nerveuse. Ainsi, selon LAVIOLETTE, on peut admettre "avec la maximum de vraisemblance l'existence d'un mécanisme humoral authentique".

RUNHAM, BAILEY et LARYEA (1973) ont confirmé et complété les résultats obtenus par LAVIOLETTE, en effectuant sur la limace *Agriolimax reticulatus* des transplantations de tractus génitaux de très jeunes animaux sur des receveurs d'âges différents (en début de phase mâle ou en période de ponte). Les résultats enregistrés leur ont fait émettre l'hypothèse que deux hormones seraient impliquées dans la croissance et la différenciation du tractus génital, l'une étant responsable de la maturation de la glande prostatique (partie mâle) et l'autre du développement des glandes de la partie femelle du tractus génital.

RUNHAM (1976) observe chez des animaux castrés de l'espèce *Agriolimax reticulatus*, par comparaison avec des témoins, une régression du tractus génital, deux mois après opération.

GOTTFRIED, DORFMAN, FORCHIELLI et WALL (1967) semblent montrer chez *Ariolimax californicus*, qu'il existe un effet de la gonade sur la synthèse ou la décharge d'un inhibiteur cérébral de la croissance de la glande de l'albumine.

Ainsi, la gonade contrôle chez les limaces le fonctionnement glandulaire du tractus génital. Cependant, jusqu'à présent, exception faite des observations de KANDASWAMY (1978), aucun type cellulaire pouvant être la source d'hormones n'a été identifié dans l'ovotestis des Gastéropodes ; le problème cytophysiologique de l'origine de la substance active reste donc entier. Pour LAVIOLETTE (1954 b) qui n'exclut pas la possibilité d'un rôle

des cellules constituant l'épithélium germinatif, "on ne peut *a priori* écarter l'hypothèse d'une élaboration de la substance endocrine par les éléments germinaux eux-mêmes".

III - CYCLE SEXUEL : RESULTATS PERSONNELS RELATIFS A LA GAMETOGENESE

Dans un premier temps, l'étude a consisté à repérer l'ébauche gonadique chez l'embryon puis un examen histologique de gonades fixées régulièrement après l'éclosion a permis de définir différents stades correspondant chacun à un état génital donné.

A - LA GONADE EMBRYONNAIRE

Il faut tout d'abord noter que dès que l'ébauche gonadique est repérable, les réserves albumineuses de l'oeuf vont commencer à être ingérées par l'embryon, ce qui entraîne des difficultés de fixation et de coupe nécessitant un traitement particulier. Pour obtenir de bonnes fixations et coupes d'embryons, il convient de procéder ainsi :

Plutôt que de fixer l'oeuf entier, il vaut mieux, à cause de la présence d'albumine, extraire, à l'aide d'aiguilles montées, l'embryon vivant de l'oeuf, lui même placé sur un fond de cire dentaire.

Libéré de l'oeuf, l'embryon est lavé des dernières traces d'albumine par addition à la pipette de quelques gouttes d'une solution de NaCl à 0,7 %, contenant du CaCl₂ à 0,02 % (BAKER, 1944).

Les embryons sont alors transférés dans le fixateur (ZENKER ou BOUIN-HOLLANDE acétique : 24 heures ou CARNOY : 2 heures) puis subissent le traitement suivant :

- . alcool 96° (sauf en cas de fixation au CARNOY) : 1 nuit (2 bains),
- . alcool 100° : 2 bains de 12 heures,
- . passage dans une solution de benzoate de méthyle-celloïdine à 1 % : 2 bains de 12 heures,
- . Benzène : 2 bains de 20 minutes.

L'inclusion s'effectue dans un mélange PARAPLAST (1/4) - TISSUEMAT ou HISTOMED (3/4).

La gonade est repérable aux environs du quinzième jour de développement embryonnaire (cette date peut varier de quelques jours suivant les embryons observés). Sa localisation a été précisée précédemment (page 14).

Elle est représentée par un massif cellulaire compact renfermant deux types de cellules (Pl. I, fig. d) :

. A la périphérie, on distingue une couche corticale renfermant les noyaux les moins différenciés (diamètre 3 à 4 μm) dont la chromatine est répartie en grains grossiers. C'est de cette couche de cellules que vont dériver les cellules accumulées au centre du massif.

. Au centre de l'ébauche, s'isolent des cellules à noyau clair, d'un diamètre de 6 à 8 μm en moyenne, à chromatine rare et répartie à la périphérie, le centre étant occupé par un unique et gros nucléole. Ces cellules se divisent activement (Pl. I, fig. d) et leurs limites cellulaires sont difficilement décelables.

Tous les intermédiaires entre ces deux types cellulaires sont repérables dans la gonade.

Chez les Gastéropodes Pulmonés, l'étude de la gonade embryonnaire a fait l'objet d'un nombre restreint de publications. Il faut citer, chez les Basommatophores, les travaux de BRISSON et REGONDAUD (1971), BRISSON (1973), BRISSON et BESSE (1975) et chez les Stylommatophores ceux de LAVIOLETTE (1954 a) et LUCHEL (1972 a). Nos observations concordent avec celles effectuées par LAVIOLETTE (1954 a) chez *Arion rufus*. LUCHEL (1972 a) quant à lui, distingue également dans la gonade embryonnaire d'*Arion circumscriptus*, huit semaines après l'oviposition, deux catégories cellulaires mais cet auteur, qui ne reconnaît pas l'existence d'un épithélium germinatif, les interprète l'une comme représentant des cellules germinales et l'autre comme étant des cellules non germinales ("auxiliary cells").

B - LA GONADE POST-EMBRYONNAIRE

Le cycle génital d'*Arion subfuscus* peut se subdiviser en six stades :

- stade infantile,
- stade juvénile,
- stade mâle (début),
- stade mâle (mature),
- stade femelle,
- stade d'atrophie de la gonade.

1 - La phase infantile (stade 1)

Elle s'étend de l'éclosion à l'âge d'un mois.

a) Animaux âgés de huit jours

A ce stade, la gonade est représentée par un massif cellulaire d'une longueur maximale de 100 μm (Pl. II, fig. a).

Une étude cytologique de ces jeunes glandes génitales a été réalisée en microscopie photonique et au niveau ultrastructural. Elle a permis de montrer qu'à ce stade post-embryonnaire le plus précoce, la gonade renferme trois types cellulaires :

. A sa périphérie, on distingue une couche corticale dont les noyaux sont riches en chromatine, uniformément répartie en grains grossiers (Pl. II, fig. b). Au niveau ultrastructural, ces cellules, qui présentent un noyau d'un diamètre de 3 à 4 μm chargé de chromatine dense, renferment du glycogène. Ce sont les cellules souches (Pl. II, fig. d) qui constituent un épithélium germinatif en puissance.

. Un deuxième type cellulaire est constitué par certaines cellules corticales présentant une augmentation du diamètre de leur noyau qui atteint la taille de 5 μm . Cette croissance s'accompagne de la dispersion de la chromatine dense dans l'espace nucléaire (Pl. II, fig. b et e). Leur cytoplasme renferme des corps granulaires de nature indéterminée (Pl. II, fig. c) ; cette observation concorde avec celle faite par LUCHTEL (1972 a) chez *Arion circumscriptus*. Ces cellules ont acquis l'état germinatif ; elles se sont transformées en Protogonies ou cellules sexuelles indifférenciées selon ANCEL (1903)*. Les protogonies sont toutes semblables entre elles ; aucun critère ultrastructural ne permet de les différencier sexuellement.

. Les cellules accumulées au centre du massif cellulaire sont de plus grande taille que les précédentes. Elles renferment un noyau clair à chromatine rare et répartie le plus souvent dans la zone périphérique, le centre étant occupé par un unique et gros nucléole (Pl. II, fig. b). Ces cellules centrales, peu nombreuses, présentent un noyau de diamètre (6 à 8 μm) supérieur à celui observé dans les deux types cellulaires précédents. De par leur localisation et leur aspect, elles présentent des caractères de spermatogonies.

Du point de vue de l'évolution cytologique, on constate que :

- Les trois types cellulaires demeurent riches en ribosomes libres.
- L'évolution du chondriome est la suivante : de rares mitochondries constituent le chondriome de la cellule souche mais leur nombre s'accroît dans la protogonie et devient important dans les cellules du centre du massif cellulaire.
- L'évolution nucléaire est nette dans le sens cellule souche \rightarrow protogonie \rightarrow spermatogonie : les mottes chromatiques tendent à se disloquer en masses plus réduites ; de plus la cellule et son noyau augmentent de taille.

* Pour la terminologie des cellules germinales très précoces, se reporter à la revue de BRUSLE (1972).

Ainsi les cellules périphériques (cellules souches) sont les moins différenciées au sein de la gonade infantile. Ce sont certaines de ces cellules qui vont acquérir l'état germinal et se transformer en protogonie.

b) Animaux âgés de vingt à trente jours

La gonade est toujours localisée autour de l'artère génitale (Pl. III, fig. a) mais les massifs cellulaires sont plus nombreux. A cet âge, on y distingue une couche cellulaire corticale dont l'extension s'effectue grâce à des mitoses dont le fuseau reste parallèle à la paroi (Pl. III, fig. b). Les noyaux des cellules la constituant, qui représentent les cellules souches, sont toujours petits et fortement chromatiques. Parmi ces cellules corticales, certaines évoluent en protogonies. Les spermatogonies, quant à elles, sont alors plus nombreuses.

2 - La phase juvénile (stade 2)

L'apparition de la lignée femelle, encore indistincte pendant le stade infantile, marque l'avènement de cette phase nommée juvénile par ABELOOS (1944) : de jeunes ovocytes sont reconnaissables parmi les autres gonocytes grâce à leur vésicule germinative (Pl. III, fig. c et d). A partir de ce stade, les deux lignées gamétogénétiques sont représentées, il y a donc hermaphrodisme vrai avec présence d'acini mixtes.

a) Ultrastructure de la paroi de l'acinus

La paroi de chaque acinus (Pl. IV, fig. a) est tapissée par un épithélium germinatif dont les cellules reposent sur une lame basale. Du côté externe, des cellules conjonctives de soutien et quelques fibres musculaires lisses soulignent la basale. Ce double support constitue la tunique ou membrane d'ANCEL (ANCEL, 1903 ; COGGESHALL, 1970).

b) Les cellules germinales

Les cellules mâles poursuivent leur évolution ultérieure au sein de la lumière de l'acinus alors que les cellules femelles demeurent constamment en position pariétale.

a) La lignée mâle

.....
Elle est représentée par des spermatogonies.

La spermatogonie reste en relation par un pédoncule, dont la partie haute renferme la majeure partie du chondriome, avec une cellule basale : la cellule nourricière (Pl. V, fig. a). Elle est très riche en ribosomes et en organites cellulaires (mitochondries, dictyosomes) contrairement à la cellule nourricière. Cette dernière qui assure la nutrition des éléments mâles (RICHTER, 1935) est chargée de réserves (glycogène et inclusions denses), elle ne se divise plus (Pl. V, fig. b).

Dès son rejet dans la lumière, à l'inverse de ce que l'on constate pour la lignée femelle où la multiplication goniale est absente, la spermatogonie subit une phase de multiplication (Pl. IV, fig. b) et acquiert une structure nettement polarisée (Pl. V, fig. c). Cette phase se poursuit pendant plusieurs mois, tandis que la glande s'accroît par subdivision en acini, jusqu'au moment où les éléments mâles entrent en maturation.

β) La lignée femelle
.....

◦ Différenciation femelle de l'épithélium germinatif.

En microscopie photonique, la plupart des auteurs (AUBRY, 1962 ; GUYARD, 1971 a) s'accordent pour penser 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. Cependant, en microscopie électronique, il est possible de mieux observer l'orientation de la protogonie dans le sens femelle.

Durant le stade infantile, aucune cellule femelle ne peut être observée. Par contre, pendant la phase juvénile, alors que les spermatogonies, par suite de leur multiplication tendent à combler la lumière (Pl. IV, fig. b), on constate que certaines protogonies pariétales sont des cellules femelles potentielles. Elles vont en effet évoluer sur place en ovogonies par accroissement de diamètre (qui atteint la taille de 10 µm) et aplatissement sur la lame basale. En ultrastructure, l'ovogonie (Pl. VI, fig. a), dont la chromatine se résoud en granulations éparses dans le nucléoplasme clair, présente un chondriome assez rare et surtout un développement important de l'ergastoplasme représenté par de longues lamelles ergastoplasmiques parallèles au bord cellulaire et à l'enveloppe nucléaire. Ce dernier caractère a également été retrouvé par GUYARD (1971 a) chez *Helix aspersa*. CHAPRON et RELEXANS (1971) quant à eux ont observé dans les ovogonies de l'Oligochète *Eisenia foetida* un développement important du réticulum endoplasmique. Les ribosomes sont abondants dans l'ovogonie, tout comme dans la spermatogonie. Par contre, contrairement à cette dernière, la cellule femelle ne se multiplie jamais, ce que l'on constate également chez d'autres Pulmonés (*Helix aspersa* : GUYARD, 1971 a ; *Australorbis glabratus* : VIANEY-LIAUD, 1972 a) et on ne peut déceler dans son cytoplasme aucune structure qui puisse lui conférer une quelconque polarité.

L'ensemble de ces observations permet d'établir des caractères distinctifs des deux lignées germinales, réunis dans le tableau II.

TABEAU II

TABEAU COMPARATIF DES CARACTERES DISTINGUANT LES SPERMATOGONIES DES OVOGONIES

	Spermatogonie	Ovogenie
Localisation	- Lumière - Contact indirect avec la paroi grâce aux cellules nourricières	Paroi
Capacité de multiplication	- Haut pouvoir de multiplication	Ne se multiplie jamais
Structure	- Au cours de son évolution, de plus en plus polarisée	Non polarisée
Cytoplasme	- Ribosomes nombreux - Ergastoplasme plutôt rare	Ribosomes nombreux Ergastoplasme développé

◦ Evolution de l'ovogenèse

Au cours de la phase juvénile, on observe trois types d'ovocytes :

- des ovocytes à différentes étapes de leur croissance,
 - jeunes ovocytes en début d'évolution
 - ovocytes à un stade plus avancé de leur croissance
- des ovocytes en dégénérescence.

■ Les ovocytes au début de leur croissance

A ce stade initial de leur croissance, ils sont localisés dans l'acinus en position corticale ; leur noyau a un contour plus ou moins sphérique (Pl. VI, fig. b). Ils manifestent une basophilie importante révélatrice d'une teneur élevée en ARN. Cette observation correspond à celles faites par COWDEN (1958, 1962) chez *Arion sp.* et *Deroceras reticulatum* à la suite d'études cytochimiques. Leur cytoplasme basophile renferme de nombreux ribosomes ; les mitochondries sont dispersées autour du noyau (Pl. VI, fig. c). On n'observe dans l'ovocyte jeune aucune polarité dans la localisation des divers organites cytoplasmiques, comme l'avait constaté GALANGAU (1969) chez *Milax gagates*. Corrélativement, ce stade de croissance initiale de l'ovocyte est caractérisé par une absence de vitellus dans le cytoplasme.

■ Les ovocytes à un stade plus avancé de leur croissance

Au cours de l'accroissement de l'ovocyte, deux zones se forment progressivement dans le cytoplasme (Pl. VI, fig. d). Englobée de

toute part par une zone basophile, il existe au centre de l'ovocyte une masse de cytoplasme très finement granuleuse possédant de fortes affinités acidophiles. C'est au sein de cet endoplasme granuleux que vont apparaître les réserves nutritives de l'oeuf.

A partir de ce stade, on commence à observer une encapsulation de l'ovocyte par des cellules folliculaires en croissance, ce qui est en accord avec les observations de HILL (1977) chez *Agriolimax reticulatus*.

Les ovocytes en phase d'accroissement avancé renferment :

- des mitochondries, présentes en grand nombre et concentrées autour du noyau (Pl. VI, fig. e),
- un appareil de Golgi qui s'est développé et possède entre dix et douze saccules engagés activement dans la production de petites vésicules (Pl. VI, fig. f),
- des gouttelettes lipidiques.
- comme chez le Gastéropode *Ilyanassa obsoleta* (TAYLOR et ANDERSON, 1969), le premier stade de dépôt du vitellus semble être constitué par des vésicules dilatées contenant un matériel clair condensé en une forme réticulaire. Néanmoins, la confirmation ne pourra en être donnée que par une étude plus précise.
- un ergastoplasme en position plus périphérique.

■ Les ovocytes en dégénérescence

Il faut signaler qu'en phase juvénile, de nombreux ovocytes vont dégénérer ce qui se traduit par des changements dans leur aspect cytologique, à savoir un cytoplasme vacuolisé et finalement un noyau pycnotique (Pl. VI, fig. g). Cet aspect concorde avec les observations faites par LUSIS (1961) chez *Arion ater rufus*.

3 - Le début de la phase mâle (stade 3)

a) La lignée germinale mâle

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

Comme l'ont observé WATTS (1952) chez *Arion subfuscus* et LUSIS (1961) chez *Arion ater rufus*, le passage du spermatocyte I au spermatocyte II est très rapide et ne peut être décrit.

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

ces spermatides montrent fréquemment une disposition en bouquet autour d'une cellule nourricière.

b) La lignée germinale femelle

Même à ce stade de prédominance mâle, elle est toujours présente. Quelques ovocytes dégénérescents sont entourés par des cellules germinales mâles en développement. Cependant, la plupart des ovocytes ne dégèrent pas et continuent leur croissance.

4 - La phase mâle mature (stade 4)

Au cours de cette phase, caractérisée par la présence de spermatozoïdes qui vont commencer à être libérés dans le canal hermaphrodite, les deux lignées germinales sont représentées.

Il convient de subdiviser ce stade en deux sous-stades.

a) Stade 4a

α) La lignée germinale mâle

.....
En début de stade 4a, les spermatocytes sont encore présents, les spermatides prédominent (Pl. VII, fig. a), mais on trouve quelques faisceaux de spermatozoïdes attachés à des cellules nourricières (Pl. VII, fig. b). En fin de stade 4a, on observe des groupes de spermatides mais les spermatozoïdes prédominent (Pl. VII, fig. c).

β) La lignée germinale femelle

.....
Les ovocytes présentent un aspect assez semblable à celui observé au cours des stades 2 et 3 (Pl. VII, fig. d).

b) Stade 4b

α) La lignée germinale mâle

.....
Elle présente les mêmes caractéristiques qu'en fin de stade 4a (Pl. VIII, fig. c). Les gamètes mâles peuvent parfois être disposés autour d'un ovocyte dégénérescent (Pl. VIII, fig. b), observation également faite par LUSIS chez *Arion ater rufus* (1961).

β) La lignée germinale femelle

.....
Les ovocytes sont de grande taille (Pl. VIII, fig. a et d) ; leur cytoplasme est acidophile. Un certain nombre d'entre eux, dont le diamètre atteint la taille de 100 µm, sont en fin de croissance puisque l'ovocyte mature présente un diamètre de 110 µm.

5 - La phase femelle (stade 5)

Elle survient après la décharge des spermatozoïdes et dure environ un mois ; elle se termine par la mort de l'animal.

a) La lignée germinale femelle

Les ovocytes ont achevé leur croissance et sont matures, présentant un diamètre d'environ 110 µm. Leur cytoplasme est rempli de vitellus et une membrane primaire ou vitelline les entoure (Pl. IX, fig. a, b, c). Il y a mise en place d'un follicule autour de ces gros ovocytes : une seule rangée de cellules folliculaires très aplaties à noyau allongé est étroitement appliquée à la surface de la membrane de l'ovocyte qui est ainsi intrafolliculaire (Pl. IX, fig. b). Ces ovocytes sont alors prêts à quitter l'ovotestis. L'évolution de l'ovocyte dans le canal hermaphrodite n'a pas été suivie ; nous ne nous sommes intéressés qu'aux transformations que subit l'ovocyte dans l'ovotestis.

b) La lignée germinale mâle

Dans un premier temps, de très rares spermatozoïdes, non évacués, sont encore présents (Pl. IX, fig. a). En fin de stade, la lignée mâle n'est plus représentée (Pl. IX, fig. c).

c) Les cellules nourricières

Tandis que ce stade se termine, ainsi que l'avaient constaté LUCHTEL (1972 a) chez *Arion circumscriptus* et LUSIS (1961) chez *Arion ater rufus*, les cellules nourricières, dont le cytoplasme devient granuleux, s'étendent comme des languettes dans la lumière de l'acinus et le remplissent parfois totalement (Pl. IX, 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 (LUSIS, 1961).

6 - La phase d'atrophie complète de la gonade (stade 6)

Après la libération des ovocytes qui ont rompu leur follicule (ponte), toutes les cellules nourricières s'hypertrophient et les lumières des acini se trouvent ainsi oblitérées. Aucun gamète n'est présent (Pl. IX, fig. d).

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

C - CARACTERISTIQUES DE L'HERMAPHRODISME CHEZ *ARION SUBFUSCUS*

1 - L'hermaphrodisme chez les Mollusques Gastéropodes

Les Gastéropodes comportent des espèces gonochoriques et des formes hermaphrodites. L'hermaphrodisme est une caractéristique générale des Pulmonés (CHOQUET, 1970).

PELSENEER (1895) considère comme hermaphrodites les Mollusques qui présentent en même temps les gamètes mâles et femelles.

A la suite des travaux de COE (1943, 1944), on peut admettre comme hermaphrodite tout individu présentant des cellules germinales de chacun des deux sexes mûrissant au même moment ou à des périodes successives de son cycle vital.

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

- les hermaphrodites simultanés, qui présentent une maturation synchrone des deux sortes de gamètes,
- les hermaphrodites successifs, pouvant se présenter sous deux formes :
 - . hermaphrodisme à maturation asynchrone : caractérisé par la présence dans la gonade de gonocytes mâles et femelles qui coexistent mais ne mûrissent pas simultanément,
 - . hermaphrodisme à maturation distincte : caractérisé par une phase mâle et une phase femelle bien séparées dans le temps.

2 - L'hermaphrodisme chez *Arion subfuscus*

La glande génitale d'*Arion subfuscus* qui produit dans chaque acinus les deux catégories de gamètes est un ovotestis au sens de PELSENEER (1895).

Si l'on considère que la lignée femelle n'apparaît qu'à l'âge d'un mois, *Arion subfuscus* est une espèce protandre. A ce sujet, il faut noter que la protandrie n'est pas une règle générale chez les Pulmonés ; MASETTI-ZANNINI (1960) constate en effet une tendance à la protérogynie chez *Helix cincta* : les ovogonies apparaissent avant les spermatogonies.

La croissance des ovocytes se poursuit parallèlement au déroulement de la spermatogenèse. Cependant, les spermatozoïdes sont mûrs les premiers, la maturation des ovocytes s'effectuant plus tard. Selon la classification de BACCI (1951), *Arion subfuscus* se range donc parmi les hermaphrodites successifs à maturation asynchrone, ce qui correspond aux observations effectuées chez l'escargot *Helix aspersa* (GUYARD, 1971 a) et chez différentes espèces de limaces (*Arion rufus* : LAVIOLETTE, 1950 a ; *Arion ater rufus* : LUSIS, 1961 ; *Arion circumscriptus* : LUCHEL, 1972 a ; *Agriolimax reticulatus* : RUNHAM et LARYEA, 1968 ; *Milax gagates* : GALANGAU, 1964).

IV - INFLUENCE DES FACTEURS EXTERNES SUR LE DEROULEMENT DE LA GAMETOGENESE

Chez les limaces, le développement de l'ovotestis peut être influencé par des facteurs externes tels que le degré d'humidité, la température, la lumière et le jeûne.

A - INFLUENCE DE L'HUMIDITE

A la suite des travaux de ROSENWALD (1927) chez *Agriolimax laevis*, LUSIS (1966) a effectué chez *Arion ater rufus* une étude précise concernant l'influence de l'humidité relative sur l'évolution de la glande génitale.

Il a constaté chez des animaux d'élevage fixés à l'âge de trois mois, qu'une humidité relative de 40 à 50 % provoque, si l'on compare la gonade d'animaux élevés dans de telles conditions à celle de témoins mis dans des conditions d'humidité relative de 100 %, une diminution du nombre total des spermatoocytes et des ovocytes et une modification de la proportion des cellules mâles et femelles en faveur des ovocytes.

B - INFLUENCE DU REGIME ALIMENTAIRE

RICHTER (1935) a montré chez *Agriolimax laevis* que le régime alimentaire a une influence importante sur le développement de l'ovotestis, la sous-alimentation entraînant une réduction du nombre d'ovocytes, encore absents des gonades chez des individus âgés de deux mois.

C - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Le problème ayant été soulevé par BABOR (1894), les travaux ont porté depuis sur *Arion* et *Deroceras*.

Les premiers, BRIDGEFORD et PELLUET (1952) ont soumis des limaces de l'espèce *Deroceras reticulatum* à des conditions de basse température (-2°C, 0°C, 2°C, 6°C). Cependant, ces auteurs signalant qu'à de telles températures les animaux sont inactifs et ne s'alimentent que très peu, les résultats obtenus pourraient n'être que la conséquence d'une prise de nourriture insuffisante et non pas d'une influence propre de la température.

LUSIS (1966) chez *Arion ater rufus* a constaté après une expérimentation d'une durée de trois mois, qu'une température élevée (27°C) intervient sur le développement des deux lignées sexuelles et plus particulièrement sur la production des ovocytes dont le nombre n'atteint pas le dixième de celui enregistré chez les témoins (placés à une température de 17 à 20°C). Cette observation peut se rapprocher de celle de BOUILLON (1956) qui a montré qu'une température de 23°C avait un effet défavorable sur le déroulement de l'ovogenèse d'escargots de l'espèce *Cepaea nemoralis* ; par contre elle est en opposition avec celle effectuée par BANK (1931) chez *Helix pomatia* où la lignée mâle est plus sensible à la chaleur que la lignée femelle.

Les animaux mis au froid (10°C) enregistrent un retard dans l'évolution des deux lignées ; les ovocytes notamment sont beaucoup moins nombreux que chez les témoins (placés à une température de 17 à 20°C) et présentent une taille inférieure à celle enregistrée chez les témoins, ce qui indique que leur développement a été retardé.

D - INFLUENCE DE LA LUMIERE

HENDERSON et PELLUET (1960) ont étudié l'influence de la lumière en expérimentant sur des limaces de l'espèce *Deroceras reticulatum* durant des temps courts (trois jours à cinq semaines).

SMITH (1966 a), sur *Arion ater*, a soumis des animaux à diverses photopériodes sous différentes conditions de température. Ses expériences ont débuté sur des individus déjà âgés, recueillis dans la nature, et qui avaient donc probablement déjà été soumis à des jours longs, ce qui pourrait expliquer que cet auteur n'ait pas observé d'effet photopériodique significatif.

Les résultats les plus intéressants ont été obtenus récemment par SOKOLOVE et Mc CRONE (1978), et Mc CRONE et SOKOLOVE (1979) qui ont constaté que la lumière exerce une influence sur le déroulement de la gamétogenèse de *Limax maximus*. En expérimentant dès l'éclosion, sur une durée de dix-huit à trente-trois semaines, ils ont pu démontrer que la maturation mâle est influencée par la photopériode : les jours longs (16 heures de lumière - 8 heures d'obscurité) la favorisent, tandis que les jours courts (8 heures de lumière - 16 heures d'obscurité) la retardent. Ils ont également prouvé qu'une fois initiée la maturation mâle ne pouvait plus être influencée par les variations de photopériode, ce qui expliquerait les résultats négatifs obtenus par SMITH (1966 a).

V - DISCUSSION ET CONCLUSION

Après avoir envisagé l'origine et la localisation de la gonade, l'étude du cycle sexuel et de ses stades successifs avait pour but de pouvoir expérimenter avec plus de précision et de mieux interpréter les résultats obtenus. Cette étude a soulevé plusieurs problèmes qui seront discutés ici successivement.

A - NOTION D'EPITHELIUM GERMINATIF

Les études cytologiques concernant l'ovotestis des Pulmonés ont montré que chez de nombreuses espèces, les spermatogonies, les cellules nourricières, les ovocytes et les cellules folliculaires se différencient à partir d'un épithélium germinatif constitué de cellules indifférenciées [*Helix pomatia* : ANCEL (1903), *Helix aspersa* : GUYARD (1971 a), *Arion rufus* : LAVIOLETTE (1954 a), *Agriolimax reticulatus* : RUNHAM et LARYEA (1968) puis RUNHAM et HOGG (1979), *Vaginulus borellianus* : QUATTRINI et LANZA (1965),

Lymnaea stagnalis : JOOSSE et REITZ (1969), *Biomphalaria glabrata* : de JONGBRINK, de WIT, KRAAL et BOER (1976)].

Chez *Arion subfuscus*, l'épithélium germinatif est constitué de cellules souches ; il acquiert l'état germinatif qui se traduit par des modifications d'ordre nucléaire dans les cellules transformées en protogonies indifférenciées.

L'existence d'un épithélium germinatif n'est pas reconnue par LUCHTEL (1972 a et b) chez *Arion circumscriptus*, *Arion ater rufus* et *Deroceras reticulatum*. Pour cet auteur, l'épithélium des acini serait constitué de cellules non germinales ("auxiliary cells"). Les travaux plus récents de RUNHAM et HOGG (1979) et de HOGG et WIJDENES (1979) sur une des espèces étudiées par LUCHTEL (*Deroceras reticulatum*) apportent des résultats opposés : toutes les cellules de la gonade dérivent des cellules germinales primordiales ("GSC : gonadal stem cells") constituant l'épithélium germinatif.

B - NOTIONS DE CELLULE-SOUCHE ET DE PROTOGONIE

Notre propos n'était pas de rechercher l'origine de la gonade mais d'y repérer un stade cellulaire suffisamment précoce pour être indifférencié.

L'observation de gonades infantiles nous a permis de définir au niveau ultrastructural deux types de cellules : les cellules-souches et les protogonies, ce qui concorde avec les observations de GUYARD (1971 a).

L'existence de deux catégories de gonocytes dans la gonade pose le problème suivant : la cellule indifférenciée donne-t-elle naissance aux deux types cellulaires mâle et femelle ou alors spermatogonie et ovogonie sont-elles issues de deux catégories de cellules d'aspect différent ? Les observations effectuées jusqu'à présent chez les Gastéropodes hermaphrodites ont montré qu'aucun critère ultrastructural ne permet de définir deux catégories de protogonies.

GALANGAU (1969) constate que chez *Milax gagates* la gonie primitive, située contre la paroi de l'acinus, est une cellule de 15 μm à gros noyau contenant des amas de chromatine épars ; aucun argument ultrastructural ne permet de dire que certaines gonies donneront naissance à la lignée mâle et d'autres à la lignée femelle.

Pour GUYARD (1971 a), chez *Helix aspersa*, "toute protogonie épithéliale est potentiellement bisexuée, les futurs gamètes procèdent donc des mêmes cellules indifférenciées".

Chez *Arion subfuscus*, notre étude a permis l'observation des

stades gonocytaires sexuellement indifférenciés et montre qu'il semble chez cette espèce n'exister qu'un seul type cellulaire à l'origine des deux lignées germinales.

C - LA DIFFERENCIATION DES DEUX LIGNEES GERMINALES (MÂLE ET FEMELLE)

1 - Evolution topographique

Chez divers Pulmonés (Hélicidés, Arionidés, Limacidés, Soléolifères), il est admis que les cellules germinales qui sont libérées dans la lumière de l'acinus sont des gonocytes mâles, tandis que celles qui demeurent dans la paroi et évoluent sur place sont des éléments de la lignée femelle [*Helix lucorum* : RANZOLI (1956, 1957), *Helix cincta* : MASETTI-ZANNINI (1960), *Helix aspersa* : GUYARD (1971 a), *Arion circumscriptus* : LUCHTEL (1972 a), *Deroceras reticulatum* : HOGG et WIJDENES (1979), *Laevicaulis alte* et *Vaginulus borellianus* : QUATTRINI et LANZA (1965)]. *Arion subfuscus* se comporte selon ce modèle.

2 - Caractères distinctifs

En dehors du fait que l'ovogenèse se poursuive en position pariétale, il a été possible au niveau ultrastructural d'établir des caractères distinctifs permettant de différencier la jeune cellule femelle de la spermatogonie (voir page 24).

D - L'OVOGENESE

Après le stade ovogonie, l'ovogenèse d'*Arion subfuscus* peut se subdiviser en trois étapes que l'on peut rapprocher de celles décrites par HILL et BOWEN (1976) chez *Agriolimax reticulatus*.

- Croissance initiale caractérisée par un cytoplasme ovocytaire basophile et une absence de vitellus dans ce dernier.
- Croissance intermédiaire marquée par le début de la synthèse du vitellus.
- Maturité des ovocytes qui sont remplis de vitellus.

Chez *Lymnaea stagnalis*, JOOSSE et REITZ (1969) ont remarqué que les ovocytes sont localisés dans des aires vitellogénétiques ("vitellogenic areas") constituées par les zones de contact entre la paroi des acini et la glande digestive. Nous n'avons pas effectué une telle observation chez *Arion subfuscus* où, chez les adultes, on peut voir évoluer côte-à-côte sur une même portion de paroi des ovocytes se trouvant à différents stades de leur développement.

Chez *Arion subfuscus*, on observe la présence d'ovocytes en dégénérescence dans l'ovotestis. Ce phénomène a également été décrit chez les limaces *Arion ater rufus* (LUSIS, 1961) et *Agriolimax reticulatus* (RUNHAM et LARYEA, 1968), ainsi que chez le Basommatophore *Lymnaea stagnalis* (JOOSSE, BOER et CORNELISSE, 1968).

En conclusion, *Arion subfuscus*, qui a fait l'objet de nos études, est un animal à cycle annuel, comme d'autres Arionidés [*Arion rufus* : LAVIOLETTE (1954 a), *Arion ater rufus* : LUSIS (1961), *Arion circumscriptus* : LUCHTEL (1972 a)]. Ces Stylommatophores ne pondent qu'à une seule période de leur vie puis meurent. Excepté durant le premier mois de la vie et durant la phase femelle on a toujours des acini mixtes. Cependant, la maturité mâle survient avant la maturité femelle : les ovocytes subissent un lent accroissement qui ne s'accélère vraiment que chez les adultes en fin de phase mâle et en phase femelle.

Ayant posé les bases relatives à l'évolution de la gonade et passé en revue les divers facteurs externes pouvant influencer sur son développement, il nous était alors possible de tenter d'amener des éléments de réponse à la question : quels sont les facteurs contrôlant la différenciation sexuelle et le fonctionnement de l'ovotestis ? Leur mise en évidence est le résultat d'une expérimentation *in vivo* et *in vitro* que nous allons envisager dans la deuxième partie.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DU DÉTERMINISME ENDOCRINE
DE LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE
ET DU FONCTIONNEMENT DE LA GONADE

Les formes hermaphrodites en produisant les deux catégories de gamètes se prêtent bien à l'étude du déterminisme de la différenciation sexuelle et du fonctionnement de la gonade. En même temps que se sont poursuivies les recherches sur l'influence des facteurs externes, de nombreux travaux ont porté sur les facteurs internes.

Chez les Gastéropodes Pulmonés, en dehors des expériences d'irradiation aux rayons X, des techniques d'endocrinologie classique ont été employées : ablations, implantations, injections, cultures organotypiques. De plus, plusieurs auteurs ont décrit des cellules neurosécrétrices à activité variable au cours du développement de la gonade.

Nous passerons successivement en revue les travaux ayant fait appel à ces diverses techniques.

1 - Expériences d'irradiations aux rayons X

Elles ont été effectuées afin d'étudier leur répercussion sur les deux lignées germinales et sur la ponte.

Chez les Basommatophores, il faut signaler les travaux de PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ (1964) chez *Australorbis glabratus*, de JOOSSE, BOER et CORNELISSE (1968) chez *Lymnaea stagnalis*, de RAVERA (1966) et de RAVERA, GADDI et GIANNOVI (1969) chez *Physa acuta*.

Chez les Stylommatophores, LAVIOLETTE et CUIR (1959) ont soumis des limaces de l'espèce *Arion rufus*, âgées de deux ou cinq mois, à diverses doses de rayons X. Des doses faibles (3 000 r.) provoquent l'hypertrophie des noyaux des spermatogonies et une crise de préméiose ovocytaire. Des doses de 6 000 à 12 000 r. détruisent complètement la lignée mâle, alors que quelques ovocytes survivent. La dose maximale utilisée (18 000 r) provoque un état de stérilité temporaire de la gonade ; trois mois après le traitement les spermatogonies réapparaissent mais la régénération des ovocytes est très limitée.

2 - Techniques d'ablation et de cautérisation

a) Ablation de la gonade

Cette opération, que nous avons effectuée pour étudier l'état de la gonade régénérée chez des animaux ayant subi divers traitements, est réalisable chez les Pulmonés ne possédant pas de coquille. Elle pose par contre de nombreux problèmes chez les Pulmonés en possédant une. En effet, dans ce cas, elle est très difficile à réaliser chez les espèces où la gonade est enrobée par la glande digestive : chez *Lymnaea stagnalis*, l'opération

est impossible ; chez *Helix*, elle est suivie de temps de survie courts, ne résulte généralement qu'en une castration partielle et entraîne un pourcentage élevé de mortalité (*Helix pomatia* : FILHOL, 1938 ; *Helix aspersa* : GODDARD, 1960 et GOMOT, 1976 a). Elle est par contre possible chez les espèces où l'ovotestis est séparé de la glande digestive (*Taphius glabratus* : HARRY, 1965 ; *Bulinus truncatus* : BRISSON, 1971 ; BOER, MOHAMED, VAN MINNEN, de JONG-BRINK, 1976).

b) Ablation des tentacules oculaires

Les résultats obtenus chez les Stylommatophores et relatifs à la différenciation sexuelle et au fonctionnement de la gonade seront discutés dans le chapitre I.

c) Ablation des ganglions cérébroïdes

Réussie uniquement chez *Lymnaea stagnalis*, elle n'a pu apporter de résultats exploitables en raison des perturbations qu'elle provoque ; nous y reviendrons dans le chapitre I.

d) Cautérisation des corps dorsaux, des lobes latéraux et de cellules neurosécrétrices

. Chez *Lymnaea stagnalis*, il a été possible de démontrer par cette méthode que :

- les corps dorsaux stimulent la vitellogénèse (GERAERTS et JOOSSE, 1975),
- la neurohormone des cellules caudo-dorsales stimule l'ovulation et empêche la dégénérescence des ovocytes matures (GERAERTS et BOHLKEN, 1976) ;
- les lobes latéraux exercent une influence sur l'évolution de la spermatogénèse et de l'ovogénèse. En effet, leur cautérisation entraîne un retard dans l'apparition de la maturation mâle et femelle et diminue le taux d'oviposition. Selon GERAERTS (1976 b), il se pourrait que l'activité des corps dorsaux soit régulée par les lobes latéraux.

. Chez *Agriolimax reticulatus*, WIJDENES et RUNHAM (1976) ont pu mettre en évidence que la cautérisation des corps dorsaux ralentissait la "maturation" des ovocytes.

3 - Techniques d'implantations

Pratiquées chez *Lymnaea stagnalis*, elles ont pu confirmer l'activité endocrine des corps dorsaux et des lobes latéraux (GERAERTS et JOOSSE, 1975 ; GERAERTS, 1976 b).

4 - Techniques d'injections

Après la mise au point de techniques d'anesthésie et d'opération, des injections d'homogénats de structures endocrines ou présu-
mées endocrines (tentacules oculaires, cerveau) ont pu être effectuées. Nous
en discuterons dans le chapitre consacré à l'expérimentation *in vivo*.

Des hormones de Vertébrés ont été injectées à divers Pul-
monés (*Lymnaea stagnalis* : AUBRY (1962), *Helix pomatia* : AUBRY, 1962 ;
BIERBAUER et MOLNAR, 1972 a ; CSABA et BIERBAUER, 1977 et 1979). Néanmoins,
comme le signale DURCHON (1967), "d'une façon générale, l'emploi d'hormones
de Vertébrés chez les Invertébrés n'a jamais apporté de renseignements utili-
les". Nous nous bornerons donc à signaler les résultats obtenus chez les
limaces.

ROSE et HAMON (1939) à la suite d'injection d'une solution
huileuse de benzoate d'oestradiol ou de propionate de testostérone n'ont pu
mettre en évidence de changement au niveau de la gonade de *Milax gagates*.

BRIDGEFORD et PELLUET (1952) constatent que la synapoïdine
(mélange des gonadostimulines antéhypophysaires : LH et FSH) provoque chez
Deroceras reticulatum un accroissement du nombre d'ovocytes et une matura-
tion rapide des cellules germinales mâles en même temps qu'une désorganisa-
tion de l'ovotestis.

TAKEDA (1979) a montré chez *Deroceras reticulatum* et *Limax
flavus* que les oestrogènes (oestradiol, oestrone) stimulent la ponte mais
provoquent un faible taux de développement des oeufs. Injectés ensemble,
l'oestradiol et la déhydroépiandrostérone augmentent les taux de ponte et
de développement des oeufs. Chez des animaux tentaculectomisés, l'injection
d'oestrogènes (oestradiol, oestrone) et d'androgènes (testostérone, déhydro-
épiandrostérone) entraînent une augmentation du nombre d'oeufs pondus et du
taux de développement de ces derniers.

Des stéroïdes ont été identifiés chez *Arion ater rufus*
dans l'oeuf (testostérone, 11-cétotestostérone, 17 α -hydroxyprogestérone :
GOTTFRIED et LUSIS, 1966) et dans la spermathèque (oestrone et 17 β -oestradiol :
GOTTFRIED, DORFMAN et WALL, 1967) et chez *Ariolimax californicus* (GOTTFRIED
et DORFMAN, 1970) dans la glande de l'albumine (oestrone, pregnénone, 17 β -
oestradiol), dans la spermathèque (oestrone) et dans la gonade (déhydroépi-
androstérone et 11-cétotestostérone). A la suite de ce dernier résultat,
GOTTFRIED et DORFMAN (1970) ont injecté les stéroïdes gonadiques détectés à
des limaces privées de leurs tentacules et ont montré que ces stéroïdes agis-
saient en modifiant la libération de l'"hormone tentaculaire" chez *Ariolimax
californicus*.

5 - Les cultures organotypiques

Cette méthode a été introduite dans les recherches concernant l'endocrinologie de la reproduction des Pulmonés pour échapper aux difficultés opératoires *in vivo*. Nous y reviendrons dans le chapitre II.

6 - Mise en évidence d'une relation entre les variations saisonnières de l'état de la gonade et les changements dans l'histologie de cellules neurosécrétrices ou d'organes endocrines ou supposés endocrines

Dans ce domaine, ont été envisagés essentiellement le système nerveux central et plus particulièrement les ganglions cérébroïdes, les corps dorsaux et les tentacules oculaires. Le chapitre III fera le point des connaissances actuelles.

A la suite de ces travaux, nous avons entrepris l'étude du déterminisme de la différenciation sexuelle, chez *Arion subfuscus*, par une expérimentation *in vivo* auquel le premier chapitre sera consacré et par une expérimentation *in vitro* par la méthode des cultures d'organes qui fera l'objet du second chapitre. Le troisième chapitre traitera d'une étude histologique du complexe céphalique.

RESULTATS OBTENUS CHEZ LES GASTEROPODES PULMONES
AYANT INFLUE SUR LE DEROULEMENT DE NOTRE EXPERIMENTATION

"The application of the classical methods of endocrine research to the pulmonate gastropods has raised a number of purely technical difficulties for the investigators".

BOER H.H. et JOOSSE J. (1975). Chapter 6 : Endocrinology *In* : Pulmonates, V. FRETTER & J. PEAKE Ed., Academic Press, London, New York, 1, 245-307.

"A la suite d'expériences de castration de très jeunes animaux se sont révélées les facultés régénératives de la glande génitale d'*Arion rufus*".

LAVIOLETTE P. (1954). Ann. Sci. Nat. Zool., 16, 427-535.

"Les gonocytes primordiaux de l'ébauche gonadique d'*Helix aspersa* ont le pouvoir de s'autodifférencier dans le sens femelle".

GUYARD A. (1969). C. R. Acad. Sci. Paris, 268, D, 966-969.

"In both species of slugs used, *Arion subfuscus* and *Arion ater*, cutting off the optic tentacles results in an increase in the number of eggs, when compared with the controls".

PELLUET D. et LANE N.J. (1961). Canad. J. Zool., 39, 789-805.

Chez *Helix aspersa*. "l'association autologue ébauche gonadique indifférenciée-tentacules oculaires aboutit à une inhibition de l'autodifférenciation ovocytaire qui ne se manifeste pas et à un *statu quo* de l'activité mâle".

GUYARD A. (1971). Thèse Doct. Sci. Nat., Besançon, n° 56.

"There is enough evidence to suggest that in all gastropods at least one type of endocrine organ exists, the dorsal bodies".

JOOSE J. (1972). Gen. Comp. Endocrinol., Suppl. 3, 591-601.

In *Lymnaea stagnalis*, "the dorsal bodies produce a factor that stimulates vitellogenesis in the female cells".

GERAERTS W.P.M. et JOOSE J. (1975). Gen. Comp. Endocrinol., 27, 450-464.

In *Agriolimax reticulatus*, "it is suggested that the dorsal bodies produce a hormone that promotes maturation of the oocytes".

WIJDENES J. et RUNHAM N.W. (1976). Gen. Comp. Endocrinol., 29, 545-551.

"L'étude expérimentale du déterminisme endocrine du fonctionnement de la gonade des Mollusques Gastéropodes pose de nombreux problèmes. C'est pourquoi il est impossible de généraliser les résultats obtenus chez une espèce. Il faudra encore attendre plusieurs années avant d'avoir une vue d'ensemble".

DURCHON M. et JOLY P. (1978). Chapitre VI : Les Mollusques *In* : L'Endocrinologie des Invertébrés, Presses Universitaires de France, Paris, 86-111.

CHAPITRE I

EXPÉRIIMENTATION IN VIVO

C'est LAVIOLETTE (1954a) qui a observé le phénomène de régénération germinale en réalisant des castrations chez *Arion rufus* afin de compléter son étude du déterminisme humoral de la différenciation glandulaire du tractus génital. Il a montré que la gonade réséquée à sa jonction avec le canal hermaphrodite (fig. 4, a) était capable de régénérer chez des limaces âgées de un à six mois et demi. Passé cet âge, l'opération n'est jamais suivie de régénération, ce qui confirme les résultats d'ABELOOS (1943), obtenus sur des individus âgés de *Limax maximus*.

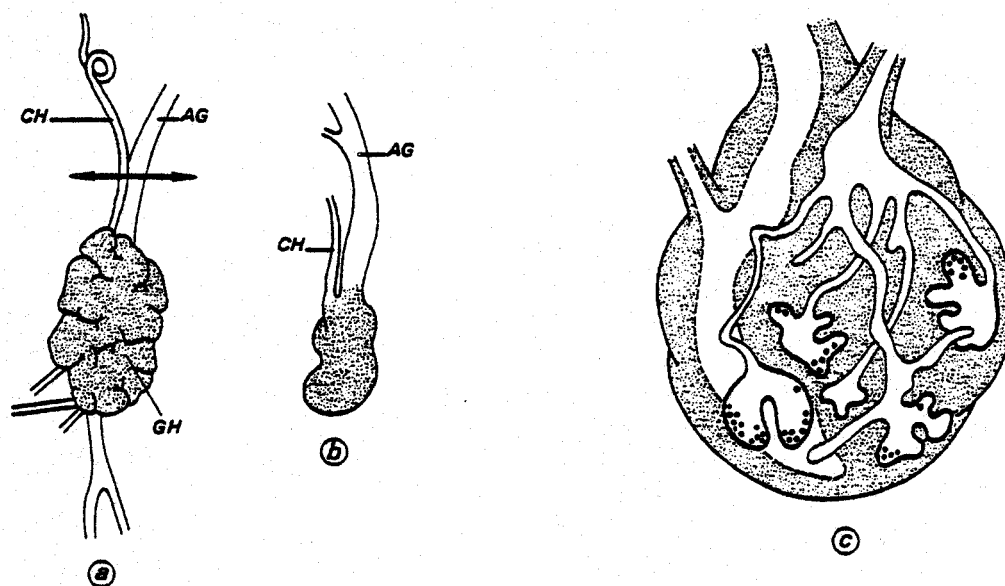


Figure 4 - La régénération germinale.

- a - Gonade au moment de l'ablation (le niveau de section est figuré par le trait fléché).
- b - Régénérat de six semaines coiffant l'extrémité sectionnée de l'artère génitale et du canal hermaphrodite.
- c - Reconstitution graphique simplifiée d'un régénérat renfermant des cellules germinales :
 - . 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.

AG : artère génitale ; CH : canal hermaphrodite ; GH : glande hermaphrodite. (D'après LAVIOLETTE, 1954a, chez *Arion rufus*).

LAVIOLETTE a défini dans la régénération de la glande génitale d'*Arion rufus* quatre étapes que l'on retrouve chez *Arion subfuscus* :

- La première correspond à l'édification d'un nodule cicatriciel (fig. 4, b).
- La seconde est marquée par la formation de digitations du canal hermaphrodite.
- La troisième est définie par l'apparition de cryptes provenant de la dilatation de l'extrémité de l'une ou de plusieurs de ces digitations.
- La quatrième est remarquable par la présence de cellules germinales néoformées (fig. 4, c).

Chez les Gastéropodes, la régénération germinale a été également étudiée chez d'autres Pulmonés [Stylommatophores : *Deroceras* (HOGG et WIJDENES, 1979) ; Basommatophores : *Bulinus* (BRISSON, 1967, 1971), *Australorbis* (VIANEY-LIAUD, 1972 b)] et chez des Nudibranches de la famille des *Aeolidiidae* (TARDY, 1967, 1971).

BRISSON (1967, 1971) en opérant sur de jeunes exemplaires de *Bulinus contortus* (Michaud) *truncatus* (Audouin), VIANEY-LIAUD (1972 b) chez *Australorbis glabratus* et plus récemment HOGG et WIJDENES (1979) chez *Deroceras reticulatum* ont montré que l'obtention d'une néogonade n'est possible que si les animaux castrés sont immatures. Ainsi, il semble bien qu'il existe chez ces Mollusques un âge limite au delà duquel la régénération germinale ne s'effectue plus. Seul TARDY (1971) au cours de ses travaux sur *Aeolidiella alderi* a observé que "la potentialité germinale subsistait à peu près tout au long de la vie de ce Mollusque".

PELLUET et LANE (1961) puis PELLUET (1964) ont montré que l'ablation des tentacules oculaires provoquait chez les jeunes *Arion subfuscus*, *Arion ater* et *Milax* sp. un accroissement notable du nombre d'ovocytes dans la gonade des opérés, trois à huit semaines après l'opération. Ce résultat et ceux obtenus à la suite d'injections d'extraits tentaculaires et cérébraux leur a fait émettre l'hypothèse que le déterminisme de la différenciation sexuelle serait, chez ces animaux, de nature endocrine et ferait intervenir deux hormones : une hormone tentaculaire, inhibitrice de l'ovogenèse, et une hormone cérébrale contrôlant la production d'ovocytes.

Toute notre expérimentation s'est élaborée autour de ces deux possibilités d'opérations : castration et tentaculectomie, qui ont servi de base aux séries expérimentales effectuées.

Deux grands groupes d'opérations ont été ainsi réalisés :

- Ablations des tentacules oculaires chez des jeunes à l'éclosion, suivies de résections répétées du régénérat
- Castrations précédées ou non de tentaculectomies.

Dans ces conditions, nous avons entrepris une étude expérimentale de la différenciation sexuelle d'*Arion subfuscus* qui a consisté à étudier l'évolution de la gonade en croissance ou en cours de régénération chez des limaces privées ou non de leurs tentacules oculaires et subissant ou non des injections répétées d'extraits tentaculaires ou cérébraux de divers types.

En effet, les ablations de tentacules pratiquées par PELLUET et LANE ayant été suivies de fixations à court terme sur des animaux dont le stade génital n'a pas été précisé, il était donc utile de reprendre ces

expériences et d'en prolonger les durées. De plus, la possibilité de réédification d'une nouvelle gonade nous a permis de rechercher :

- le rôle des tentacules oculaires dans la réalisation de la gamétogenèse des limaces (en effet, la régénération germinale n'avait jamais été envisagée en privant un individu d'un organe présumé endocrine et en lui injectant des extraits de ce même organe)
- l'influence d'injections d'extraits cérébraux sur l'état de la gonade nouvellement édifiée.

I - MATERIEL ET TECHNIQUES - COMPORTEMENT DES ANIMAUX EN EXPERIENCE

A - ANIMAUX

Afin de réunir le maximum de critères indispensables à une comparaison valable entre les résultats obtenus, les opérations sont effectuées à partir d'un lot aussi homogène que possible (animaux issus de pontes recueillies au même moment et déposées par des sujets en provenance d'une station unique).

B - TECHNIQUES OPERATOIRES

1 - Ablation des tentacules oculaires

Les interventions sont effectuées après une légère anesthésie à l'anhydride carbonique, suffisante pour abolir la réponse de rétraction du tentacule. L'ablation de ce dernier est facile à réaliser : saisi à l'aide de pinces, il est sectionné à la base.

Cependant, les potentialités de régénération des tentacules chez les limaces (CHETAIL, 1963) imposent une vérification régulière et une résection complète et périodique (tous les huit à quinze jours) du régénérat.

2 - Castrations

La régénération germinale n'étant possible que si l'ablation de la gonade est effectuée avant la puberté (LAVIOLETTE, 1954a), les castrations ont été réalisées sur des animaux âgés d'environ deux mois, se trouvant donc en phase juvénile de leur développement (ABELOOS, 1944).

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 (tous les huit à quinze jours).

a) 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 (1954a) comporte les temps suivants :

o Immersion dans une solution diluée d'acide nitrique et de formol (H_2O : 1000, HNO_3 : 2, $CHOH$ à 40 % : 3).

Ce mélange provoque une extension relativement rapide des animaux s'accompagnant d'un rejet de mucus.

o Lavage à l'eau courante

Déposées 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.

o 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 dix à quinze minutes mais le comportement d'individus de même âge est sujet à des variations importantes.

o Action du froid

Afin de parachever la décontraction, les limaces sont soumises 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.

b) Actes opératoires

On pratique une incision médio-dorsale de deux millimètres de longueur que l'on pourra prolonger d'un ou deux millimètres dans la direction convenable, étant donnée la position très variable de la gonade par rapport au tégument.

Il faut agir rapidement en raison 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 sépare les lobes de l'hépatopancréas à l'aide d'aiguilles de verre diversement coudées et terminées en boule. Quand la gonade est repérée, on procède à l'ablation proprement dite qui consiste en une section des différents vaisseaux la maintenant en place. Le canal hermaphrodite, accolé à l'artère génitale est coupé en même temps qu'elle (fig. 4, a, page 42). La fragilité de l'épithélium hépatique fait qu'il arrive que la glande digestive soit lésée au cours des opérations de dégagement de la gonade. L'emploi d'un électrocoagulateur (KOENIG) y remédie et à la dissection, on ne retrouve la 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 ou 0,2 mm de diamètre placées à environ un millimètre d'intervalle.

C - SOINS POST-OPERATOIRES

1 - Castrats

Les opérés sont gardés individuellement dans des bocaux d'un demi-litre garnis de papier filtre humidifié d'eau distillée additionnée, durant les premiers jours suivant l'opération, d'antibiotiques : Spécilline G (SPECIA) et Streptomycine (SPECIA). 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.

2 - Animaux détentaculés (Cas des castrats et des animaux normaux ayant subi l'ablation des tentacules)

KITTEL (1956) ayant montré que les tentacules oculaires seraient des récepteurs à longue distance pour l'odorat alors que les tentacules inférieurs seraient des récepteurs à courte distance en ce qui concerne l'odorat et le goût, les animaux tentaculectomisés sont déposés individuellement dans des récipients en verre d'un demi-litre où la salade (toujours en abondance) est placée de telle façon que l'animal soit, dès sa première prise de nourriture, à sa proximité ou en contact avec elle.

D - INJECTIONS D'EXTRAITS

Le stockage à basse température (-70°C) de tentacules oculaires et de cerveaux prélevés au stade désiré a permis de réunir un nombre suffisant de tentacules et de cerveaux autorisant la réalisation de séries expérimentales relatives à l'influence d'injections répétées d'extraits tentaculaires ou cérébraux sur la gonade en croissance ou en cours de régénération.

L'obtention de tels extraits réclame un grand nombre d'animaux ; l'expérimentation s'étendant sur cinq à dix mois requiert en effet plus de quarante à quatre-vingt tentacules ou cerveaux par opéré. Ceci limite nécessairement le nombre d'individus en expérience.

Les injections, hebdomadaires, sont effectuées dans la cavité générale, après anesthésie légère et relaxation de l'animal pour faciliter l'injection (LEVER, JAGER et WESTERVELD, 1964).

Le volume injecté varie suivant l'âge de l'animal (10 à 50 µl) mais est toujours le même sur des animaux de même âge, quelle que soit sa nature (liquide physiologique ou extrait).

Dans le cas des animaux castrés, les injections commencent quinze jours après l'opération ; elles sont effectuées sur des individus juvéniles et corrélativement posent peu de problèmes. Chez les animaux normaux et les détentaculés à l'éclosion, elles débutent huit à quinze jours après l'éclosion en raison de la taille de ces jeunes individus.

Lors de l'injection, la glande digestive peut être lésée, ce qui entraîne une certaine mortalité. Cet incident, rarement observé chez les castrats, l'est plus fréquemment chez les jeunes animaux durant le premier mois.

Après injection, l'aiguille de la seringue HAMILTON doit être soigneusement nettoyée avant de servir à nouveau, son canal étant facilement obstrué par le mucus.

E - CONDITIONS EXPERIMENTALES

Tous les animaux en expérience sont placés en éclairage naturel à la température moyenne de 15°C dans des bocal individuels. Ils reçoivent une nourriture journalière (laitue).

F - COMPORTEMENT DES ANIMAUX EN EXPERIENCE

Dans les divers tableaux et figures, seuls sont indiqués les nombres d'animaux examinés.

1 - Mortalité

a) Cas des castrats

Elle est de l'ordre de 20 à 25 %, due à l'opération par elle-même ou au choc opératoire. En cas d'injections d'extraits à de tels animaux, elle passe à environ 35 %.

b) Cas des animaux non castrés

Le taux de mortalité chez les individus témoins recevant du liquide physiologique atteint 20 à 25 % comme chez les limaces subissant des injections d'extraits. Il peut probablement s'expliquer par les anesthésies fréquentes qui, bien que légères (temps brefs), sont répétées et par les difficultés d'injection chez les jeunes animaux.

2 - Activité des opérés

Excepté chez les castrats dans les premiers jours suivant l'opération (la cause en étant vraisemblablement la forte anesthésie et le choc opératoire), l'activité locomotrice des divers opérés semble normale.

3 - Prise de nourriture

Les animaux en expérience s'alimentent normalement en tenant compte des précautions prises dans le cas des animaux privés de leurs tentacules et de la mise au jeûne des castrats dans les quelques jours qui suivent leur opération (voir soins post-opératoires). En effet, quoique la prise de nourriture n'ait pas été quantifiée comme l'ont fait d'autres auteurs (VAN DER STEEN, JAGER et TIEMERSMA, 1973 ; SCHEERBOOM et GELDOLF, 1978), une inspection journalière des limaces en expérience et la production de fèces indiquent une activité normale quant à leur alimentation.

II - EVOLUTION DE LA GONADE EN CROISSANCE OU EN COURS DE REGENERATION CHEZ DES ANIMAUX DETENTACULES OU NON ET RECEVANT DES INJECTIONS REPETEEES D'EXTRAITS TENTACULAIRES

De précédents travaux consistant en la privation de tentacules oculaires dès l'éclosion (WATTEZ et DURCHON, 1972) et en castrations effectuées sur des animaux juvéniles préalablement tentaculectomisés (WATTEZ, 1973) avaient abouti à la mise en évidence chez ces deux types d'opérés d'une nette féminisation de l'ovotestis en croissance ou en cours de régénération. Ils nous avaient ainsi permis de soupçonner l'influence des tentacules oculaires dans la différenciation de la gonade d'*Arion subfuscus*.

Le présent travail relate les observations effectuées à la suite des expériences complémentaires :

- castration en phase juvénile, précédée ou non de détentaculation, et suivie d'injections répétées d'extraits tentaculaires ;
- tentaculectomie pratiquée à l'éclosion, suivie d'injections répétées d'extraits tentaculaires au cours de la croissance.

A - SERIES EXPERIMENTALES

Les injections d'extraits tentaculaires ont été réalisées sur deux types de receveurs (castrats et animaux non castrés) privés ou non de leurs tentacules. Les extraits utilisés ont été obtenus à partir d'organes prélevés à différents stades du développement de l'animal : phases infantile, juvénile, mâle et femelle (stades 1, 2, 3, 4 et 5 du cycle génital).

Les séries témoins sont constituées de limaces subissant des injections répétées de solution physiologique de CHIARANDINI (1964).

L'expérimentation comprend quatorze séries (tableau III).

TABLEAU III

TABLEAU RECAPITULATIF DES SERIES EXPERIMENTALES RELATIVES A L'INJECTION D'EXTRAITS TENTACULAIRES.

Nature de la solution injectée	Type d'opération			
	Castration (C)	Castration + Tentaculectomie (CD)	- Animaux normaux (N)	Tentaculectomie à l'éclosion (-T)
Solution physiologique de Chiarandini (Chia)	Série 1 : C + Chia	Série 2 : CD + Chia	Séries 5 et 10 : N + Chia	Séries 6 et 11 : -T + Chia
Extraits tentaculaires "juvéniles" (Tj)	Série 3 : C + Tj	Série 4 : CD + Tj	-	Série 13 : -T + Tj
Extraits tentaculaires "femelles" (T♀)	-	-	Série 8 : N + T♀	Série 9 : -T + T♀
Extraits tentaculaires "mâles" (T♂)	-	-	-	Série 14 : -T + T♂
Extraits tentaculaires homologues (Th) "infantiles" puis "juvéniles" puis "mâles"	-	-	-	Séries 7 et 12 : -T + Th



1 - Injections à des castrats (séries 1 à 4)

Quatre séries ont été effectuées, elles concernent quarante-neuf animaux.

Séries 1 et 2 : C + Chia et CD + Chia

Groupes témoins consistant en limaces castrées (C) [série 1 : C + Chia] dans certains cas détentaculées (CD) [série 2 : CD + Chia] recevant une injection de solution physiologique de CHIARANDINI (1964) (+ Chia) en quantité équivalente à celle des séries 3 et 4, une fois par semaine jusqu'à fixation du régénérat obtenu (six mois après l'opération).

Séries 3 et 4 : C + Tj et CD + Tj

Animaux castrés (C) [série 3 : C + Tj] et castrats détentaculés (CD) [série 4 : CD + Tj] recevant hebdomadairement une dose d'extrait tentaculaire homologue (+ Tj) [obtenu à partir de tentacules prélevés sur des individus juvéniles] correspondant à deux tentacules oculaires, jusqu'au prélèvement de la gonade néoformée (six mois après l'opération).

2 - Injections à des individus tentaculectomisés à l'éclosion et à des animaux normaux (séries 5 à 14)

L'expérience a porté sur deux cent sept animaux répartis en dix groupes que l'on s'est proposé d'élever jusqu'à l'état adulte. Dans tous les cas, les fixations ont été effectuées respectivement à six et à dix mois après l'éclosion, c'est-à-dire à des stades caractéristiques du cycle génital chez les animaux normaux d'élevage (stade 2 : phase juvénile, stade 4 : phase de maturité mâle).

Les séries 5 à 9 ont été effectuées en 1973-74 et les séries 10 à 14 pratiquées en 1974-75. Ceci explique la présentation de deux tableaux de résultats (tableaux V et VI), chaque nouvelle expérimentation nécessitant un nouveau groupe de séries témoins. Ainsi, les couples de séries 5-6 et 10-11 concernent le même type d'expérimentation ; il en est de même pour les séries 7 et 12.

Séries 5 et 6 : N + Chia et -T + Chia

Animaux normaux (N) [série 5 : N + Chia] ou détentaculés dès l'éclosion (-T) [série 6 : -T + Chia] subissant une injection hebdomadaire de solution physiologique de CHIARANDINI (+ Chia) jusqu'à la fixation (témoins par rapport aux séries 7, 8 et 9).

Série 7 : -T + Th

Animaux détentaculés (-T) dès l'éclosion recevant, toutes les semaines jusqu'au sacrifice de l'opéré, une dose d'extrait tentaculaire

(+ T_h) équivalant à deux tentacules oculaires. La nature de l'extrait injecté varie qualitativement suivant l'âge de l'animal : le surnageant injecté pendant le premier mois est de nature "infantile". Ensuite, il est de nature "juvénile" ; enfin, à partir du huitième mois, il est obtenu à partir de tentacules prélevés sur des individus en phase mâle.

Série 8 : $N + T_f$

Animaux intacts (N) subissant une injection hebdomadaire d'extrait de tentacules prélevés sur des individus en phase femelle (+ T_f) et équivalant à deux tentacules oculaires, jusqu'à observation (série témoin par rapport à la série 9).

Série 9 : $-T + T_f$

Animaux ayant subi une tentaculectomie dès l'éclosion ($-T$) et recevant, toutes les semaines, en dose équivalente à celle de la série 8, un extrait tentaculaire "femelle" (+ T_f), jusqu'au prélèvement de la glande génitale.

Les résultats obtenus à la suite de ces cinq séries (5 à 9) ont été publiés (WATTEZ, 1975). Ils nous ont montré la nécessité de procéder à la réalisation d'autres groupes expérimentaux car ces séries ne nous informaient pas sur le rôle des tentacules en phase mâle. A cette fin, ont donc été réalisées les expériences complémentaires, à savoir :

- animaux privés de tentacules oculaires à l'éclosion et subissant des injections répétées (toutes les semaines) d'extraits de tentacules prélevés sur des individus en phase mâle mature (stade 4a du cycle génital), à une dose correspondant à deux tentacules.

- animaux tentaculectomisés à la naissance et recevant hebdomadairement une injection d'extrait de tentacules prélevés sur des animaux juvéniles (stade 2 du cycle génital) à une dose correspondant à deux tentacules.

Dans le premier cas (injections d'extraits de tentacules "mâles"), il était alors possible d'évaluer l'éventuel effet du tentacule en phase mâle sur la différenciation de la lignée femelle.

Dans le second cas (injections d'extraits tentaculaires "juvéniles"), en plus de l'effet propre du tentacule juvénile, la manipulation permettait d'étudier l'évolution de la gonade en phase mâle, en présence d'extraits de tentacules "juvéniles".

Cinq séries ont été réalisées, les deux premières (10 et 11) correspondant à des groupes témoins pour les séries 12, 13 et 14 (tableau III).

L'expérimentation comprend les groupes suivants :

Séries 10 et 11 : $N + Chia$ et $-T + Chia$

Animaux normaux (N) [série 10 : $N + Chia$] ou détentaculés ($-T$) à l'éclosion [série 11 : $-T + Chia$] recevant, toutes les semaines jusqu'au sacrifice de l'opéré, une injection de solution physiologique de CHIARANDINI (+ $Chia$).

Série 12 : $-T + Th$

Animaux détentaculés dès l'éclosion ($-T$) recevant, hebdomadairement jusqu'à fixation, une dose d'extrait tentaculaire (+ Th) équivalant à deux tentacules. La nature de l'extrait injecté varie qualitativement suivant l'âge de l'animal. Pendant le premier mois de la vie, il est de nature "infantile". Ensuite il est "juvénile" puis "mâle" (en cas de fixation de l'opéré à un âge avancé : dix mois).

Série 13 : $-T + Tj$

Animaux tentaculectomisés dès l'éclosion ($-T$) et recevant une injection hebdomadaire d'extrait de tentacules prélevés sur des individus se trouvant en phase juvénile de leur développement (+ Tj), en dose équivalant à deux tentacules oculaires, ceci jusqu'à observation.

Série 14 : $-T + T\sigma$

Animaux détentaculés dès la naissance ($-T$) et subissant toutes les semaines une injection d'extrait tentaculaire "mâle" (+ $T\sigma$) (obtenu à partir de tentacules prélevés sur des animaux mâles matures) à une dose équivalant à deux tentacules oculaires.

B - RESULTATS

1 - Etude de la régénération germinale chez des animaux privés ou non de leurs tentacules oculaires et subissant des injections d'extraits tentaculaires ou de solution physiologique (séries 1 à 4)

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication (WATTEZ, 1975).

Le tableau IV donne un aperçu chiffré de l'ovogenèse dans les séries d'opérés. Seuls y sont figurés les cas d'obtention de régénérats normaux. Nous avons éliminé les cas de régénérats abortifs dont l'évolution, après un délai de six mois, n'a pas dépassé le stade du nodule cicatriciel. LAVIOLETTE (1954a), chez *Arion rufus*, attribue "l'incapacité qu'ont de tels individus à régénérer une gonade à une déficience physiologique ou à un choc opératoire particulièrement mal supporté".

Les fixations ont été effectuées six mois après l'opération, autrement dit lorsque la gonade régénérée présente des cellules germinales.

TABLEAU IV

EVOLUTION DE L'OVOGENESE DANS LA GONADE NEOFORMEE D'INDIVIDUS CASTRES (C) ET DE CASTRATS DETENTACULES (CD) AYANT SUBI DIVERSES INJECTIONS* (TEMPS ECOULE ENTRE OPERATION ET FIXATION : 6 MOIS).

Evaluation de l'ovogenèse	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4
	<i>C + Chia</i>	<i>CD + Chia</i>	<i>C + Tj</i>	<i>CD + Tj</i>
N_0	$427 \pm 55^{\text{a***}}$ (14) ^{**}	$1306 \pm 162^{\text{b}}$ (12)	$448 \pm 45^{\text{a}}$ (12)	$632 \pm 105^{\text{c}}$ (11)
\varnothing_0 max. (en μm)	70	90	70	80

N_0 : nombre total d'ovocytes contenus dans la glande hermaphrodite.

\varnothing_0 max : diamètre ovocytaire maximal.

* *Chia* : solution physiologique de CHIARANDINI ; *Tj* : extrait préparé à partir de tentacules prélevés sur des animaux juvéniles.

** Entre parenthèses est indiqué le nombre de régénérats normaux fixés et observés sur lequel ont été établies les moyennes.

*** Les séries marquées d'une même lettre ne diffèrent pas de façon significative.



Séries 1 et 2 : C + Chia et CD + Chia

L'injection hebdomadaire de solution physiologique en volume équivalent à celui des extraits tentaculaires ne perturbe en rien l'évolution de la gonade des opérés. En effet, l'étude histologique révèle dans la gonade néoformée des castrats simples la présence d'acini mixtes correspondant à un aspect typique de phase juvénile avancée, avec dans le cas général la présence d'un à deux ovocytes par acinus (Pl. X, fig. a). Par contre, dans celle régénérée après tentaculectomie (Pl. X, fig. b), on observe l'apparition d'une très nette poussée ovocytaire : les acini renferment un nombre important d'ovocytes [la comparaison du nombre total d'ovocytes contenus dans les régénérats de cet âge avec celui obtenu après comptage dans la gonade néoformée des castrats simples permet d'établir une nette différence entre les deux séries d'opérés (tableau IV)] et quelques uns sont même presque totalement féminisés (Pl. X, fig. c).

Ceci confirme les résultats obtenus précédemment à la suite de castrations accompagnées ou non de tentaculectomies et non suivies d'injections de liquide physiologique (WATTEZ, 1973) ; il semble bien que la privation des tentacules oculaires exerce un effet quantitatif sur le déroulement de l'ovogenèse dans la gonade néoformée.

Séries 3 et 4 : C + Tj et CD + Tj

Les comptages ovocytaires effectués chez les castrats simples recevant hebdomadairement de l'extrait de tentacules prélevés en phase juvénile (tableau IV) montrent que de telles injections n'influent pas sur l'évolution de la lignée femelle (différence non significative entre les moyennes des nombres d'ovocytes répertoriés dans la glande génitale des castrats recevant de la solution physiologique et dans l'ovotestis des limaces castrées recevant de l'extrait tentaculaire). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la dose injectée dépasse le seuil efficace.

Par contre, chez les animaux préalablement tentaculectomisés, où l'extrait tentaculaire injecté est destiné à compenser la tentaculectomie, on constate que cet extrait est actif, la poussée ovocytaire induite par la détentaculation se trouvant alors fortement inhibée par les injections répétées d'extraits tentaculaires (Pl. X, fig. d) ; la différence entre les nombres moyens d'ovocytes répertoriés dans la gonade des castrats détentaculés ayant subi des injections de solution physiologique et dans celle des castrés tentaculectomisés ayant reçu des injections d'extraits tentaculaires est en effet significative (tableau IV). Néanmoins, il convient de remarquer que le nombre d'ovocytes répertorié dans la gonade des castrats détentaculés ayant

TABLEAU V

EVOLUTION DE LA GAMETOGENESE. APRES INJECTIONS REPETEES DE SOLUTION PHYSIOLOGIQUE DE CHIARANDINI (*Chia*) OU D'EXTRAITS DE TENTACULES SOIT HOMOLOGUES (*Th*), SOIT PRELEVES SUR DES INDIVIDUS EN PHASE FEMELLE (*Tf*) A DES ANIMAUX NORMAUX (*N*) OU TENTACULECTOMISES A L'ECLOSION (*-T*).

Age à la fixation (mois)	Série 5		Série 6		Série 7		Série 8		Série 9	
	<i>N</i> + <i>Chia</i>		<i>-T</i> + <i>Chia</i>		<i>-T</i> + <i>Th</i>		<i>N</i> + <i>Tf</i>		<i>-T</i> + <i>Tf</i>	
	<i>N_o</i>	Catégories cellulaires répertoriées	<i>N_o</i>	Catégories cellulaires répertoriées	<i>N_o</i>	Catégories cellulaires répertoriées	<i>N_o</i>	Catégories cellulaires répertoriées	<i>N_o</i>	Catégories cellulaires répertoriées
5	512 ± 40 ^{a**} (15)	- spg - ovog - ovoc (60 µm)	1423 ± 73 ^a (12)	- spg - ovog - ovoc (70 µm)	682 ± 33 ^c (9)	- spg - ovog - ovoc (70 µm)	453 ± 36 ^a (8)	- spg - ovog - ovoc (60 µm)	1356 ± 34 ^b (3)	- spg - ovog - ovoc (70 µm)
10	430 ± 83 ^{d***} (15)	- spc - spc - spz - ovoc (90 µm)	1502 ± 64 ^e (14)	- spg - ovoc (110 µm)	547 ± 41 ^d (10)	- spc - ovoc (100 µm) <u>ou</u> - spc - spc - spz - ovoc (100 µm)	541 ± 89 ^d (5)	- spc - spc - spz - ovoc (90 µm)	1372 ± 123 ^a (6)	- spg - ovoc (110 µm)

TABLEAU VI

EVOLUTION DE LA GAMETOGENESE. APRES INJECTIONS REPETEES DE SOLUTION PHYSIOLOGIQUE DE CHIARANDINI (*Chia*) OU D'EXTRAITS DE TENTACULES SOIT HOMOLOGUES (*Th*) SOIT PRELEVES SUR DES INDIVIDUS EN PHASE JUVENILE (*Tj*) OU EN PHASE MALE (*Tm*) A DES ANIMAUX NORMAUX (*N*) OU TENTACULECTOMISES A L'ECLOSION (*-T*).

Age à la fixation (mois)	Série 10		Série 11		Série 12		Série 13		Série 14	
	<i>N</i> + <i>Chia</i>		<i>-T</i> + <i>Chia</i>		<i>-T</i> + <i>Th</i>		<i>-T</i> + <i>Tj</i>		<i>-T</i> + <i>Tm</i>	
	<i>N_o</i>	Catégories cellulaires répertoriées	<i>N_o</i>	Catégories cellulaires répertoriées	<i>N_o</i>	Catégories cellulaires répertoriées	<i>N_o</i>	Catégories cellulaires répertoriées	<i>N_o</i>	Catégories cellulaires répertoriées
5	478 ± 52 ^{a**} (10)	- spg - ovog - ovoc (80 µm)	1336 ± 37 ^b (15)	- spg - ovog - ovoc (70 µm)	703 ± 37 ^c (7)	- spg - ovog - ovoc (70 µm)	727 ± 43 ^c (9)	- spg - ovog - ovoc (70 µm)	929 ± 63 ^d (11)	- spg - ovog - ovoc (70 µm)
10	429 ± 44 ^{a***} (12)	- spc - spc - spz - ovoc (90 µm)	1379 ± 102 ^f (13)	- spg - ovog - ovoc (110 µm)	512 ± 93 ^a (9)	- spc - ovoc (100 µm) (3 cas/9) <u>ou</u> - spc - spc - spz - ovoc (100 µm) (6 cas/9)	463 ± 62 ^a (9)	- spc - ovoc (100 µm) (2 cas/9) <u>ou</u> - spc - spc - spz - ovoc (100 µm) (7 cas/9)	823 ± 54 ^a (12)	- spc - ovoc (100 µm) (3 cas/12) <u>ou</u> - spc - spc - spz - ovoc (100 µm) (9 cas/12)

N_o : nombre total d'ovocytes contenus dans la glande hermaphrodite.

spg : spermatogonie ; spc : spermatocytes ; spc : spermatozoaires ; spz : spermatozoïdes.

ovog : ovogonie ; ovoc : ovocytes (entre parenthèses est figuré le diamètre ovocyttaire maximal).

* Entre parenthèses : nombre d'animaux fixés dont les gonades ont été examinées.

** et *** Les séries marquées d'une même lettre ne diffèrent pas de façon significative.



reçu de l'extrait tentaculaire est encore significativement supérieur à celui enregistré dans l'ovotestis des castrats simples de la série témoin (série 1) (tableau IV). En conséquence, l'extrait injecté ne corrige pas totalement l'effet produit par la tentaculectomie.

2 - Etude expérimentale de la différenciation génitale chez des animaux normaux ou tentaculectomisés à l'éclosion, recevant des injections répétées d'extraits tentaculaires ou de solution physiologique (séries 5 à 14)

Les résultats ont été reportés dans les tableaux V et VI et les figures 5 et 6.

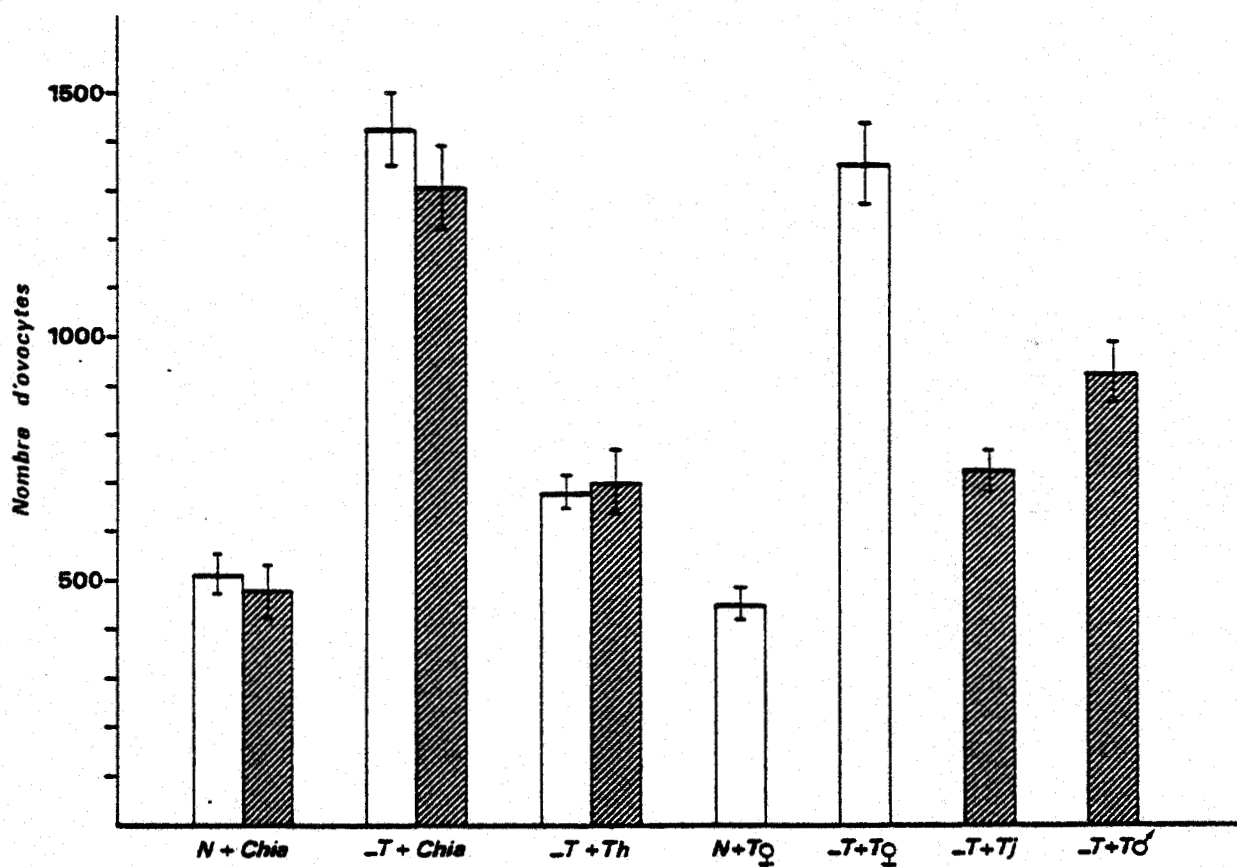


Figure 5 - Nombre moyen d'ovocytes enregistré dans la glande hermaphrodite de limaces âgées de six mois normales (N) ou tentaculectomisées (-T) ayant subi diverses injections*.

* Chia : solution physiologique de CHIARANDINI.
 Th : extraits tentaculaires homologues.
 T♀, Tj et T♂ : extraits tentaculaires préparés à partir d'animaux en phase femelle (T♀) ou juvénile (Tj) ou mâle mature (T♂).
 □ séries 5 à 9 (effectuées en 1973-74).
 ▨ séries 10 à 14 (effectuées en 1974-75).



a) Fixations à l'âge de six mois

Séries 5 et 6 : $N + Chia$ et $-T + Chia$ (séries témoins)

L'injection de solution physiologique n'influe pas sur le développement de la gonade. En effet, le stade histologique observé dans la glande génitale des animaux normaux non opérés est caractéristique d'une phase juvénile (Pl. XI, fig. a).

Par contre, les individus ayant subi une tentaculectomie dès l'éclosion montrent dans leur ovotestis une très nette poussée femelle (Pl. XI, fig. b). Il n'est pas rare d'y trouver des acini renfermant quatre à cinq ovocytes (Pl. XI, fig. c), la moyenne chez les limaces non opérées étant d'un à deux ovocytes par acinus. Les comptages ovocytaires effectués dans ces deux groupes d'animaux confirment cette différence (tableau V et figure 5).

Ces séries rappellent donc les observations précédemment effectuées (WATTEZ et DURCHON, 1972) : l'ablation des tentacules oculaires provoque une augmentation du nombre d'ovocytes dans l'ovotestis des opérés.

Série 7 : $-T + Th$

Afin de se rapprocher le plus possible des conditions normales, des individus détentaculés à l'éclosion ont subi durant le premier mois de leur vie des injections d'extraits de tentacules prélevés sur des individus infantiles puis au cours des cinq mois suivants, une injection hebdomadaire d'extrait tentaculaire "juvénile". Il a ainsi été fait appel à des extraits homologues. On constate, après examen histologique (Pl. XI, fig. d) et comptages ovocytaires (tableau V et figure 5) que ces injections continues corrigent l'effet provoqué par la suppression de l'inhibiteur tentaculaire (différence significative entre les séries 6 et 7 pour le dénombrement ovocytaires). Néanmoins, comme dans le cas d'injections répétées à des castrats détentaculés (séries 3 et 4), le nombre moyen d'ovocytes observés dans la gonade est encore supérieur à celui répertorié dans l'ovotestis des témoins non opérés (série 5).

Séries 8 et 9 : $N + T\phi$ et $-T + T\phi$

L'injection d'extraits de tentacules oculaires prélevés sur des limaces en phase femelle est inefficace ; l'examen histologique de l'ovotestis et les comptages ovocytaires effectués (tableau V et figure 5) ne révèlent pas de différence entre les animaux normaux ayant reçu de l'extrait tentaculaire (série 8) et les témoins de la série 5, ni entre les limaces détentaculées ayant subi des injections d'extrait tentaculaire (série 9) et les témoins de la série 6.

Séries 10 et 11 : $N + Chia$ et $-T + Chia$ (séries témoins)

Les résultats relatifs à ces deux groupes confirment ceux obtenus précédemment (séries 5 et 6) : le comptage des ovocytes révèle une nette différence en faveur de la glande génitale des détentaculés (tableau VI et figure 5).

Série 12 : $-T + Th$

Comme dans le cas de la série 7, les injections répétées d'extraits tentaculaires corrigent l'effet produit par la tentaculectomie (tableau VI et figure 5).

Série 13 : $-T + Tj$

L'examen histologique de la gonade d'un animal ayant subi l'ablation des tentacules oculaires à l'éclosion et reçu corrélativement une injection hebdomadaire d'extrait de tentacules prélevés sur des limaces en phase juvénile, révèle que l'ovotestis présente l'aspect d'un stade juvénile (Pl. XI, fig. e) ; le nombre d'ovocytes répertoriés dans cette glande génitale (tableau VI et figure 5) est très proche de celui enregistré pour la glande hermaphrodite des animaux de la série 12 qui ont reçu successivement des extraits "infantiles" puis "juvéniles" (différence non significative entre les moyennes des nombres d'ovocytes enregistrés dans les gonades des séries 12 et 13). De plus, le nombre d'ovocytes observés dans l'ovotestis des limaces de la série 13 est très nettement inférieur à celui trouvé dans la glande génitale des limaces détentaculées ayant reçu de la solution physiologique (série 11). Ce résultat démontre donc le haut pouvoir inhibiteur du tentacule en phase juvénile.

Série 14 : $-T + T\sigma^7$

L'examen de l'ovotestis d'une limace ayant subi une tentaculectomie à la naissance et reçu une injection hebdomadaire d'extrait de tentacules prélevés au stade 4a (phase mâle mature) permet de déceler la présence d'ovocytes et de spermatogonies, caractéristique d'un aspect de stade juvénile. Néanmoins, il convient de remarquer que dans plusieurs acini la poussée femelle induite par la détentaculation subsiste (Pl. XI, fig. f) ce qui se traduit dans les comptages ovocytaires (tableau VI et figure 5) par un nombre d'ovocytes nettement supérieur à celui trouvé chez les animaux normaux (série 10) et chez les limaces ayant reçu de l'extrait "juvénile" (série 13) mais cependant toujours très inférieur à celui enregistré chez les détentaculés ayant subi des injections de liquide physiologique (série 11).

Ainsi, il semble donc bien que le tentacule oculaire conserve en phase mâle mature son pouvoir inhibiteur sur la différenciation

de la lignée femelle mais que celui-ci est inférieur à celui qu'il possédait en phase juvénile ; on constate en effet, en comparant les moyennes des nombres d'ovocytes contenus dans les gonades, que les valeurs obtenues dans les séries 14 et 12 sont significativement différentes, ce qui n'est pas le cas pour les séries 13 et 12 (tableau VI).

b) Fixations à l'âge de dix mois

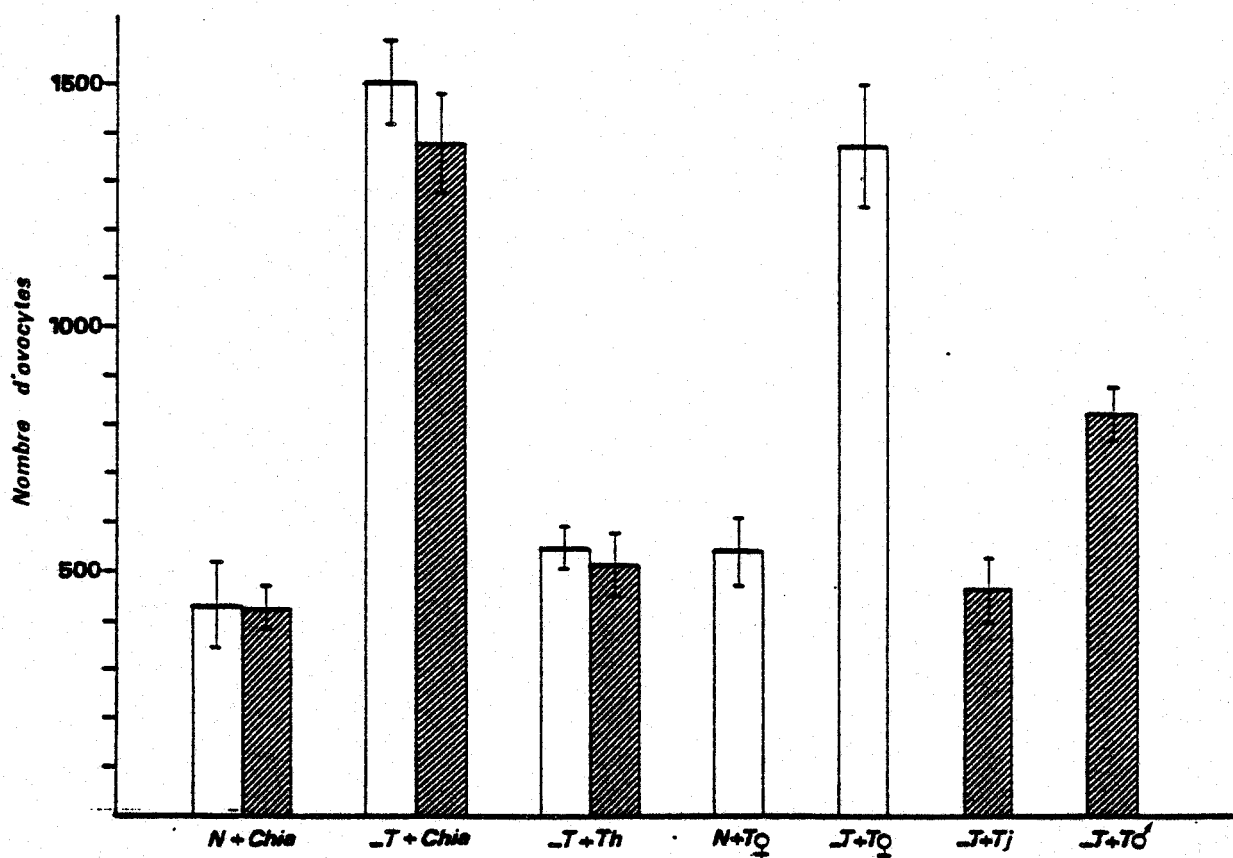


Figure 6 - Nombre moyen d'ovocytes enregistré dans la glande hermaphrodite de limaces, âgées de dix mois, normales (N) ou tentaculectomisées (-T) ayant subi diverses injections*.

* Chia : solution physiologique de CHIARANDINI.

Th : extraits tentaculaires homologues.

Tq, Tj et Tσ : extraits tentaculaires préparés à partir d'animaux en phase femelle (Tq) ou juvénile (Tj) ou mâle mature (Tσ).



séries 5 à 9 (effectuées en 1973-74).

séries 10 à 14 (effectuées en 1974-75).

Séries 5 et 6 : N + Chia et -T + Chia

De tels individus, qui serviront de référence pour interpréter les résultats en comparant l'état histologique de leur glande génitale à celui d'animaux détentaculés recevant de l'extrait tentaculaire, révèlent

l'inefficacité des injections de solution physiologique (voir tableau V et figure 6).

En effet, les limaces non opérées sont au stade 4b, leur ovotestis renfermant tous les stades de la lignée mâle et notamment des spermatozoïdes (Pl. XII, fig. a). En revanche, la gonade des opérés apparaît nettement féminisée (Pl. XII, fig. b), ce qui se traduit par une ovogenèse quantitativement très importante (tableau V) ; la lignée mâle n'y est représentée que par des spermatogonies, stade auquel la spermatogenèse semble bloquée.

Ces résultats confirment ceux obtenus dans de précédents travaux (WATTEZ et DURCHON, 1972) : l'ablation des tentacules pratiquée à l'éclosion semble lever une inhibition de l'ovogenèse et déterminer une féminisation de la gonade en cours de différenciation.

Série 7 : $-T + Th$

Ces animaux ont reçu une injection hebdomadaire d'extrait tentaculaire homologue dont la nature a donc varié en cours d'expérimentation à savoir : "infantile" durant le premier mois de la vie, "juvénile" jusqu'à l'âge de huit mois, "mâle" du huitième au dixième mois.

Les dix limaces fixées présentent des variations individuelles qui se traduisent par la possibilité d'obtention de deux types de gonades : chez trois opérés, l'ovotestis renferme de très nombreux spermatozytes et des ovocytes (Pl. XII, fig. c) ; les sept autres montrent (Pl. XII, fig. d) un aspect typique de stade 4b, avec présence dans leur gonade de spermatozoïdes, ce qui correspond à ce qu'on observe chez les témoins non opérés (Pl. XII, fig. a).

L'injection de tels extraits tentaculaires se révèle donc très efficace puisque la comparaison des nombres moyens d'ovocytes observés dans l'ovotestis montre que les séries 5 et 7 ne diffèrent pas de façon significative (tableau V et figure 6).

Séries 8 et 9 : $N + T\phi$ et $-T + T\phi$

Comme on l'avait constaté après les fixations effectuées à l'âge de six mois, les résultats fournis par l'expérimentation consistant en injections d'extraits de tentacules oculaires prélevés sur des animaux en phase femelle sont à rapprocher de ceux des séries 5 et 6 (tableau V et figure 6). Ils semblent indiquer que le tentacule est inefficace en phase femelle.

Séries 10 et 11 : $N + Chia$ et $-T + Chia$

L'analyse de ces deux séries témoins (tableau VI et figure 6) fournit des résultats comparables à ceux apportés par les séries 5 et 6 (tableau V et figure 6).

Série 12 : $-T + Th$

Comme dans le cas de la série 7 (tableau V et figure 6), les injections répétées d'extraits tentaculaires homologues annulent les effets produits par l'ablation des tentacules (tableau VI et figure 6).

Série 13 : $-T + Tj$

L'examen histologique de l'ovotestis révèle que sept opérés sont au stade 4 (Pl. XII, fig. e) et que les deux autres possèdent des spermatocytes et des ovocytes. Le pouvoir inhibiteur du tentacule "juvénile" sur la différenciation de la lignée femelle se confirme très nettement. En effet, les limaces tentaculectomisées à l'éclosion ayant reçu hebdomadairement pendant dix mois des extraits tentaculaires de type uniquement "juvénile" possèdent une glande génitale qui renferme un nombre d'ovocytes très inférieur à celui des animaux détentaculés ayant subi des injections de solution physiologique (série 11) (tableau VI et figure 6).

Série 14 : $-T + T\sigma$

Neuf opérés sur douze (Pl. XII, fig. f) se trouvent au stade 4b de leur cycle génital (spermatocytes - spermatides - spermatozoïdes - ovocytes), les trois autres renfermant dans leur gonade des spermatocytes et des ovocytes. La lignée femelle est représentée par des ovocytes (tableau VI et figure 6) plus nombreux dans ce cas que dans celui des séries 12 (injections d'extraits homologues) et 13 (injections d'extraits juvéniles) où la poussée ovocytaire induite par détentaculation est totalement corrigée par l'injection d'extrait tentaculaire. Cependant, le nombre d'ovocytes est encore très nettement inférieur à celui enregistré dans la glande génitale des limaces de la série 11 (tentaculectomie suivie d'injections de liquide physiologique). Le tentacule oculaire est donc encore efficace en phase mâle mature mais son pouvoir inhibiteur sur la différenciation de la lignée femelle est inférieur à celui des tentacules "juvéniles".

C - DISCUSSION et CONCLUSION

Plusieurs auteurs ont réalisé des ablations de tentacules oculaires chez les Gastéropodes Pulmonés afin d'observer l'éventuel effet de la privation de ces organes sur l'évolution de la gamétogenèse dans la gonade des individus opérés.

Chez les Stylommatophores, de telles opérations ont été pratiquées chez les Arionidés, les Hélicidés, les Achatinidés et les Soléolifères.

Chez les Arionidés *Arion ater*, *Arion subfuscus* et *Milax sp.*, PELLUET et LANE (1961) puis PELLUET (1964) ont constaté après trois à huit semaines d'expérimentation une augmentation du nombre d'ovocytes dans la glande génitale des animaux tentaculectomisés. De plus, des injections d'extraits tentaculaires, dont le stade génital du donneur n'a pas été précisé, ont provoqué chez les opérés un rétablissement du nombre normal d'ovocytes dans l'ovotestis des limaces ainsi traitées.

GOTTFRIED et DORFMAN (1970) ont observé, à la suite de tentaculectomies effectuées sur des lots d'*Ariolimax californicus*, un développement accéléré de la lignée mâle (en vingt-et-un jours) chez des animaux immatures. Ces auteurs attribuent à une différence d'espèce l'opposition de leurs résultats avec ceux de PELLUET et LANE et pensent que le tentacule oculaire serait un régulateur du développement de la gonade.

Chez les Hélicidés, SANCHEZ et SABLIER (1962) après l'ablation des quatre tentacules sensoriels d'*Helix aspersa* constatent que les processus de spermatogenèse et d'ovogenèse se déroulent normalement mais que les divisions goniales sont moins nombreuses et les faisceaux de spermatozoïdes moins denses. De plus, les ovocytes 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.

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

KUHLMANN et NOLTE (1967), à la suite de détentaculations concluent à leur inefficacité sur la gamétogenèse d'*Helix pomatia* après quatre mois d'expérimentation. Plus récemment, BIERBAUER (1977, 1978a, 1978b) a effectué sur des exemplaires d'*Helix pomatia* des ablations de tentacules oculaires à différentes étapes du cycle vital : au cours de l'hibernation, durant la période de réveil en été ou avant la ponte. Dans tous les cas, il a constaté, une à deux semaines après l'opération, une augmentation du nombre d'ovocytes dans l'ovotestis des escargots détentaculés. De plus, des injections d'homogénats de tentacules oculaires à des animaux privés de ces organes provoquent un retour proche de la normale en ce qui concerne l'ovogenèse de ces individus et une stimulation de la spermiogenèse.

Chez l'escargot géant Achatinidé *Achatina fulica*, BERRY et CHAN (1968) obtiennent un accroissement du nombre des gros ovocytes en pratiquant l'amputation des tentacules sur des animaux d'âge déjà avancé.

Chez les Soléolifères, RENZONI (1969) en procédant à des tentaculectomies sur des limaces sud-américaines de l'espèce *Vaginulus borellianus* âgées de dix jours n'obtient au bout de six mois aucune différence relative au dénombrement ovocytaire chez les opérés. Par contre, NAGABHUSHANAM et KULKARNI (1971) provoquent une nette augmentation du nombre d'ovocytes en détentaculant des individus de l'espèce *Laevicaulis alte* et obtiennent à la suite d'injections d'extraits tentaculaires un rétablissement du nombre normal d'ovocytes.

A la suite de ces travaux, il convient de signaler que les tentaculectomies ont été pratiquées à diverses époques du cycle annuel mais jamais à l'éclosion, ce qui peut expliquer la variabilité des observations effectuées.

Nos résultats relatifs à l'influence des tentacules oculaires montrent que :

1°- Leur ablation à l'éclosion provoque un accroissement du nombre d'ovocytes dans l'ovotestis. Il en est de même lorsque la détentaculation est pratiquée corrélativement à une castration ; la gonade régénérée présente alors un plus grand nombre d'ovocytes que celle des témoins. Ainsi, la tentaculectomie paraît lever une inhibition de l'ovogenèse et déterminer une féminisation de l'ovotestis en cours de croissance ou de régénération. L'effet du tentacule sur la lignée femelle est donc essentiellement quantitatif.

De plus, l'ablation des tentacules oculaires à la naissance entraîne chez les individus âgés de dix mois, un blocage de la spermatogenèse.

2°- Les injections répétées d'extraits tentaculaires, préparés à partir d'organes prélevés sur des limaces d'âges différents, et effectuées sur des animaux tentaculectomisés à la naissance ou sur des castrats détentaculés, ont permis de préciser l'activité des tentacules oculaires au cours du cycle vital. Les résultats obtenus laissent à penser que le pouvoir inhibiteur du tentacule oculaire sur la différenciation de la lignée femelle décroît au cours de la vie. Très élevé pendant les phases infantile et juvénile, il diminue en phase mâle pour s'annuler en phase femelle.

Ainsi, nos conclusions tirées à la suite d'opérations pratiquées *in vivo* paraissent, pour ce qui est de l'influence des tentacules dans la différenciation de l'ovotestis, étayer l'hypothèse formulée par PELLUET et LANE

selon laquelle le tentacule oculaire des limaces secrèterait une hormone inhibitrice de l'ovogenèse et stimulatrice de la spermatogenèse. Par contre, ils sont en désaccord avec ceux de GOTTFRIED et DORFMAN. En effet, ces auteurs (1969) après avoir isolé de la glande génitale d'*Ariolimax californicus* deux stéroïdes (déhydroépiandrostérone, 11-cétotestostérone) ont interprété 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. Nous reviendrons sur ces données dans la discussion générale.

III - EVOLUTION DE LA GONADE EN CROISSANCE OU EN COURS DE REGENERATION CHEZ DES ANIMAUX TENTACULECTOMISES OU NON ET RECEVANT DES INJECTIONS REPETEES D'EXTRAITS CEREBRAUX, TOTAUX OU PARTIELS

Si chez les Gastéropodes, les ablations de ganglions nerveux sont réalisables chez certaines espèces de Prosobranches (*Crépidule*, *Littorine*), elles constituent au contraire des opérations très délicates chez les autres sous-classes de Gastéropodes et plus particulièrement chez les Pulmonés.

Chez *Crepidula fornicata* (LUBET et STREIFF, 1969), l'ablation bilatérale des ganglions cérébroïdes entraîne l'arrêt de la spermatogenèse et la dégénérescence des éléments germinaux ce qui se traduit au bout de cinq à six mois par une castration totale. Chez *Patella vulgata* (CHOQUET, 1969), elle provoque un arrêt de la gamétogenèse et l'émission précoce des produits génitaux.

VICENTE (1969), chez l'Opisthobranch *Aplysia rosea*, montre que l'ablation des ganglions cérébroïdes supprime l'accouplement et la ponte.

Chez les Pulmonés, l'ablation des ganglions cérébroïdes n'a été réussie que chez le Basommatophore *Lymnaea stagnalis* par HEKSTRA et LEVER (1960). Les animaux ainsi opérés n'ont plus de ventilation pulmonaire ; ils ne se nourrissent plus et ne pondent plus. Ces chercheurs hollandais pensent que l'ablation des ganglions cérébroïdes est une opération qui perturbe totalement l'animal et que les modifications observées ne sont que la traduction de troubles du métabolisme général.

L'ablation des ganglions cérébroïdes des Pulmonés étant une opération actuellement irréalisable (Stylommatophores) ou incompatible avec les fonctions vitales élémentaires (Basommatophores), des chercheurs ont eu l'idée d'injecter des broyats de cerveaux à des animaux normaux ou privés de leurs tentacules chez différentes espèces de limaces [PELLUET et LANE (1961) ; PELLUET (1964) ; NAGABHUSHANAM et KULKARNI (1971) ; TAKEDA (1977)] ou d'es-

TABLEAU VII

TABLEAU RECAPITULATIF DES SERIES EXPERIMENTALES RELATIVES A L'INJECTION D'EXTRAITS CEREBRAUX TOTAUX OU PARTIELS

Nature de la solution injectée	Type d'opération			
	Castration (C)	Castration + ablation des tentacules oculaires (CD)	— Animaux normaux (N)	Ablation des tentacules oculaires à l'éclosion (-T)
<i>Chia</i> *	Séries 1-7-17 : C + <i>Chia</i>	Séries 2-8-18 : CD + <i>Chia</i>	Séries 23-29 : N + <i>Chia</i>	Séries 24-30 : -T + <i>Chia</i>
<i>Cerv</i> "fin ♂"***	Série 3 : C + <i>Cerv fin ♂</i>	Série 4 : CD + <i>Cerv fin ♂</i>	Série 25 : N + <i>Cerv fin ♂</i>	Série 26 : -T + <i>Cerv fin ♂</i>
<i>Cerv</i> "♀"***	Série 5 : C + <i>Cerv ♀</i>	Série 6 : CD + <i>Cerv ♀</i>	Série 27 : N + <i>Cerv ♀</i>	Série 28 : -T + <i>Cerv ♀</i>
<i>ggC</i> "fin ♂"***	Série 9 : C + <i>ggC fin ♂</i>	Série 13 : CD + <i>ggC fin ♂</i>	Série 31 : N + <i>ggC fin ♂</i>	Série 35 : -T + <i>ggC fin ♂</i>
<i>ggC</i> "♀"***	Série 10 : C + <i>ggC ♀</i>	Série 14 : CD + <i>ggC ♀</i>	Série 32 : N + <i>ggC ♀</i>	Série 36 : -T + <i>ggC ♀</i>
<i>mso</i> "fin ♂"***	Série 11 : C + <i>mso fin ♂</i>	Série 15 : CD + <i>mso fin ♂</i>	Série 33 : N + <i>mso fin ♂</i>	Série 37 : -T + <i>mso fin ♂</i>
<i>mso</i> "♀"***	Série 12 : C + <i>mso ♀</i>	Série 16 : CD + <i>mso ♀</i>	Série 34 : N + <i>mso ♀</i>	Série 38 : -T + <i>mso ♀</i>
<i>ggC</i> "i"***	Série 19 : C + <i>ggC i</i>	Série 20 : CD + <i>ggC i</i>	—	—
<i>ggC</i> "j"***	Série 21 : C + <i>ggC j</i>	Série 22 : CD + <i>ggC j</i>	—	—

* Solution physiologique de CHIARANDINI

** Extrait préparé à partir de :

Cerv : carveaux

ggC : ganglions cérébroïdes

mso : masses ganglionnaires

sous-oesophagiennes

} prélevés sur des animaux

i : en phase infantile

j : en phase juvénile

fin ♂ : en fin de phase mâle

♀ : en phase femelle



cargots [BIERBAUER et MOLNAR (1972 b) ; BIERBAUER et FINALY (1973) ; BIERBAUER et FEHER (1976)]. Pour préciser l'influence du cerveau sur le déroulement de la gamétogenèse d'*Arion subfuscus*, nous avons donc eu recours à des injections d'extraits de cerveaux (partiels ou totaux) de nature diverse (prélevés sur des animaux d'âge variable) dont nous avons recherché l'influence sur des animaux normaux ou détentaculés à la naissance et sur des castrats simples tentaculectomisés ou non.

A - SERIES EXPERIMENTALES

L'expérimentation s'est effectuée en trois étapes, compte-tenu des résultats obtenus et du nombre élevé d'animaux requis pour l'obtention des extraits nécessaires aux différentes séries expérimentales.

Dix types d'extraits ont été préparés :

- à partir de cerveaux prélevés sur des adultes soit en fin de phase mâle de leur cycle génital (présence de spermatozoïdes et de gros ovocytes : stade 4b) soit en phase femelle (uniquement présence d'ovocytes dans la gonade : stade 5) ;

- à partir des ganglions cérébroïdes prélevés sur des limaces se trouvant aux stades suivants : infantile (stade 1), juvénile (animaux âgés de quatre à cinq mois : stade 2), fin de phase mâle (stade 4b), femelle (stade 5) ;

- à partir de masses ganglionnaires sous-oesophagiennes prélevées sur des spécimens en fin de phase mâle (stade 4b) et en phase femelle (stade 5).

L'expérimentation concerne 243 animaux répartis en deux groupes comprenant respectivement vingt-deux et seize séries (tableau VII) :

- animaux castrés détentaculés ou non et subissant des injections hebdomadaires d'extrait ou de solution physiologique de CHIARANDINI (séries témoins) ;

- animaux normaux ou ayant subi une tentaculectomie dès l'éclosion et recevant toutes les semaines une injection d'extrait ou de solution physiologique de CHIARANDINI (séries témoins).

1 - Injections à des castrats (séries 1 à 22)

Les séries 1 à 6 ont été réalisées en 1975-76, 7 à 16 en 1976-77, 17 à 22 en 1977-78. Dans tous les cas, les régénérats sont fixés cinq mois après opération.

Dans un premier temps, nous avons tenté de rechercher si le cerveau des adultes avait un effet sur le déroulement de la gamétogenèse des limaces ce qui nous a conduit à la réalisation des séries 1 à 6.

Séries 1 et 2 : *C + Chia* et *CD + Chia*

Castrats ayant (*CD* : série 2) ou non (*C* : série 1) subi une tentaculectomie et recevant chaque semaine une injection de solution physiologique de CHIARANDINI (+ *Chia*) jusqu'à fixation de la glande hermaphrodite néoformée (séries témoins).

Séries 3 et 4 : *C + Cerv. fin ♂* et *CD + Cerv. fin ♂*

Animaux castrés (*C* : série 3), dans certains cas détentaculés (*CD* : série 4) et subissant une injection hebdomadaire d'extrait cérébral obtenu à partir de limaces en fin de phase mâle de leur cycle gonadique (+ *Cerv. fin ♂*), à une dose équivalente à un cerveau, jusqu'à la fixation des gonades régénérées.

Séries 5 et 6 : *C + Cerv. ♀* et *CD + Cerv. ♀*

Castrats simples (*C* : série 5) ou tentaculectomisés (*CD* : série 6), recevant toutes les semaines une injection d'extrait cérébral préparé à partir d'animaux en phase femelle (+ *Cerv. ♀*) en dose équivalente à un cerveau, jusqu'à fixation de l'ovotestis.

Dans un deuxième temps, nous avons essayé de localiser la partie active du cerveau. A cette fin, ont été réalisées les séries 7 à 16 :

Séries 7 et 8 : *C + Chia* et *CD + Chia*

Séries témoins (voir séries 1 et 2).

Séries 9, 10, 11, 12 : *C + ggC fin ♂*, *C + ggC ♀*
C + mso fin ♂, *C + mso ♀*

Castrats (*C*) recevant jusqu'au prélèvement du régénérat gonadique des injections hebdomadaires d'extraits préparés à partir :

- soit de ganglions cérébroïdes provenant de limaces en fin de phase mâle (*ggC fin ♂*) : série 9) ou en phase femelle (*ggC ♀* : série 10) [extrait injecté à une dose équivalente à deux ganglions cérébroïdes].

- soit de masses ganglionnaires sous-oesophagiennes prélevées sur des animaux en fin de phase mâle (*mso fin ♂* : série 11) ou en phase femelle (*mso ♀* : série 12) [extrait injecté à une dose équivalente à une masse sous-oesophagienne].

Séries 13, 14, 15, 16 : *CD + ggC fin ♂*, *CD + ggC ♀*
CD + mso fin ♂, *CD + mso ♀*

Limaces castrées, précédemment tentaculectomisées (*CD*) subissant toutes les semaines jusqu'au sacrifice de l'animal une injection d'extrait obtenu à partir :

- soit de ganglions cérébroïdes d'individus en fin de phase mâle (ggC fin σ^7 : série 13) ou en phase femelle (ggC φ : série 14) [injection à une dose équivalente à deux ganglions].

- soit de masses sous-oesophagiennes d'animaux en fin de phase mâle (mso fin σ^7 : série 15) ou en phase femelle (mso φ : série 16) [injection à une dose équivalente à une masse sous-oesophagienne].

Dans un troisième temps, nous avons éprouvé l'activité des ganglions cérébroïdes au cours des stades infantile et juvénile. Ainsi, l'influence de ces ganglions sur le déroulement de la gamétogenèse des limaces a été analysée au cours de la vie.

Les séries 17 à 22 sont relatives à cette expérimentation.

Séries 17 et 18 : $C + Chia$ et $CD + Chia$

Séries témoins (voir séries 1 et 2).

Séries 19 et 20 : $C + ggCi$ et $CD + ggCi$

Animaux castrés ayant (CD : série 20) ou non (C : série 19) subi l'ablation des tentacules oculaires et recevant toutes les semaines une injection d'extrait préparé à partir de ganglions cérébroïdes prélevés sur des limaces infantiles ($ggCi$) [à une dose équivalente à deux ganglions] jusqu'à observation de la gonade régénérée.

Séries 21 et 22 : $C + ggCj$ et $CD + ggCj$

Castrats simples (C : série 21) ou tentaculectomisés (CD : série 22) subissant hebdomadairement une injection d'extrait obtenu à partir de ganglions cérébroïdes d'individus en phase juvénile de leur développement ($+ ggCj$) [à une dose équivalente à deux ganglions] jusqu'au prélèvement de la glande génitale néoformée.

2 - Injections à des animaux normaux ou privés de leurs tentacules à l'éclosion (séries 23 à 38)

Parallèlement aux groupes expérimentaux réalisés sur des castrats, nous avons effectué des séries expérimentales sur des animaux normaux ou tentaculectomisés.

Les séries 23 à 28 datent de 1975-76.

Les séries 29 à 38 ont été conduites en 1976-77.

Les fixations des gonades en différenciation s'effectuent à l'âge de cinq mois.

Séries 23 et 24 : $N + Chia$ et $-T + Chia$

Animaux normaux (N : série 23) ou ayant subi une détenta-

culation (-T : série 24) et recevant toutes les semaines une injection de solution physiologique de CHIARANDINI (+ Chia).

Séries 25, 26, 27, 28 : $N + Cerv. fin \sigma^7$, $-T + Cerv. fin \sigma^7$,
 $N + Cerv. \varphi$, $-T + Cerv. \varphi$

Animaux ayant (-T : séries 26 et 28) ou non (N : séries 25 et 27) été tentaculectomisés à la naissance et subissant hebdomadairement une injection d'extrait cérébral (dont la dose est équivalente à un cerveau) obtenu à partir d'organes prélevés sur des limaces en fin de phase mâle (Cerv. fin σ^7 : séries 25 et 26) ou en phase femelle (Cerv. φ : séries 27 et 28).

Séries 29 et 30 : $N + Chia$ et $-T + Chia$

Séries témoins (voir séries 23 et 24).

Séries 31, 32, 33, 34 : $N + ggC fin \sigma^7$, $N + ggC \varphi$
 $N + mso fin \sigma^7$, $N + mso \varphi$

Animaux normaux (N) subissant toutes les semaines, à une dose correspondant soit à deux ganglions cérébroïdes soit à une masse ganglionnaire sous-oesophagienne, une injection d'extrait de l'un des quatre types suivants :

- extrait préparé à partir de ganglions cérébroïdes prélevés soit sur des animaux en fin de phase mâle ($ggC fin \sigma^7$: série 31), soit sur des animaux en phase femelle ($ggC \varphi$: série 32) ;

- extrait préparé à partir de masses ganglionnaires sous-oesophagiennes prélevées sur des limaces en fin de phase mâle ($mso fin \sigma^7$: série 33) ou en phase femelle ($mso \varphi$: série 34).

Séries 35, 36, 37, 38 : $-T + ggC fin \sigma^7$, $-T + ggC \varphi$
 $-T + mso fin \sigma^7$, $-T + mso \varphi$

Animaux tentaculectomisés dès l'éclosion (-T) et recevant hebdomadairement, à une dose correspondant à deux ganglions cérébroïdes ou à une masse ganglionnaire sous-oesophagienne, une injection d'extrait de l'un des quatre types suivants :

- extrait obtenu à partir de ganglions cérébroïdes de limaces en fin de phase mâle ($ggC fin \sigma^7$: série 35) ou en phase femelle ($ggC \varphi$: série 36) ;

- extrait obtenu à partir de masses ganglionnaires sous-oesophagiennes de limaces en fin de phase mâle ($mso fin \sigma^7$: série 37) ou en phase femelle ($mso \varphi$: série 38).

TABLEAU VIII

EVOLUTION DE LA LIGNEE FEMELLE DANS DES GONADES REGENEREES ET PRELEVEES SUR DES CASTRATS DETENTACULES OU NON ET RECEVANT HEBDOMADAIREMENT DES INJECTIONS DE SOLUTION PHYSIOLOGIQUE OU D'EXTRAITS CEREBRAUX (FIXATION 5 MOIS APRES LA CASTRATION).

Type d'opération		Nature de la solution injectée		
		Séries 1 et 2	Séries 3 et 4	Séries 5 et 6
		<i>Chia</i>	<i>Cerv. "fin ♂"</i>	<i>Cerv. "♀"</i>
Castration (C)	N_o	$476 \pm 71^{a**} (8)^*$	$539 \pm 49^a (9)$	$587 \pm 57^a (10)$
	\varnothing_o max. (en μm)	60	75	75
Castration et détentaculation (CD)	N_o	$1132 \pm 142^{b***} (9)$	$1034 \pm 99^b (7)$	$1213 \pm 121^b (8)$
	\varnothing_o max. (en μm)	70	90	90

Chia : solution physiologique de CHIARANDINI

Cerv. "fin ♂" : extrait cérébral obtenu à partir d'animaux en fin de phase mâle

Cerv. "♀" : extrait cérébral préparé à partir de cerveaux d'animaux en phase femelle

N_o : nombre d'ovocytes contenus dans la glande génitale

\varnothing_o max. : diamètre ovocytaire maximal (ne tient pas compte des ovocytes présentant un diamètre éventuellement supérieur mais retrouvés dans l'ovotestis à une fréquence inférieure à 5 %).

* Entre parenthèses est figuré le nombre de régénérats normaux examinés.

** et *** Les séries marquées d'une même lettre ne diffèrent pas de façon significative.

B - RESULTATS

1 - Etude expérimentale de la régénération germinale chez des animaux castrés privés ou non de leurs tentacules oculaires et subissant des injections répétées de solution physiologique ou d'extraits cérébraux totaux ou partiels obtenus à partir de cerveaux de limaces infantiles, juvéniles ou adultes (séries 1 à 22)

a) Effet d'injections répétées d'extraits cérébraux obtenus à partir de cerveaux prélevés sur des limaces adultes (séries 1 à 6)

Le tableau VIII récapitule les résultats obtenus.

α) Injections de solution physiologique de CHIARANDINI (Séries 1 et 2 : C + Chia et CD + Chia)

Ces séries servent de référence pour interpréter les autres. Dans tous les cas, la glande hermaphrodite régénérée chez un castrat normal (série 1) présente après cinq mois d'évolution l'aspect d'un stade juvénile avec des ovocytes ayant, en majorité, un diamètre compris entre 15 et 60 μm (Pl. XIII, fig. a). Par contre, l'examen histologique de celle régénérée en absence de tentacules (série 2) révèle une nette augmentation du nombre d'ovocytes ainsi qu'un léger accroissement du diamètre maximal (70 μm) des ovocytes (tableau VIII).

β) Injections d'extraits cérébraux (séries 3 à 6)

o Cas des castrats simples :

séries 3 et 5 : C + Cerv. fin ♂ et C + Cerv. ♀

Quel que soit l'extrait injecté (préparé à partir de cerveaux prélevés sur des animaux en fin de phase mâle ou en phase femelle), l'expérience se traduit par l'apparition d'un nombre important d'ovocytes dont le diamètre atteint 75 μm (Pl. XIII, fig. b). Par contre, l'augmentation du nombre total d'ovocytes répertoriés dans la gonade n'est pas significative (tableau VIII)

o Cas des castrats détentaculés :

séries 4 et 6 : CD + Cerv. fin ♂ et CD + Cerv. ♀

Dans les deux cas, le nombre d'ovocytes présents dans la glande génitale est assez proche de celui enregistré dans la gonade des témoins détentaculés (tableau VIII). Par contre, si l'on considère le diamètre des ovocytes, on peut noter que :

- chez les animaux ayant reçu une injection hebdomadaire d'extrait de cerveaux prélevés sur des limaces en fin de phase mâle (série 4), on relève que de nombreux ovocytes ont subi un accroissement notable

de leur diamètre qui peut atteindre 90 μm (Pl. XIII, fig. c), les ovocytes des animaux témoins ne présentant au maximum qu'un diamètre de 70 μm .

- De plus, chez les castrats détentaculés ayant subi toutes les semaines une injection d'extrait cérébral obtenu à partir d'un donneur en phase femelle, on enregistre le même résultat : présence de nombreux gros ovocytes pouvant atteindre un diamètre de 90 μm , accompagnés d'ovocytes à tous les stades de développement, et présence de quelques rares ovocytes atteignant un diamètre de 100 μm .

L'analyse des résultats fournis par ces six séries montre donc que le cerveau des limaces adultes est actif ; il stimule l'accroissement des ovocytes. Par contre, le dénombrement des ovocytes observés dans les gonades néoformées révèle qu'il n'agit pas sur la production d'ovocytes (tableau VIII).

b) Effet d'injections répétées d'extraits préparés à partir de ganglions cérébroïdes ou de masses ganglionnaires sous-oesophagiennes d'animaux adultes (séries 7 à 16)

Les résultats précédemment exposés nous ont conduit à poursuivre l'expérimentation afin de préciser le lieu d'origine de la substance responsable de l'effet stimulateur du cerveau sur l'accroissement des ovocytes.

Très concentré, le cerveau des limaces (voir chapitre III) forme un collier péri-oesophagien constitué par la fusion des neuf ganglions primitifs des Pulmonés en une structure complexe. Ce système nerveux central peut se subdiviser en deux masses ganglionnaires :

- supraoesophagienne, comprenant deux ganglions cérébroïdes réunis par une commissure cérébrale,

- sous-oesophagienne, composée elle-même de deux masses.

Nous avons donc recherché l'influence de quatre types d'extraits :

- préparés à partir de ganglions cérébroïdes prélevés sur des animaux soit en fin de phase mâle soit en phase femelle,

- préparés à partir de masses ganglionnaires sous-oesophagiennes prélevées sur des limaces en fin de phase mâle ou en phase femelle.

Les animaux témoins reçoivent des injections de solution physiologique de CHIARANDINI.

L'ovogenèse a été appréciée qualitativement (se référer à la partie Matériel et Techniques générales) dans les différents lots expérimentaux. Sur les figures 7 et 8 sont représentés les pourcentages moyens obtenus

respectivement pour chaque classe de taille ovocytaire dans les groupes d'opérés.

Les ovotestis des limaces des divers groupes ne présentent pas de différence en ce qui concerne la spermatogenèse : dans tous les cas, la lignée mâle est représentée par des spermatogonies.

α) Injections de solution physiologique de CHIARANDINI
.....
(séries 7 et 8 : C + Chia et CD + Chia)
.....

La gonade néoformée chez un animal castré cinq mois auparavant et possédant ses tentacules présente l'aspect d'un stade juvénile et renferme des ovocytes dont le diamètre maximal atteint le plus souvent 60 μm. Par contre, celle régénérée chez les limaces privées de tentacules possède un nombre d'ovocytes nettement supérieur et contient quelques ovocytes dont le diamètre peut atteindre 70 μm (figures 7 et 8).

β) Injections d'extraits préparés à partir de ganglions
.....
cérébroïdes (séries 9, 10, 13, 14 : C + ggC fin ♂,
.....
C + ggC ♀, CD + ggC fin ♂, CD + ggC ♀)
.....

Quel que soit l'extrait injecté (préparé à partir de ganglions cérébroïdes prélevés sur des animaux en fin de phase mâle ou en phase femelle), l'expérience se traduit par l'apparition dans la gonade d'un pourcentage important d'ovocytes présentant un diamètre compris entre 60 et 75 μm (cas des castrats simples et des castrats détentaculés) et même entre 75 et 90 μm (cas des castrats détentaculés). Ces gros ovocytes sont accompagnés d'autres à tous les stades de développement (figures 7 et 8).

γ) Injections d'extraits préparés à partir de masses
.....
ganglionnaires sous-oesophagiennes (séries 11, 12,
.....
15, 16 : C + mso fin ♂, C + mso ♀, CD + mso fin ♂,
.....
CD + mso ♀)
.....

Si l'on effectue, par rapport aux séries témoins 7 et 8, une comparaison de l'ovogenèse chez ces quatre groupes d'opérés, on constate que les extraits injectés, préparés à partir de masses ganglionnaires sous-oesophagiennes prélevées sur des animaux en fin de phase mâle ou en phase femelle, ne provoquent pas, contrairement aux cas d'injections d'extraits de ganglions cérébroïdes, de variation dans l'évolution de l'ovogenèse. En particulier, on n'enregistre pas l'apparition de nombreux ovocytes de grande taille.

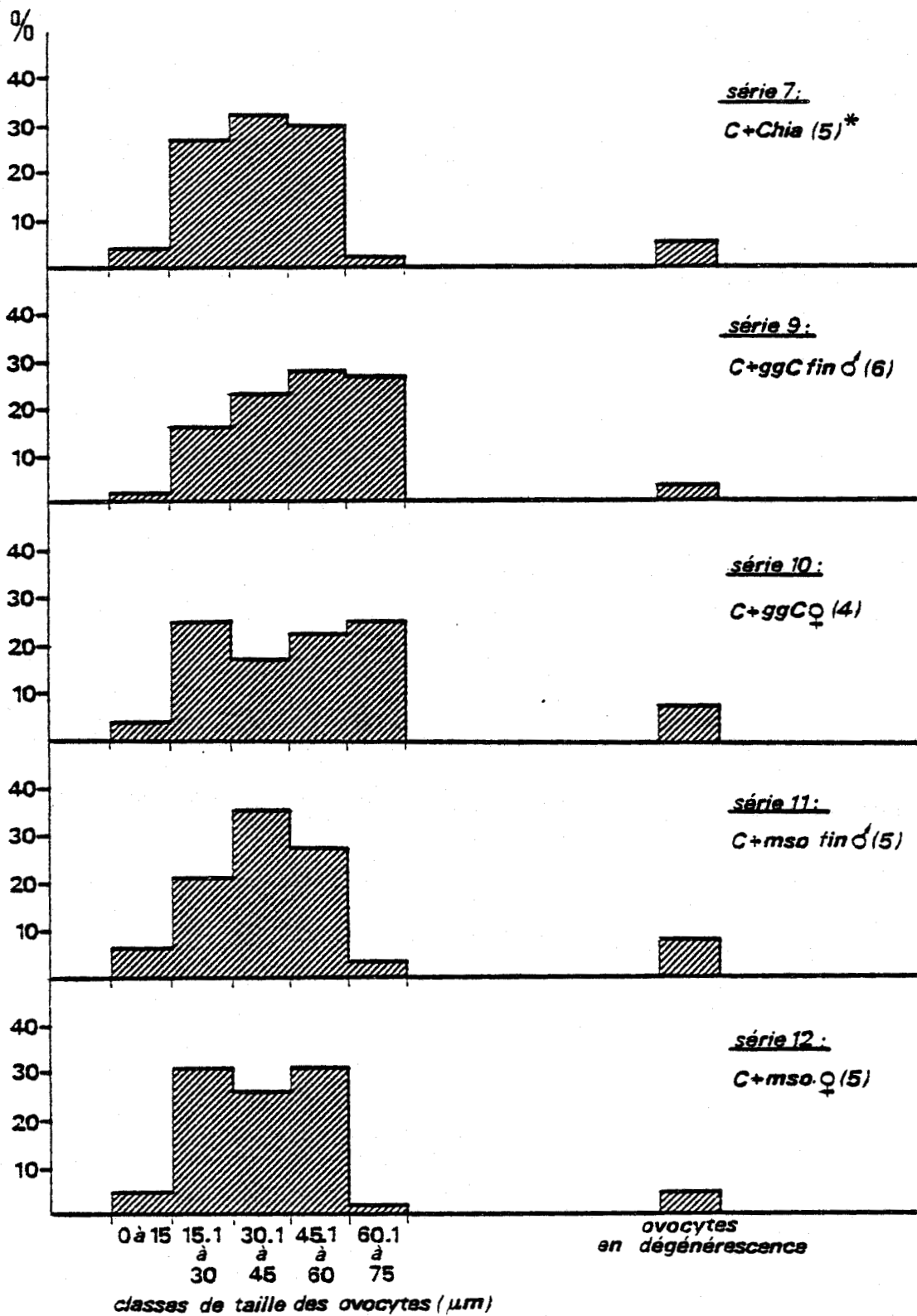


Figure 7 - Pourcentages des différentes classes de taille d'ovocytes dans l'ovotestis régénéré, prélevé cinq mois après opération sur des castrats (C) ayant subi des injections répétées de solution physiologique (Chia) ou d'extraits obtenus soit à partir de ganglions cérébroïdes (ggC) soit à partir de masses ganglionnaires sous-oesophagiennes (mso) d'animaux adultes en fin de phase mâle (fin ♂) ou en phase femelle (♀).

* Entre parenthèses est figuré le nombre de régénérats examinés.



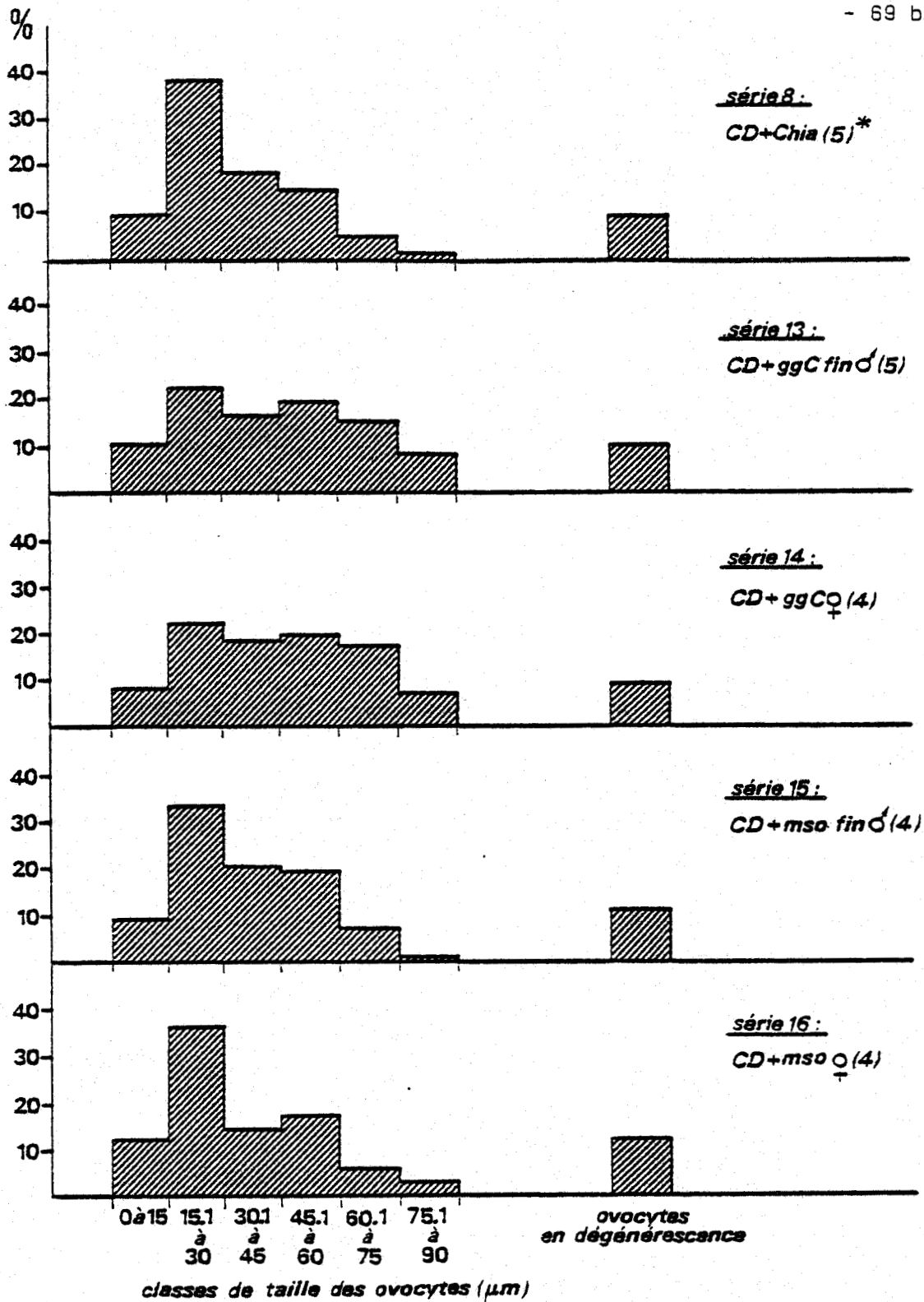


Figure 8 - Pourcentages des différentes classes de taille d'ovocytes dans l'ovotestis régénéré, prélevé cinq mois après opération sur des castrats tentaculectomisés (CD) ayant subi des injections répétées de solution physiologique (Chia) ou d'extraits obtenus soit à partir de ganglions cérébroïdes (ggC) soit à partir de masses ganglionnaires sous-oesophagiennes (mso) d'animaux adultes en fin de phase mâle (fin ♂) ou en phase femelle (♀).

* Entre parenthèses est figuré le nombre de régénérats examinés.

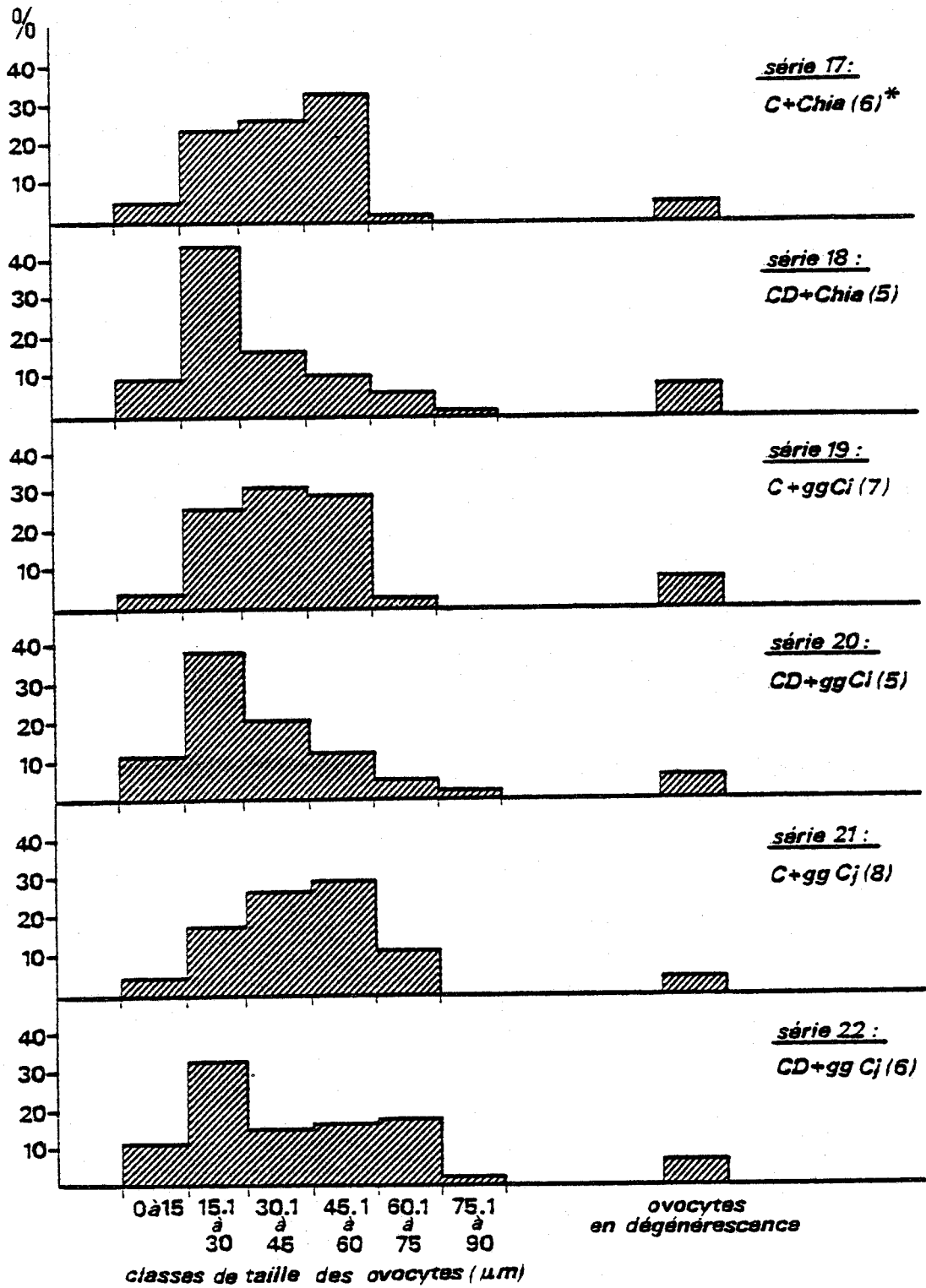


Figure 9 - Pourcentages des différentes classes de taille d'ovocytes dans la gonade régénérée, prélevée cinq mois après opération sur des castrats simples (C) ou tentaculectomisés (CD) ayant subi des injections répétées de solution physiologique (Chia) ou d'extraits obtenus à partir de ganglions cérébroïdes (ggC) d'animaux en phase infantile (i) ou juvénile (j).

* Entre parenthèses est figuré le nombre de régénérats examinés.



En conclusion, l'interprétation des résultats fournis par ces dix séries expérimentales montre que :

- Les ganglions cérébroïdes des adultes (compte-tenu des réserves faites dans la discussion, page 74) représentent le lieu d'origine de la substance responsable de l'effet stimulateur du cerveau sur l'accroissement des ovocytes.

- L'effet des ganglions cérébroïdes des adultes est qualitatif : les injections répétées d'extraits préparés à partir de ces ganglions provoquent l'apparition d'un pourcentage important de gros ovocytes dans la gonade des animaux injectés. Il avait été précédemment montré (séries 3 à 6) que le cerveau des adultes n'affectait pas la production d'ovocytes : les injections répétées d'extraits n'entraînaient pas de grande variation dans le dénombrement des ovocytes observés dans l'ovotestis des animaux examinés.

- L'ablation des tentacules avant la castration provoque dans la glande génitale régénérée des opérés une augmentation considérable du nombre d'ovocytes (confirmation des résultats des séries 1 et 2) ; elle stimule donc la production d'ovocytes.

c) Effet d'injections répétées d'extraits préparés à partir de ganglions cérébroïdes prélevés sur des limaces en phase infantile ou juvénile (séries 17 à 22)

L'influence des ganglions cérébroïdes des adultes sur l'accroissement des ovocytes ayant été établie, nous avons, dans une étape suivante, recherché s'il existait des variations de l'activité de ces ganglions au cours de la vie des limaces (figure 9).

α) Injections de solution physiologique de CHIARANDINI
.....
(séries 17 et 18 : C + Chia et CD + Chia)
.....
Elles constituent les séries témoins.

β) Injections d'extraits obtenus à partir de ganglions
.....
cérébroïdes "infantiles" (séries 19 et 20 : C + ggCi,
.....
CD + ggCi)
.....

Les injections répétées d'extraits obtenus à partir de ganglions cérébroïdes prélevés sur des animaux infantiles n'influent en rien sur le développement de la gonade (figure 9).

Chez les castrats simples (série 19), l'aspect de l'ovotestis est semblable à celui observé chez les castrats ayant reçu du liquide physiologique (série 17).

De même, chez les limaces castrées ayant subi l'ablation des tentacules (série 20), la glande génitale fixée cinq mois après opération offre une image histologique comparable à celle des castrats détentaculés ayant subi des injections de liquide physiologique (série 18).

Il faut également noter que l'injection de doses plus massives (six ganglions cérébroïdes) aboutit au même résultat.

γ) Injections d'extraits obtenus à partir de ganglions
cérébroïdes "juvéniles" (séries 21 et 22 : C + ggCj,
CD + ggCj)

Par comparaison avec les résultats obtenus dans les deux séries témoins (figure 9), la glande hermaphrodite régénérée chez les deux types de castrats [détentaculés ou non (Pl. XIII, fig. d)] ayant reçu des injections d'extraits de ganglions cérébroïdes "juvéniles" renferme un pourcentage important d'ovocytes dont le diamètre est compris entre 60 et 75 μm (figure 9). Par contre, le nombre d'ovocytes enregistré dans la gonade est beaucoup plus important chez les limaces injectées privées de leurs tentacules que chez les castrats simples injectés.

Ainsi, ces six séries expérimentales démontrent l'inefficacité des ganglions cérébroïdes des limaces infantiles sur l'accroissement des ovocytes. De plus, si ces ganglions sont actifs chez les juvéniles, ils le sont beaucoup moins que chez les adultes. En effet, après injections d'extraits de ganglions cérébroïdes "adultes", on dénombre dans la gonade néoformée une plus grande proportion d'ovocytes de grande taille qu'en cas d'injections d'extraits à base de ganglions cérébroïdes "juvéniles".

La spermatogenèse, quant à elle, n'est pas affectée par les divers traitements.

2 - Evolution de la gonade en croissance d'animaux normaux ou détentaculés dès l'éclosion et recevant des injections répétées de solution physiologique ou d'extrait cérébral partiel ou total préparé à partir de cerveaux prélevés sur des limaces adultes (séries 23 à 38)

a) Effet d'injections répétées d'extraits cérébraux totaux (séries 23 à 28)

Les résultats sont consignés dans le tableau IX.

α) Injections de solution physiologique de CHIARANDINI
(séries 23 et 24 : N + Chia et -T + Chia)

Elles constituent les séries témoins.

TABLEAU IX

EVOLUTION DE L'OVOGENESE CHEZ DES ANIMAUX NORMAUX OU DETENTACULES DES L'ECLOSION ET RECEVANT DES INJECTIONS DE SOLUTION PHYSIOLOGIQUE OU D'EXTRAITS CEREBRAUX (FIXATION A L'AGE DE CINQ MOIS).

Type d'opération		Nature de la solution injectée		
		Séries 23 et 24	Séries 25 et 26	Séries 27 et 28
		<i>Chia</i>	<i>Cerv. fin "♂"</i>	<i>Cerv. "♀"</i>
— Animaux normaux (N)	N_o	$379 \pm 61^{a***} (9)^*$	$458 \pm 72^a (8)$	$402 \pm 37^a (9)$
	\varnothing_o max. (en μm)	50	70	70
Tentaculectomie à l'éclosion (-T)	N_o	$1054 \pm 89^b*** (8)$	$1093 \pm 127^b (9)$	$987 \pm 78^b (7)$
	\varnothing_o max. (en μm)	70	90	90

Chia : solution physiologique de CHIARANDINI.

Cerv. "fin ♂" : extrait cérébral obtenu à partir d'animaux en fin de phase mâle.

Cerv. "♀" : extrait cérébral préparé à partir de cerveaux d'animaux en phase femelle.

N_o : nombre d'ovocytes contenus dans la glande génitale.

\varnothing_o max. : diamètre ovocytaire maximal (ne tient pas compte des ovocytes présentant un diamètre éventuellement supérieur mais retrouvés dans l'ovotestis à une fréquence inférieure à 5 %).

* Entre parenthèses est figuré le nombre de régénérats normaux examinés.

** et *** Les séries marquées d'une même lettre ne diffèrent pas de façon significative.

β) Injections d'extraits cérébraux totaux (séries 25, 26, 27, 28 : $N + Cerv. fin \sigma^7$, $-T + cerv. fin \sigma^7$, $N + Cerv. \varphi$, $-T + Cerv. \varphi$)

◦ Cas d'animaux normaux

Séries 25 et 27 : $N + Cerv. fin \sigma^7$, $N + Cerv. \varphi$

A l'âge de cinq mois, quel que soit l'extrait injecté, l'ovotestis de tels animaux présente un aspect de phase juvénile. Néanmoins, par rapport au groupe témoin (série 23), on constate une augmentation du diamètre maximal (70 μm) des ovocytes (tableau IX).

◦ Cas de limaces ayant subi une ablation des tentacules à l'éclosion

Séries 26 et 28 : $-T + Cerv. fin \sigma^7$, $-T + Cerv. \varphi$

Dans les deux cas (injections d'extraits préparés à partir d'animaux en fin de phase mâle soit à partir de limaces parvenues au stade femelle de leur cycle génital), les glandes hermaphrodites prélevées sur des animaux âgés de cinq mois renferment un nombre d'ovocytes nettement supérieur à celui enregistré chez des individus normaux. Parmi ces ovocytes, de nombreux présentent un accroissement notable de leur diamètre qui peut atteindre la taille de 90 μm (tableau IX).

b) Effet d'injections répétées d'extraits cérébraux partiels (ganglions cérébroïdes ou masses sous-oesophagiennes) (séries 29 à 38)

Les figures 10 et 11 récapitulent les résultats obtenus.

α) Injections de solution physiologique de CHIARANDINI (séries 29 et 30 : $N + Chia$, $-T + Chia$)

Elles constituent les séries témoins.

La gonade des limaces privées de leurs tentacules (série 30) est fortement féminisée (Pl. XIV, fig. b), ce qui se traduit par un nombre d'ovocytes important. Comparée à celle des animaux normaux (Pl. XIV, fig. a) ayant reçu des injections de solution physiologique (série 29), elle présente une légère augmentation du pourcentage de gros ovocytes (classe de taille 60 à 75 μm) [figures 10 et 11].

β) Injections d'extraits cérébraux partiels (séries 31 à 38)

* Extraits préparés à partir des ganglions cérébroïdes

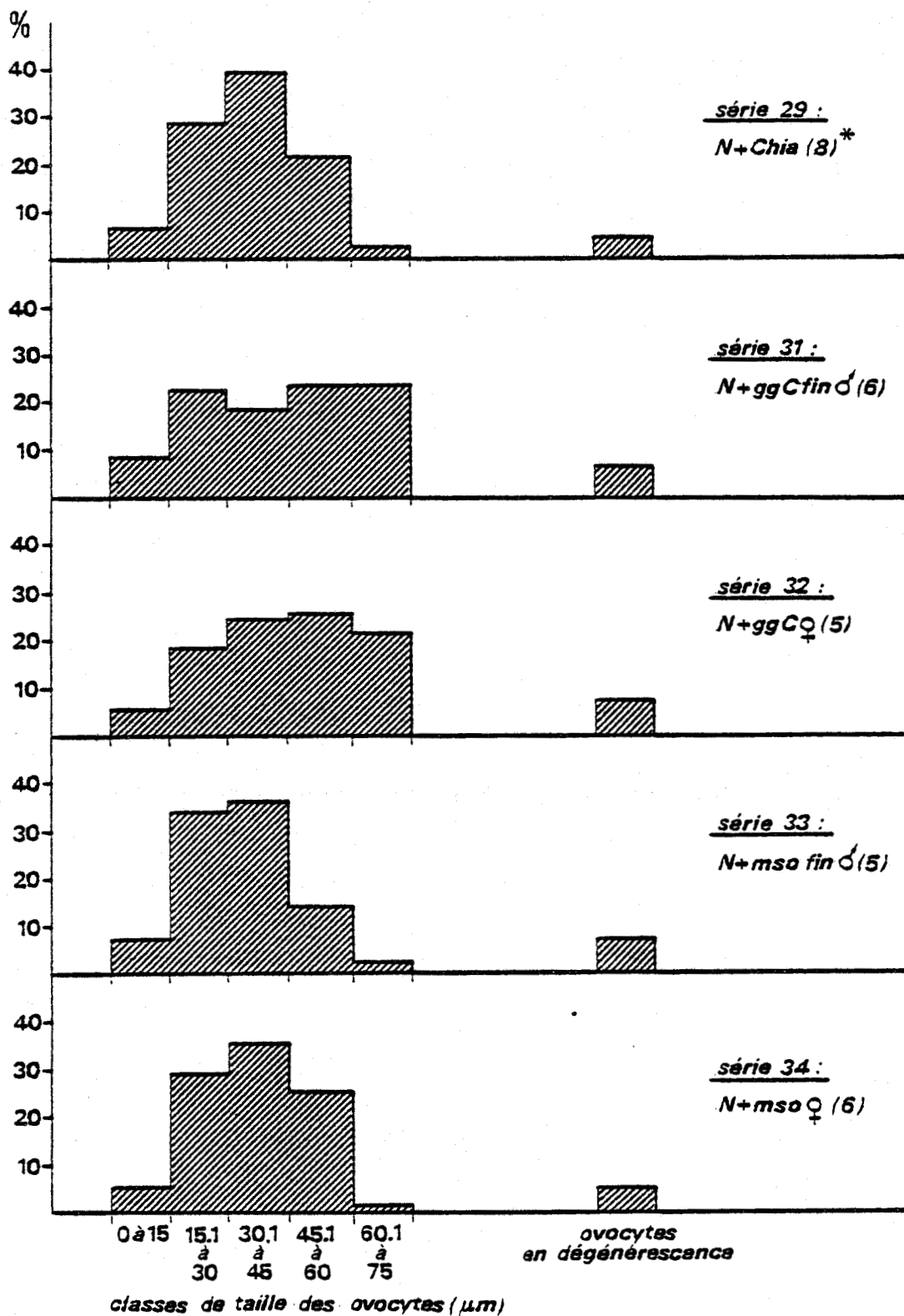


Figure 10 - Pourcentages des différentes classes de taille d'ovocytes dans la gonade prélevée chez des limaces de cinq mois normales (*N*) ayant subi des injections répétées de solution physiologique (*Chia*) ou d'extraits obtenus soit à partir de ganglions cérébroïdes (*ggC*) soit à partir de masses ganglionnaires sous-oesophagiennes (*mso*) d'animaux adultes en fin de phase mâle (*fin ♂*) ou en phase femelle (*♀*).

* Entre parenthèses est figuré le nombre de gonades examinées.

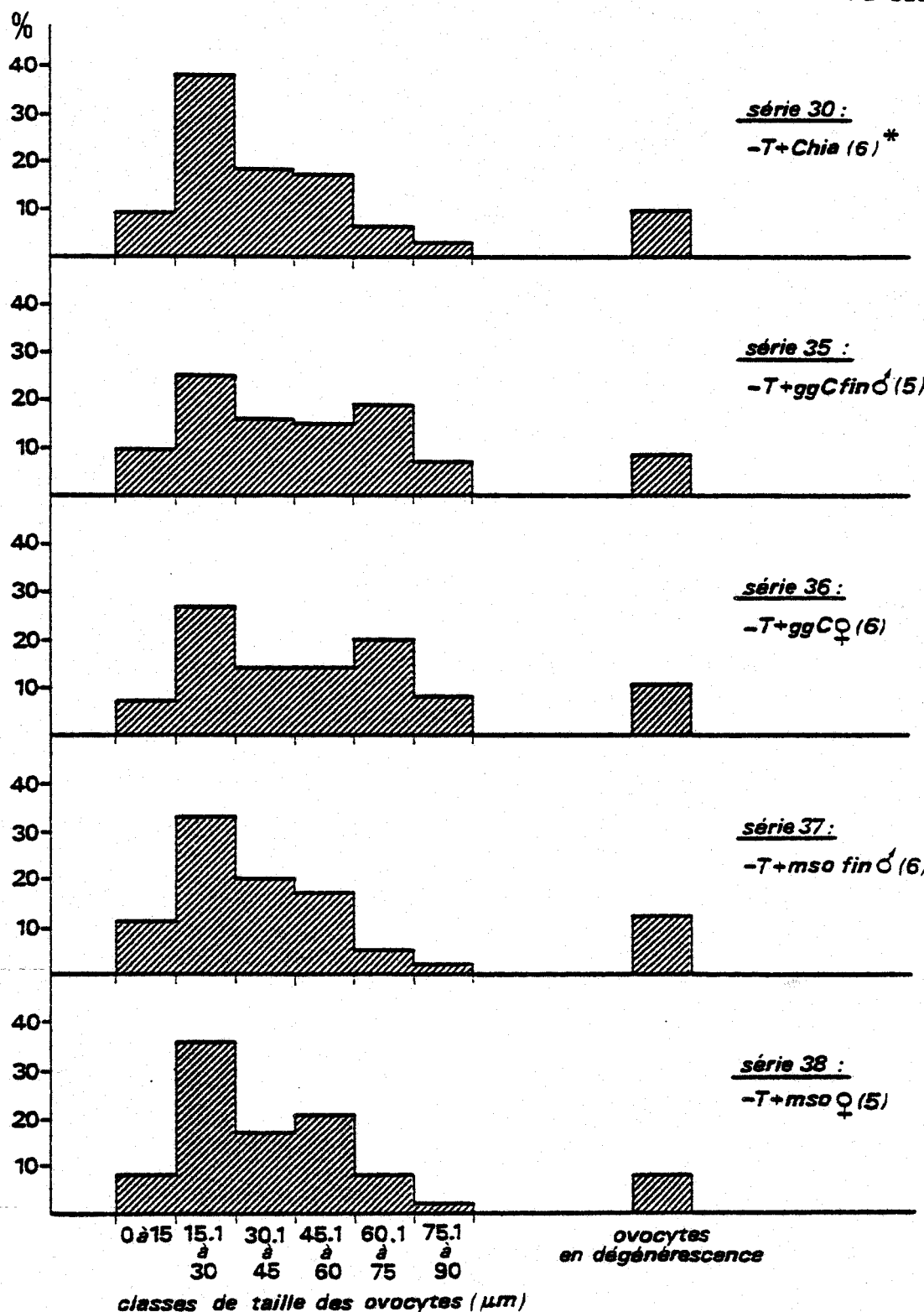


Figure 11 - Pourcentages des différentes classes de taille d'ovocytes dans la gonade prélevée sur des limaces de cinq mois tentaculectomisées à l'éclosion (-T) et ayant subi des injections répétées de solution physiologique (Chia) ou d'extraits obtenus soit à partir de ganglions cérébroïdes (ggC) soit à partir de masses ganglionnaires sous-oesophagiennes (mso) d'animaux adultes en fin de phase mâle (fin ♂) ou en phase femelle (♀).

* Entre parenthèses est figuré le nombre de gonades examinées.



◦ Injections à des animaux normaux

Séries 31 et 32 : $N + ggC \text{ fin } \sigma^{\prime}$, $N + ggC \varphi$

Dans les deux cas (injections d'extraits préparés à partir d'organes prélevés soit sur des animaux en fin de phase mâle soit sur des limaces parvenues au stade femelle de leur cycle génital), on constate par rapport aux témoins de la série 29, l'apparition dans la gonade d'un pourcentage important d'ovocytes dont le diamètre est compris entre 60 et 75 μm (figure 10 et Pl. XIV, fig. c).

◦ Injections à des animaux détentaculés à l'éclosion

Séries 35 et 36 : $-T + ggC \text{ fin } \sigma^{\prime}$, $-T + ggC \varphi$

Quel que soit l'extrait injecté, préparé à partir de ganglions cérébroïdes d'adultes, on observe dans l'ovotestis des animaux injectés l'apparition d'un pourcentage important d'ovocytes dont le diamètre est compris entre 60 et 90 μm (figure 11 et Pl. XIV, fig. d).

* Extraits obtenus à partir de masses ganglionnaires

sous-oesophagiennes (séries 33, 34, 37, 38 : $N +$

$mso \text{ fin } \sigma^{\prime}$, $N + mso \varphi$, $-T + mso \text{ fin } \sigma^{\prime}$, $-T + mso \varphi$)

Si l'on compare l'évolution de l'ovogenèse chez ces animaux par rapport à celle des séries témoins (séries 29 et 30), on ne constate pas de variation dans l'évolution de l'ovogenèse (figures 10 et 11) ; on n'assiste notamment pas à l'apparition dans l'ovotestis de nombreux gros ovocytes (diamètre supérieur à 60 μm).

Pour conclure, les résultats obtenus à la suite d'injections d'extraits cérébraux partiels ou totaux à des animaux normaux ou tentaculectomisés à l'éclosion complètent ceux fournis par les injections d'extraits réalisées sur des castrats simples ou ayant subi l'ablation des tentacules oculaires. Ils confirment le rôle stimulateur des ganglions cérébroïdes sur l'accroissement des ovocytes.

C - DISCUSSION et CONCLUSION

Les résultats fournis par les divers types d'injections d'extraits préparés à partir de ganglions cérébroïdes montrent que :

1°- Les ovotestis des limaces des groupes expérimentaux ayant subi divers traitements ne présentent pas, par rapport à ceux des témoins, de différence en ce qui concerne l'évolution de la spermatogenèse.

2°- L'influence des ganglions cérébroïdes sur le déroulement de l'ovogenèse a été précisée en fonction de l'âge de l'animal.

Les extraits injectés ont été obtenus à partir de ganglions cérébroïdes prélevés sur des individus à des stades différents de leur cycle génital. L'expérimentation a montré que si les ganglions cérébroïdes des animaux infantiles sont inefficaces, les ganglions cérébroïdes des limaces juvéniles et surtout ceux des adultes en fin de phase mâle ou en phase femelle sont actifs. Ils ont un effet stimulateur sur l'accroissement des ovocytes. En effet, l'injection à des castrats ou à des animaux normaux ayant ou non subi une tentaculectomie, d'extraits de ganglions cérébroïdes prélevés sur des limaces juvéniles ou adultes entraîne, surtout dans ce dernier cas, une augmentation notable du pourcentage des gros ovocytes dans la gonade des individus en expérience.

Par contre, dans tous les cas, les injections d'extraits cérébraux n'influent pas sur la production d'ovocytes comme le montrent les comptages effectués, ce qui ne confirme pas les résultats obtenus par PELLUET et LANE (1961) et PELLUET (1964).

Cet effet des ganglions cérébroïdes pose le problème de connaître la localisation de la partie active de ces ganglions, problème qui se complique par le fait que ces derniers sont entourés de tissu conjonctif connu pour renfermer les corps dorsaux dont la fonction endocrine a été démontrée chez la Limnée (GERAERTS, BOHLKEN et JOOSSE, 1978). Ainsi l'effet des ganglions cérébroïdes peut être attribué soit à une neurosécrétion soit à un éventuel effet des corps dorsaux, tout prélèvement des ganglions cérébroïdes s'accompagnant de celui de ces organes inclus dans la gaine conjonctive périganglionnaire.

Chez le Basommatophore *Lymnaea stagnalis*, JOOSSE et ses collaborateurs ont réalisé depuis 1964 à Amsterdam l'ablation des corps dorsaux, formations accolées à la surface des ganglions cérébroïdes (JOOSSE, 1964 ; JOOSSE et GERAERTS, 1969 ; GERAERTS et JOOSSE, 1975 ; GERAERTS et ALGERA, 1976 ; VELDHUIJZEN et CUPERUS, 1976).

D'autre part, des expériences plus localisées ont consisté à détruire électivement des cellules neurosécrétrices (GERAERTS, 1976a ; GERAERTS et BOHLKEN, 1976).

Chez les Stylommatophores, seule la cautérisation des corps dorsaux a pu être effectuée sur un petit nombre d'animaux par WIJDENES et RUNHAM (1976) chez *Agriolimax reticulatus*. Cette opération n'a pas, jusqu'à présent, pu être réussie chez les Arionidés où il est très difficile d'opérer sur le système nerveux central.

JOOSSSE et GERAERTS (1969) puis GERAERTS et JOOSSE (1975) ont montré que chez *Lymnaea stagnalis* la vitellogenèse était stimulée par un facteur produit par les corps dorsaux. En effet, si quatre-vingt-dix jours après ablation de ces organes on compare le pourcentage d'ovocytes en vitellogenèse dans la gonade des opérés par rapport à celui trouvé dans les groupes témoins, on constate qu'il est nettement inférieur dans la glande génitale des animaux opérés. Par contre, après réimplantation des corps dorsaux, la vitellogenèse reprend, ce qui prouve que ce facteur est de nature hormonale.

WIJDENES et RUNHAM (1976) observent, après cautérisation des corps dorsaux chez *Agriolimax reticulatus*, que la "maturation" des ovocytes est ralentie et qu'il en résulte une augmentation du nombre des petits ovocytes.

Nos résultats sont à rapprocher de ceux obtenus chez *Lymnaea stagnalis* et *Agriolimax reticulatus* ; il conviendra donc dans l'avenir de tenter de déterminer dans l'effet des ganglions cérébroïdes la part qui revient aux corps dorsaux.

CHAPITRE II

EXPÉRIMENTATION IN VITRO

L'expérimentation *in vivo* a été menée de pair avec une étude *in vitro* par la méthode des cultures organotypiques qui représente une technique de choix pour la détection et l'étude des influences susceptibles de s'exercer sur la gonade.

Cette méthode, grâce à la mise au point de milieux de culture (voir revues de LE DOUARIN, 1969 ; GOMOT, 1972 ; GOLDING, 1974 ; DURCHON et JOLY, 1978), a été appliquée avec succès par de nombreux chercheurs et plus particulièrement par ceux de l'école française. Elle a apporté une importante contribution à l'étude des problèmes d'endocrinologie chez divers Invertébrés.

Chez les Mollusques, cette technique a permis au cours de ces dernières années de faire progresser les connaissances dans le domaine de l'endocrinologie de la reproduction [se référer aux mises au point de BAYNE (1968, 1976), GOMOT (1969, 1972, 1976 b et 1977), GUYARD (1970, 1971 b), RICHARD (1970), STREIFF (1970)]. En effet, la réalisation d'excisions et de réimplantations d'organes présentant des difficultés majeures chez de nombreux Mollusques, elle offre un intérêt évident pour étudier les interactions directes pouvant exister entre divers organes. Plusieurs milieux de culture ont été utilisés.

Chez les Céphalopodes, RICHARD (1971) dans son travail sur la Seiche *Sepia officinalis* a pu en employant le milieu de culture de DURCHON et SCHALLER (1963) préciser l'influence endocrine de la glande optique de ce Décapode.

Chez les Lamellibranches, LUBET et ses collaborateurs, en utilisant le milieu de STREIFF modifié par S. LE GALL (1974) ont pu suivre l'évolution de la gamétogenèse chez *Mytilus edulis* [MATHIEU, LUBET et COLLIN (1976), LUBET et MATHIEU (1978), LUBET (1978), MATHIEU et LUBET (1979), MATHIEU (1979)], chez *Chlamys opercularis* (ALLARAKH, 1979) et chez deux espèces d'huîtres [*Ostrea edulis* : LUBET (1978) ; *Crassostrea gigas* : MATHIEU, LUBET et COLLIN (1976), LUBET (1978), LUBET et MATHIEU (1978)].

C'est chez les Gastéropodes que les tentatives de mises au point de milieux de culture ont été les plus nombreuses.

Chez les Prosobranches marins, STREIFF après des recherches minutieuses [STREIFF et PEYRE (1963), STREIFF (1963, 1964)] a réussi à mettre au point un milieu adapté à la culture d'organes du Calyptréidé *Calyptraea sinensis*, le milieu MA 7, qui lui a permis de mettre en évidence les facteurs hormonaux conditionnant l'évolution du tractus génital et de la gonade (STREIFF, 1967 a). Ce milieu a été modifié par S. LE GALL (1974) pour son étude du déterminisme de la morphogenèse du tractus génital mâle externe chez *Crepidula fornicata*.

Cette méthode de culture, selon la technique de WOLFF et HAFEN (1952), adaptée aux Mollusques marins par STREIFF, a pu être utilisée avec succès à Caen par STREIFF et ses collaborateurs sur d'autres Prosobranches : *Crepidula*, *Littorina*, *Buccinum*, *Thais*, *Ocenebra*.

A Lille, CHOQUET (1969) en effectuant des cultures sur un milieu de composition identique à celle mise au point par DURCHON et SCHALLER (1963), a pu montrer l'influence du complexe céphalique tentacules-cerveau sur l'évolution de la gamétogenèse de la Patelle, *Patella vulgata*.

A Besançon, GRIFFOND (1973, 1977) et GRIFFOND et GOMOT (1974) ont pu cultiver des gonades du Prosobranché dulçaquicole *Viviparus viviparus* et mettre en lumière certaines différences de fonctionnement entre ovaires et testicules.

Chez les Pulmonés Stylommatophores, en dehors des travaux de BURCH et CUADROS (1965) sur l'Hélicidé *Helix pomatia*, les recherches de milieux ont été effectuées à Besançon par GOMOT et GUYARD sur l'escargot *Helix aspersa* et à Rochester par GOUDSMIT et ses collaborateurs sur *Helix pomatia*.

Après avoir éprouvé différents milieux [GOMOT et GUYARD (1964, 1967), GOMOT (1969)], GUYARD (1969 a) a publié la composition du milieu G₂ qu'il a employé au cours de ses recherches sur les facteurs contrôlant l'orientation sexuelle des gonocytes d'*Helix aspersa* (GUYARD, 1971 a).

GOUDSMIT et FELDMAN (1974) ont mis au point un milieu dont la composition est assez proche de celle donnée par GUYARD et l'ont utilisé dans leurs études relatives à l'influence du cerveau sur la synthèse du galactogène dans la glande de l'albumine d'*Helix pomatia*.

Chez les Pulmonés Basommatophores, VIANEY-LIAUD et LANCASTRE (1968) sur un milieu diphasique, puis VIANEY-LIAUD (1970, 1973) en milieu liquide, ont pu maintenir en culture l'ovotestis du Planorbe *Australorbis glabratus* isolément ou en association avec le système nerveux central.

Chez *Lymnaea stagnalis*, ROUBOS, VAN MINNEN, WIJDENES et MOORER-VAN DELFT (1976) puis ROUBOS et MOORER-VAN DELFT (1976) ont modifié le milieu de BAILEY (1973) afin de cultiver pendant trois à sept jours des ganglions cérébroïdes, des cellules caudo-dorsales isolées et des complexes ganglionnaires pleuro-pariétaux. Chez le même animal, DE JONG-BRINK, KOOP, KRAAL et VAN WINGERDEN (1976) ont pu mettre en culture des fragments de glande de l'albumine mais n'ont pas pu démontrer d'activité synthétique (galactogène) dans cette glande cultivée en association avec le système nerveux central ou l'ovotestis.

Ainsi, les recherches expérimentales ont essentiellement porté sur les Gastéropodes et ont pu démontrer chez ces derniers l'existence de facteurs endocrines réglant au cours de la vie l'évolution des tractus génitaux et de la gonade.

* *Evolution des tractus génitaux*

■ Chez les Prosobranches les recherches ont été effectuées par STREIFF et ses collaborateurs sur des animaux hermaphrodites protandres [*Calyptraea sinensis* : expériences de STREIFF (1966), STREIFF (1967 b), STREIFF, LE BRETON et SILBERZAHN (1970), S. LE GALL et STREIFF (1974) ; *Crepidula fornicata* : LE BRETON (1969), LUBET et STREIFF (1969), STREIFF et LE BRETON (1970 b), STREIFF, LE BRETON et SILBERZAHN (1970), S. LE GALL et STREIFF (1974), NY et S. LE GALL (1976), S. LE GALL et STREIFF (1978)] ou gonochoriques [*Littorina littorea* : LE BRETON (1969), STREIFF et LE BRETON (1970 a et b), STREIFF, LE BRETON et SILBERZAHN (1970), S. LE GALL et STREIFF (1974) ; *Viviparus viviparus* : S. LE GALL, GRIFFOND et STREIFF (1974) ; *Buccinum undatum* : S. LE GALL et STREIFF (1974), S. LE GALL, GRIFFOND et STREIFF (1974) ; *Ocenebra erinacea* : FERAL (1978) ; *Thais lapillus* : NY et S. LE GALL (1976)].

Elles ont montré que :

- Chez *Calyptraea*, *Crepidula*, *Littorina*, *Buccinum* et *Ocenebra*, le tentacule oculaire droit émet un facteur morphogénétique du pénis. Ce facteur est synthétisé au niveau des ganglions pédieux ; le tentacule ne serait qu'un "lieu de concentration de ce facteur" (S. LE GALL et STREIFF, 1975). Chez *Crepidula* et *Buccinum*, l'activité morphogénétique pédieuse est contrôlée par des substances émises au niveau des ganglions cérébro-pleuraux.

- Le facteur dédifférenciateur du pénis de *Calyptraea*, *Crepidula*, *Littorina*, *Buccinum* et *Ocenebra* est libéré par les ganglions pleuraux.

- Chez *Calyptraea*, le facteur morphogénétique du vagin est émis par les ganglions nerveux périoesophagiens des individus en changement de sexe. Ce même facteur a pu être localisé chez *Crepidula* au niveau des ganglions cérébroïdes et des ganglions pleuraux d'animaux en changement de sexe ou en phase femelle. Chez *Thais*, il est présent au niveau des ganglions cérébro-pleuraux.

- Ces facteurs hormonaux, morphogénétiques et dédifférenciateurs sont interspécifiques et agissent entre espèces hermaphrodites, entre espèces gonochoriques et entre espèces hermaphrodite et gonochorique.

- En ce qui concerne le déterminisme de la morphogenèse du tractus génital externe aucune différence fondamentale n'existe entre la phase mâle d'un hermaphrodite et le sexe mâle d'un gonochorique pas plus qu'entre la phase femelle d'un hermaphrodite et le sexe femelle d'un gonochorique.

■ Chez les Pulmonés Stylommatophores, GOMOT (1973, 1976 b) a montré que la gonade et le cerveau exercent une action directe sur les glandes multifides du tractus génital d'*Helix aspersa*. COURTOT (1977) puis GOMOT et COURTOT (1979) ont effectué des associations de fragments de glande de l'albumine d'*Helix aspersa* avec des complexes céphaliques tentacules oculaires - cerveau ; les

résultats obtenus ont démontré que les ganglions cérébroïdes ont une action directe très nette et augmentent le nombre des globules de sécrétion dans les acini. Par contre, les tentacules auraient une action inhibitrice. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par GOUDSMIT (1975) qui a enregistré une activation de la synthèse du galactogène dans des fragments de glande de l'albumine d'*Helix pomatia* en hibernation cultivés en présence d'un cerveau prélevé sur un escargot en reproduction.

* Evolution de la gonade

■ Chez les Prosobranches les recherches ont porté sur *Calyptraea*, *Crepidula*, *Patella* et *Viviparus*.

Chez *Calyptraea sinensis*, STREIFF (1967 c) a montré que la gamétogénèse mâle ne peut s'effectuer qu'en présence d'une hormone masculinisante émise par le système nerveux central et que l'ovogénèse se réalise grâce à la superposition de deux processus : un phénomène d'autodifférenciation ovocytaire et un facteur vitellogénétique, issu du système nerveux central, qui agit à la manière d'une impulsion.

Chez *Crepidula fornicata*, les travaux de LUBET et STREIFF (1969) montrent que le phénomène d'autodifférenciation ovocytaire n'apparaît que dans certains cas et uniquement dans des gonades mâles de jeunes animaux. La gamétogénèse mâle, pour être maintenue en culture, nécessite la présence de ganglions cérébroïdes prélevés sur des mâles.

CHOQUET (1969), chez *Patella vulgata* a pu mettre en évidence l'existence d'une gonadostimuline libérée par les ganglions cérébroïdes et responsable du déclenchement des mitoses goniales. Chez cet animal, la vitellogénèse est déclenchée par un facteur émis au niveau du système nerveux central uniquement pendant la phase d'inversion ou au début de la vitellogénèse. Les tentacules, quant à eux, exercent en culture une action inhibitrice sur la spermatogénèse.

GRIFFOND (1977) a démontré chez *Viviparus viviparus*, qu'en culture *in vitro*, chez le mâle comme chez la femelle, l'hémolymphe stimule les divisions mitotiques et méiotiques.

■ Chez les Pulmonés, les recherches en culture *in vitro* ont porté sur le planorbe *Australorbis glabratus*, sur l'escargot petit-gris *Helix aspersa* et sur deux espèces de limaces : *Arion rufus* et *Agriolimax reticulatus*.

- Chez le Basommatophore *Australorbis glabratus*, l'association *in vitro* de trois colliers nerveux à un ovotestis adulte permet d'obtenir la méiose mâle. Elle ne peut cependant rétablir l'évolution complète des cellules germinales mâles, la spermiogénèse n'a en effet pas lieu (VIANEY-LIAUD, 1970).

- Chez les Stylommatophores, *Helix aspersa* représente l'espèce la plus étudiée. GUYARD (1969 b, 1971 a) a mis en évidence chez cet escargot, le phénomène d'autodifférenciation femelle dans l'ébauche gonadique et montré que le tentacule oculaire est inhibiteur de cette autodifférenciation. Cet auteur a également observé que les ganglions cérébroïdes des adultes en période de ponte favorisent le développement des ovocytes. GOMOT (1973), en réalisant l'association tentacules oculaires - ovotestis en état d'activité, obtient la multiplication spermatogoniale et la différenciation des spermatocytes, mais la spermiogenèse ne peut pas s'effectuer. Plus récemment, BRIDE et GRIFFOND (1979) ont constaté en culture que l'extrait de gonades d'animaux en phase mâle dominante améliore la survie des cellules de l'épithélium germinatif et permet le déroulement des différents stades de la méiose dans les cellules mâles. Enfin, l'action des stéroïdes sur la glande hermaphrodite a été contrôlée en culture *in vitro* ; elle dépend d'une part de la nature du stéroïde et de l'état physiologique (repos ou activité) de l'animal donneur (GOMOT, 1974).

Chez les limaces, les cultures d'associations d'organes ont été pratiquées chez *Arion rufus* et *Agriolimax reticulatus* et dans les deux cas, concernent des glandes hermaphrodites adultes fonctionnelles. En conséquence, l'interprétation des résultats en est rendue plus délicate.

BADINO (1967) a cultivé sur milieu dérivé de celui de WOLFF et HAFFEN (1952) des gonades d'*Arion rufus*. Il a observé dans les explants évoluant en milieu an hormonal la survie des deux lignées gamétiques. De plus, l'association du cerveau féminise l'ovotestis tandis que celle du tentacule ou du complexe tentacules - cerveau bloque la croissance ovocytaire et stimule la spermatogenèse.

BAILEY (1973) a effectué des cultures d'ovotestis de l'espèce *Agriolimax reticulatus* dans un milieu liquide en adaptant la technique de TROWELL (1959). Il a montré que pour assurer la survie des cellules germinales mâles, il suffit d'associer le complexe tentacules - cerveau aux explants gonadiques ; les complexes tentacules - cerveau d'animaux au stade "mâle immature" ou en phase "mâle" sont les plus efficaces.

Ces types de cultures ne permettant pas d'étudier les processus de différenciation sexuelle, nous avons donc tenté d'éclaircir les mécanismes contrôlant l'expression de l'hermaphrodisme chez la limace *Arion subfuscus* en cultivant des gonades isolément, associées à des organes présumés endocrines (milieu semi-solide) ou en présence d'extraits de ces mêmes organes (milieu liquide).

I - TECHNIQUES DE LA CULTURE ORGANOTYPIQUE

A - PROVENANCE DES ANIMAUX

Les animaux donneurs proviennent d'un élevage réalisé au laboratoire (se référer à la partie Matériel et Techniques, p. 6).

B - ISOLEMENT DES ANIMAUX

Quelques jours avant la mise en culture, pour réduire les risques de contamination, les limaces sont isolées dans des cristallisoirs stériles dont le fond est recouvert de papier filtre stérile, humidifié d'eau bidistillée stérile additionnée de Spécilline G (SPECIA) : 100 000 U.I pour 200 ml d'eau, de Streptomycine (SPECIA) : 5 mg pour 200 ml d'eau et de Polymyxine B (PFIZER) : 50 000 U.I pour 200 ml d'eau.

C - EXPLANTATIONS

Si l'anesthésie se révèle obligatoire chez les spécimens d'assez grande taille afin d'éviter les contractions brutales accompagnées de rejets de mucus, défavorables au prélèvement des organes céphaliques, elle n'est pas nécessaire chez les très jeunes animaux.

Le prélèvement des organes a lieu dans des conditions aussi stériles que possible et s'effectue dans des boîtes de Pétri à fond de paraffine ; l'animal, maintenu par des épingles, est immergé dans la solution physiologique de CHIARANDINI (1964) sans bicarbonate et additionnée d'antibiotiques (Spécilline G : 500 U.I/ml, Streptomycine : 25 µg/ml).

Lorsque la taille de la gonade le permet, un fragment témoin est prélevé et fixé au moment de la mise en culture. Dans le cas contraire (cas de très jeunes gonades prélevées au stade infantile), on considère comme tel la glande génitale d'un animal du même âge, issu d'une même ponte.

D - MILIEU DE CULTURE

Les cultures ont été effectuées sur milieu semi-solide ou sur milieu liquide.

La technique sur milieu gélosé, dérivée de celle de WOLFF et HAFEN (1952) est pratiquée sur un milieu semblable à celui mis au point par GUYARD (1969 a) pour l'escargot *Helix aspersa*. Ce milieu, à base de solution 199 de MORGAN, MORTON et PARKER (1950) a la composition suivante (les doses étant données pour une salière) :

- Milieu gélifié 7 gouttes
Gélose (DIFCO) dissoute dans le liquide de GEY 1 % et renfermant une même proportion de Peptone (DIFCO).
- Liquide physiologique 6 gouttes
 - 1- Milieu 199 (INSTITUT PASTEUR) 63 parties
 - 2- Bicarbonate de Na à 3 ‰ 85 parties
 - 3- Liquide de HANKS 850 parties
 - 4- Extrait de levure (INSTITUT PASTEUR) 2 parties
- Antibiotiques
 - Spécilline G (SPECIA) 100 U.I
 - Polymyxine B (PFIZER) 25 U.I

Ce milieu est neutre du point de vue hormonal. Son pH est ajusté à 7,45 par l'emploi de bicarbonate de soude et régulièrement contrôlé grâce à la présence dans le milieu de rouge de phénol.

La mise au point d'une technique de culture d'organes sur milieu liquide a permis de cultiver des explants gonadiques durant quatre semaines. La méthode employée est celle de CHEN (1954) : les explants sont déposés sur des rondelles de papier à lentille flottant sur le milieu de culture contenu dans un verre de montre. Ce dernier est placé dans une boîte de Pétri sur du coton hydrophile imbibé d'eau bidistillée (figure 12).

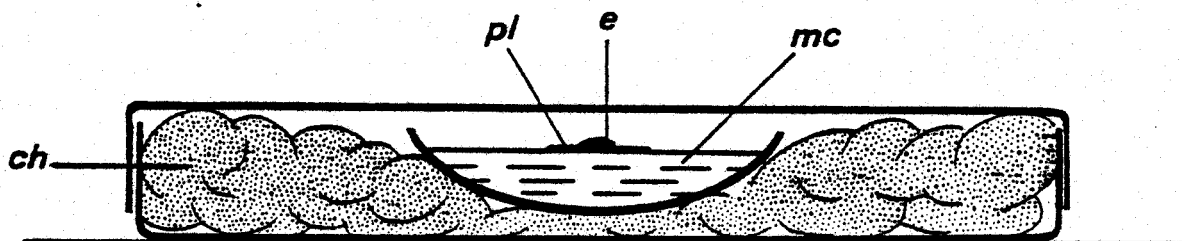


Figure 12 - Schéma du dispositif de culture en milieu liquide (d'après DURCHON et PORCHET, 1971).

- ch : coton hydrophile humidifié.
- e : explant.
- mc : milieu de culture.
- pl : papier à lentille.

Cette méthode a pour principal intérêt de permettre l'intégration au milieu d'extraits tentaculaires, cérébraux ou mixtes (tentacules oculaires + cerveau). Elle fournit ainsi l'occasion de contrôler l'activité du complexe céphalique tentacules - cerveau au cours de la vie, certaines associations hétérologues d'organes étant en effet irréalisables eu égard à l'impossibilité de disposer simultanément des deux types de donneurs au cours du cycle annuel.

Dans ce cas, le milieu de culture, liquide, a la même composition que celui employé précédemment à l'exclusion de la gélose.

E - TECHNIQUE DE PREPARATION DES EXTRAITS

Les organes (tentacules et cerveaux) ont été prélevés sur des individus d'un état génital donné et conservés à -70°C.

Après homogénéisation et centrifugation (voir Matériel et Techniques, p. 10), le surnageant est recueilli et une quantité correspondant à un nombre donné de tentacules ou de cerveaux est incorporée dans le milieu de culture après passage sur filtre MILLIPORE pour assurer la stérilité de la solution.

F - DOSE ET FREQUENCE DE RENOUELEMENT DES EXTRAITS

Trois types d'extraits homologues ou hétérologues ont été éprouvés : tentaculaires, cérébraux et mixtes (tentacules - cerveau). La dose introduite dans le milieu de culture est équivalente soit à deux tentacules, soit à un cerveau, soit à un complexe céphalique (deux tentacules + un cerveau) ; elle est dans tous les cas renouvelée tous les six jours.

G - ENTRETIEN ET COMPORTEMENT DES CULTURES

Les cultures, qui se sont prolongées sur une durée de quinze à vingt-huit jours, sont placées à l'obscurité dans une étuve réglée à la température de 20°C. Malgré les précautions prises au cours de l'explantation, on déplore un pourcentage d'infections d'environ 10 %.

Dans le cas des associations d'organes, la jonction tissulaire s'effectue assez rapidement. Après vingt-et-un jours de culture, les tentacules oculaires restent sensibles à la lumière et au contact des pinces ; à la fixation leur structure histologique est bien conservée. Le cerveau présente également un bon aspect au terme de la culture. Dans le cas des cultures sur milieu liquide, ce dernier est renouvelé tous les six jours.

II - RESULTATS

L'expérimentation effectuée ayant pour but de rechercher une influence éventuelle du complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau sur la différenciation sexuelle et le déroulement de la gamétogenèse, nous rapportons ici les observations effectuées à la suite de la culture de deux types d'explants gonadiques : glandes génitales infantiles et juvéniles (prélevées respectivement au stade 1 et au stade 2 du cycle génital).

Au cours de nos recherches expérimentales, nous avons procédé :

- à des cultures de glandes génitales isolées,
- à des associations de gonades (infantiles) ou de fragments de gonades (juvéniles) avec tout ou partie de complexes céphaliques (tentacules oculaires - cerveau) prélevés soit sur le donneur de la glande génitale (associations autologues) soit sur des animaux d'âges différents (associations hétérologues),
- à des cultures de gonades en présence d'extraits tentaculaires, cérébraux ou mixtes, préparés à partir d'organes prélevés sur des limaces de même âge (extraits homologues) ou d'âges différents (extraits hétérologues).

A - CULTURES DE GONADES INFANTILES

Pour mettre en évidence les potentialités de sexualisation, il est préférable de recourir à des expérimentations sur la gonade avant que ne se soient manifestées les deux catégories sexuelles. Pour ce faire, nous avons effectué des cultures de gonades infantiles de l'un des trois types suivants :

- isolées,
- associées à des complexes céphaliques complets ou dissociés, soit autologues (prélevés au stade 1 du cycle génital), soit hétérologues (prélevés sur des animaux en phase femelle : stade 5 du cycle sexuel),
- en présence d'extraits tentaculaires, cérébraux ou mixtes préparés à partir de limaces en phase mâle mature (stade 4a du cycle génital).

La glande génitale est explantée sur des animaux âgés de huit à dix jours, âge auquel elle se présente sous forme d'amas cellulaires bordant l'artère génitale. Elle se trouve à un stade défini comme étant le stade infantile (stade 1 du cycle génital) ; aucun ovocyte n'y est discernable (Pl. II, fig. b). Sa structure à ce stade post-embryonnaire le plus précoce a été décrite précédemment (voir 1ère partie, page 21).

Etant donnée l'impossibilité de prélever un fragment témoin, en raison de la taille de la gonade (100 μ m), on considère comme tel la glande génitale d'un animal du même âge issu d'une même ponte. En cas d'association,

TABLEAU X

DIFFERENCIATION DE LA LIGNEE FEMELLE DANS DES GONADES INFANTILES CULTIVEES ISOLEMENT OU EN ASSOCIATION AUTOLOGUE OU HETEROLOGUE AVEC LE COMPLEXE CEPHALIQUE TENTACULES OCULAIRES - CERVEAU. (CULTURES SUR MILIEU GELOSE).

Durée de culture : 21 jours	Type de culture effectuée								
	Gonade infantile isolée	Associations autologues			Associations hétérologues				
		—	T-Ci	Ti	Ci	T-Cq	Tq	Cq	Tq-Ci
Organe(s) associé(s) à la gonade infantile	—								
Nombre de cultures exploitables	46	27	38	34	31	37	42	24	19
Différenciation de la lignée femelle	+++	0 et ±*	0 et ±*	+++	+++	+++	+++	+++	0 et ±*

T : Tentacules oculaires ; C : cerveau ; T-C : complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau ; i et q : prélevé(s) sur des animaux infantiles (i) ou en phase femelle (q).

0 : *statu quo* ; ± : rares ovocytes ; +++ : poussées ovocytaires.

*: pour détails, voir le texte.



la gonade cultivée étant relativement minuscule par rapport aux organes associés, on la repère au départ sur un schéma.

La fixation des explants a lieu après vingt-et-un jours de culture.

Les tableaux X, XI et XII résument les résultats obtenus.

1 - Cultures de gonades infantiles isolées

En milieu an hormonal (gélifié ou liquide), la tendance d'une gonade infantile est d'évoluer dans le sens femelle (Tableaux X, XI, XII). Ainsi, l'examen histologique d'un tel explant cultivé pendant trois semaines (Pl. XV, fig. a) révèle l'apparition de nombreux jeunes ovocytes, ceux-ci étant absents lors de la mise en culture de l'organe. Néanmoins, la féminisation n'est pas totale ; on retrouve encore quelques spermatogonies.

2 - Cultures de gonades infantiles en association avec tout ou partie de complexes céphaliques autologues ou hétérologues (prélevés sur des animaux en phase femelle)

Le tableau X récapitule l'ensemble des résultats obtenus qui ont fait l'objet d'une publication (WATTEZ, 1978).

a) Associations autologues

α) Association gonade - complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau

Dans le cas d'association triple, la plupart des cultures (19) restent, après vingt-et-un jours de culture, au *statu quo*. Il n'est néanmoins pas rare (cas de 8 cultures) de relever la présence d'un à deux ovocytes (Pl. XV, fig. b). Ainsi, il semble bien que dans la différenciation sexuelle de la gonade de la limace n'interviendraient que deux organes : le tentacule oculaire et le cerveau. Nous avons donc effectué des cultures de gonades associées soit aux tentacules, soit au cerveau.

β) Association gonade - tentacules oculaires

Si de telles associations sont fixées après quinze (Pl. XV, fig. c, d) ou vingt-et-un jours de culture (Pl. XV, fig. e), on constate histologiquement que la seule présence des tentacules empêche toute apparition d'ovocytes (35 cas sur 38 après vingt-et-un jours de culture).

γ) Association gonade - cerveau

Dans ce type d'association, la glande génitale montre, au contact direct du cerveau, après trois semaines de culture, une nette poussée femelle marquée par l'apparition dans ses rares acini de jeunes ovocytes pariétaux, poussée déjà notable après quinze jours de culture (Pl. XV, fig. f).

b) Associations hétérologues

Nous avons étudié *in vitro* l'influence du complexe céphalique prélevé sur des animaux au stade femelle de leur cycle génital (stade 5) en effectuant des associations gonades infantiles - complexes céphaliques "femelles".

- α) Cultures de gonades infantiles associées à des complexes
céphaliques tentacules oculaires - cerveau prélevés
sur des limaces en phase femelle

Dans le cas d'une telle association, l'explant gonadique présente après trois semaines de culture de nettes poussées ovocytaires (Pl. XVI, fig. b). A titre de comparaison, il faut rappeler ici que la culture d'une gonade du même âge en présence du complexe autologue ne permettait d'observer que parfois un ou deux ovocytes (tableau X).

- β) Cultures de gonades infantiles associées aux seuls
tentacules oculaires prélevés sur des limaces en
phase femelle

Au terme de la culture (vingt-et-un jours), on enregistre dans la gonade associée à de tels tentacules la présence d'ovocytes (Pl. XVI, fig. c) alors que l'association d'une telle glande génitale avec des tentacules infantiles empêchait toute apparition d'ovocytes (tableau X).

- γ) Cultures de gonades infantiles associées à des tentacules oculaires "infantiles" et à un cerveau "femelle"

Trois semaines après l'explantation, on constate dans ce cas d'association triple que dans treize cultures il n'apparaît pas d'ovocytes. Dans les six autres on observe de rares ovocytes (Pl. XVI, fig. d). Ceci confirme le pouvoir inhibiteur du tentacule au stade infantile sur la différenciation de la lignée femelle.

- δ) Cultures de gonades infantiles associées à des cerveaux prélevés sur des animaux en phase femelle

En présence d'un tel cerveau, la gonade cultivée pendant vingt-et-un jours évolue dans le sens femelle, ce qui se traduit par l'apparition d'ovocytes (Pl. XVI, fig. e).

Ces quatre types d'associations hétérologues permettent de mettre en évidence l'inactivité du tentacule oculaire d'individus parvenus au stade femelle quant à la différenciation de la lignée femelle. Une confirmation peut en être donnée en réalisant l'association triple gonade infantile - tentacules "femelles" - cerveau "infantile".

e) Cultures de gonades infantiles associées à des tentacules oculaires "femelles" et à un cerveau "infantile"
Après vingt-et-un jours de culture (Pl. XVI, fig. f),

on observe une forte poussée ovocytaire dans la gonade. Ce résultat, mis en parallèle avec le fait qu'en cas d'association autologue gonade - complexe céphalique au stade infantile on aboutisse à la présence de très rares ovocytes (Tableau X) permet de confirmer la perte en phase femelle du pouvoir inhibiteur du tentacule sur la différenciation de la lignée femelle.

3 - Cultures de gonades infantiles en présence d'extraits hétérologues tentaculaires, cérébraux ou mixtes obtenus à partir d'animaux en phase mâle

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux XI et XII. L'influence du complexe céphalique des animaux en phase femelle sur la différenciation de la gonade peut être étudiée en effectuant des associations d'organes. Par contre, celle du complexe de limaces en phase mâle doit l'être par adjonction au milieu de culture d'extraits, étant donnée l'impossibilité de disposer simultanément de donneurs infantiles et de donneurs en phase mâle.

* Dans un premier temps (tableau XI), des gonades infantiles ont été cultivées en présence d'extraits tentaculaires, cérébraux ou mixtes (tentacules - cerveau) obtenus à partir d'organes prélevés sur des animaux en phase mâle mature (stade 4a).

TABLEAU XI

DIFFERENCIATION DE LA LIGNEE FEMELLE DANS DES GONADES INFANTILES CULTIVEES ISOLEMENT OU EN PRESENCE D'EXTRAITS TENTACULAIRES, CEREBRAUX OU MIXTES "MÂLES" (CULTURES SUR MILIEU LIQUIDE).

Durée de culture: 21 jours	Milieu de culture sans extrait	Nature de l'extrait introduit dans le milieu de culture		
		TC ♂	T ♂	C ♂
Nombre de cultures exploitables	25	9	32	11
Différenciation de la lignée femelle	+++	±	±	+++

TC : extrait mixte (tentacules oculaires - cerveau) ; T : extrait tentaculaire ; C : extrait de cerveaux ; ♂ : préparé à partir d'animaux en phase mâle mature ; ± : rares ovocytes ; +++ : poussées ovocytaires.

a) Cultures de gonades infantiles en présence d'extraits tentaculaires "mâles"

Après vingt-et-un jours de culture (Pl. XVII, fig. a), on aboutit dans la gonade cultivée à l'apparition de quelques jeunes ovocytes, mais en nombre très restreint. Ce résultat est différent de celui obtenu en associant une gonade infantile avec des tentacules "infantiles". Le tentacule prélevé sur des animaux en phase mâle mature semble donc présenter une légère baisse de son pouvoir inhibiteur sur la différenciation de la lignée femelle. Néanmoins, ce pouvoir inhibiteur est encore élevé ; ce comportement de la gonade est très différent de celui relevé en présence de tentacules prélevés sur des individus en phase femelle ou chez les témoins (explants gonadiques cultivés isolément). Dans ces deux derniers cas on assiste en effet à l'apparition de nettes poussées femelles.

b) Cultures de gonades infantiles en présence d'extraits de cerveaux "mâles"

La gonade infantile cultivée dans ces conditions se comporte comme si elle était cultivée seule ; après vingt-et-un jours de culture on y observe l'apparition de nombreux ovocytes (Pl. XVII, fig. b).

c) Cultures de gonades infantiles en présence d'extraits mixtes tentacules oculaires - cerveau obtenus à partir d'organes prélevés sur des animaux en phase mâle mature

Dans ce cas, la gonade infantile présente, au terme de la culture (vingt-et-un jours), un aspect semblable à celui de l'ovotestis cultivé en présence d'extraits tentaculaires "mâles", seuls quelques rares ovocytes sont présents.

* Dans un deuxième temps, nous avons recherché l'influence d'extraits de tentacules ou de cerveaux "mâles" obtenus à partir de donneurs au stade 4a de leur cycle génital sur l'évolution d'associations gonade infantile - tentacules (ou cerveaux) "infantiles" ou "femelles" (tableau XII).

TABLEAU XII

DIFFERENCIATION DE LA LIGNEE FEMELLE DANS DES GONADES INFANTILES CULTIVEES ISOLEMENT OU EN ASSOCIATION AUTOLOGUE OU HETEROLOGUE AVEC LE COMPLEXE CEPHALIQUE TENTACULES OCULAIRES - CERVEAU EN PRESENCE D'EXTRAITS TENTACULAIRES OU CEREBRAUX "MÂLES" (CULTURES SUR MILIEU LIQUIDE).

Durée de culture : 21 jours Nature de L'extrait introduit dans le milieu de culture	Association effectuée				
	aucune (Gi isolée)	Gi - Ti	Gi - Ci	Gi - T♀	Gi - C♀
aucun (milieu sans extrait)	+++ (11)*				
T ♂			± (9)		± (11)
C ♂		0 et ±** (12)		+++ (8)	

Gi : gonade infantile ; Gi - Ti et Gi - Ci : association autologue de la gonade infantile avec les tentacules oculaires "infantiles" (Gi - Ti) ou le cerveau "infantile" (Gi - Ci) ; Gi - T♀ et Gi - C♀ : association hétérologue de la gonade infantile avec les tentacules oculaires "femelles" (Gi - T♀) ou le cerveau "femelle" (Gi - C♀) ; T ♂ et C ♂ : extrait tentaculaire (T) ou cérébral (C) préparé à partir d'animaux en phase mâle mature (♂).

0 : *statu quo* ; ± : rares ovocytes ; +++ : poussées ovocytaires.

* Entre parenthèses est figuré le nombre de cultures exploitables.

** Pour détails, voir le texte.

a) Associations autologues gonades infantiles - cerveaux "infantiles" cultivées en présence d'extraits de tentacules oculaires "mâles"

Cultivée pendant vingt-et-un jours, la gonade renferme au terme de la culture quelques rares ovocytes (Pl. XVII, fig. c). Ce résultat est à rapprocher de ceux obtenus en associant la gonade infantile avec un complexe céphalique autologue ou en la cultivant en présence d'extrait mixte tentacules - cerveau "mâle". Par contre, il diffère de celui obtenu en cas d'association autologue au stade infantile de la gonade avec le cerveau (apparition dans ce cas de poussées femelles). L'efficacité du tentacule en phase mâle est donc ainsi confirmée : il est inhibiteur de la différenciation de la lignée femelle et empêche en culture l'apparition de poussées ovocytaires.

b) Associations hétérologues gonades infantiles - cerveaux "femelles" cultivées en présence d'extraits de tentacules "mâles"

L'adjonction dans le milieu d'un tel extrait tentaculaire empêche l'apparition des nettes poussées relevées dans le cas de cultures de gonades infantiles associées au complexe céphalique ou au seul cerveau "femelles"; seuls quelques ovocytes sont repérables après vingt-et-un jours de culture (Pl. XVII, fig. d).

c) Associations autologues gonades infantiles - tentacules oculaires "infantiles" cultivées en présence d'extraits de cerveaux "mâles"

Après vingt-et-un jours d'évolution, on constate que dans la majorité des cultures (huit cas sur douze), la présence des tentacules "infantiles" empêche toute apparition d'ovocytes (Pl. XVII, fig. e), comme dans les cas d'associations autologues gonade - tentacules au stade infantile. Cependant, on remarque parfois (cas de quatre cultures sur douze) un à deux ovocytes comme on avait pu l'observer dans les cas de cultures de gonades infantiles associées à des complexes céphaliques autologues.

d) Associations hétérologues gonades infantiles - tentacules "femelles" cultivées en présence d'extraits de cerveaux "mâles"

On enregistre dans la gonade ainsi cultivée pendant vingt-et-un jours, l'apparition de poussées femelles décelables par la présence de nombreux jeunes ovocytes (Pl. XVII, fig. f). Ce type de culture ne permet pas de conclure sur le rôle du cerveau "mâle" vu la tendance à la féminisation d'une gonade cultivée isolément, mais confirme la perte du pouvoir inhibiteur du tentacule en phase femelle (résultat à rapprocher de ceux obtenus en cas de cultures de gonades infantiles en association avec le complexe céphalique "femelle" ou les seuls tentacules "femelles").

4 - Discussion et Conclusion

En conclusion, cette première série de cultures fournit des données quant à la différenciation sexuelle des limaces. Elle permet d'établir que :

- la gonade infantile cultivée isolément en dehors de toute influence hormonale évolue dans le sens femelle.

- Le tentacule oculaire est, dès le stade infantile, inhibiteur de la différenciation de la lignée femelle. Il conserve ce pouvoir en phase mâle, bien que réduit, mais perd cette faculté au cours de la phase femelle.

- L'influence du cerveau sur l'évolution de la lignée femelle est difficilement interprétable compte tenu de la tendance qu'a une gonade infantile à évoluer dans le sens femelle. Il est en effet difficile de dissocier le phénomène d'autodifférenciation femelle de l'action d'un éventuel facteur favorisant la lignée femelle. Il se peut donc que les poussées ovocytaires enregistrées en culture dans les cas d'association avec cet organe ou d'adjonction d'extraits ne soient qu'un phénomène secondaire dû à l'absence des tentacules oculaires.

Il faut néanmoins remarquer que dans le cas de cultures d'associations autologues gonade - tentacules "infantiles" en présence de cerveaux "infantile" ou "femelle" ou d'extrait de cerveaux "mâles", on assiste, dans certains cas, après trois semaines de culture, à l'apparition, malgré la présence des tentacules "infantiles", d'un à deux ovocytes par acinus en plus de la présence de spermatogonies.

B - CULTURES DE GONADES JUVENILES

La culture de gonades infantiles associées à des complexes céphaliques autologues ou hétérologues ne permet pas de juger de l'accroissement des ovocytes mais plutôt de la différenciation de la lignée femelle. Nous avons donc effectué des cultures d'ovotestis juvéniles (stade 2 : stade auquel les acini sont hermaphrodites) et éprouvé les organes susceptibles d'avoir une action sur le tissu germinal.

Dans un premier temps, ces gonades ont été cultivées sur milieu semi-solide, isolément ou en association avec l'ensemble ou une partie de complexes céphaliques autologues (prélevés sur des limaces infantiles, c'est-à-dire se trouvant au stade 1 de leur cycle sexuel) ou hétérologue. Puis, la réalisation de cultures sur milieu liquide a permis l'adjonction au milieu d'extraits tentaculaires, cérébraux ou mixtes (tentacules oculaires - cerveau) homologues ou hétérologues préparés à partir d'animaux adultes en fin de phase mâle (stade 4b du cycle génital) ou en phase femelle (stade 5 du cycle sexuel).

Pour chaque série, des fragments témoins des gonades explantées sont fixés au moment de la mise en culture. Ils autorisent un examen histologique de l'état de la gonade à l'explantation. Ce dernier, comparé à celui des parties cultivées, permet de juger du degré d'évolution atteint en culture.

Dans cette glande hermaphrodite juvénile (Pl. XVIII, fig. a), les deux lignées gamétogénétiques sont représentées par des spermatogonies et par des ovocytes présentant un diamètre compris entre 10 et 45 μm ; il est ainsi possible de suivre dans les explants gonadiques cultivés l'évolution des lignées mâle et femelle.

TABLEAU XIII

EVOLUTION DES LIGNEES MÂLE ET FEMELLE DANS DES GONADES JUVENILES CULTIVEES ISO-LEMENT OU EN ASSOCIATION AUTOLOGUE OU HETEROLOGUE AVEC LE COMPLEXE CEPHALIQUE TENTACULES OCULAIRES - CERVEAU. (CULTURES SUR MILIEU GELOSE).

Durée de culture : 21 jours		Type de culture effectuées						
		Gonade juvénile isolée	Associations autologues			Associations hétérologues		
Organe(s) associé(s) à la gonade juvénile		—	<i>T-C_j</i>	<i>T_j</i>	<i>C_j</i>	<i>T-C_i</i>	<i>T_i</i>	<i>C_i</i>
Nombre de cultures exploitables		33	21	37	19	11	12	14
Evolution de la lignée femelle	N_0	+++	0 et +	0	+++	0	0	+++
	\varnothing_0	0 et Δ	0 et Δ	0 et Δ	$\Delta\Delta$ et $\Delta\Delta\Delta$	0 et Δ	0 et Δ	0 et Δ
Evolution de la lignée mâle		—	0	+	0	0	0	0

T : tentacules oculaires ; *C* : cerveau ; *T-C* : complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau ; *i* et *j* : prélevé(s) sur des animaux infantiles (*i*) ou juvéniles (*j*).

N_0 : comparaison du nombre d'ovocytes répertoriés dans le fragment gonadique cultivé par rapport à celui enregistré dans le fragment témoin prélevé au moment de la mise en culture.

\varnothing_0 : Evolution du diamètre ovocytaire maximal en comparaison avec celui des témoins prélevés au moment de la mise en culture.

- quelques ovocytes présentant } une légère augmentation (10 μm) de ce diamètre : Δ
 une augmentation importante (25 μm) de ce diamètre : $\Delta\Delta$

- de nombreux ovocytes présentant } une légère augmentation (10 μm) de ce diamètre : $\Delta\Delta\Delta$

0 : *statu quo* ; - : régression ; + : légère augmentation (N_0) ou légère stimulation (évolution de la lignée mâle) ; +++ : stimulation nette (lignée mâle) ou forte augmentation (N_0).

Les explants sont fixés après quinze à vingt-huit jours de culture.

Les tableaux XIII, XIV, XV, XVI et XVII, récapitulent les résultats obtenus.

1 - Cultures sur milieu gélosé

Elles se sont poursuivies sur une durée de trois semaines. Les résultats sont consignés dans les tableaux XIII et XIV.

a) Cultures de gonades juvéniles isolées

Un tel explant cultivé *in vitro* en milieu an hormonal présente dans ses acini une nette régression de la lignée mâle. On aboutit ainsi, après vingt-et-un jours de culture, à l'obtention d'un ovotestis renfermant essentiellement des ovocytes en grand nombre (Pl. XVIII, fig. b, c, d).

b) Cultures de gonades juvéniles associées à tout ou partie de complexes céphaliques autologues ou hétérologues (prélevés sur des animaux en phase infantile)

α) Associations autologues

.....
Dans un premier temps, le complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau a été éprouvé (tableau XIII).

◦ Association gonade - complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau

Dans ce cas d'association triple, on remarque après trois semaines de culture (Pl. XVIII, fig. e) que l'aspect histologique de l'ovotestis est assez proche de celui du fragment témoin prélevé au moment de la mise en culture.

◦ Association gonade - tentacules oculaires

Après quinze ou vingt-et-un jours de culture, ces explants gonadiques présentent une multiplication du nombre des spermatogonies (Pl. XIX, fig. b). Il arrive que la lignée femelle soit touchée, ce qui se traduit alors par l'apparition, en bordure des tentacules, de quelques ovocytes en dégénérescence, reconnaissables à un début de vacuolisation du cytoplasme (Pl. XIX, fig. a). En aucun cas, on n'observe d'apparition de jeunes ovocytes.

◦ Association gonade - cerveau

Ce dernier cas d'association autologue permet de mettre en évidence l'influence directe du cerveau d'un animal sur son propre tissu gonadique. Une gonade juvénile associée au cerveau révèle, après quinze

TABLEAU XIV

EVOLUTION DES LIGNEES MÂLE ET FEMELLE DANS DES GONADES JUVENILES CULTIVEES ISO-LEMENT OU EN ASSOCIATION AUTOLOGUE OU HETEROLOGUE AVEC LE COMPLEXE CEPHALIQUE TENTACULES OCULAIRES - GANGLIONS CEREBROÏDES. (CULTURES SUR MILIEU GELOSE).

Durée de culture : 21 jours		Type de culture effectuée						
		Gonade Juvénile isolée	Associations autologues			Associations hétérologues		
Organe(s) associé(s) à la gonade juvénile		—	<i>T-ggCj</i>	<i>Tj</i>	<i>ggCj</i>	<i>T-ggCi</i>	<i>Ti</i>	<i>ggCi</i>
Nombre de cultures exploitables		21	21	27	23	18	22	20
Evolution de la lignée femelle	N_0	+++	0 et +	0	+++	0 et +	0	+++
	\emptyset_0	0 et Δ	0 et Δ	0 et Δ	$\Delta\Delta$ et $\Delta\Delta\Delta$	0 et Δ	0 et Δ	0 et Δ
Evolution de la lignée mâle		—	0	+	0	0	0	0

T : tentacules oculaires ; *ggC* : ganglions cérébroïdes ; *T-ggC* : complexe céphalique tentacules oculaires - ganglions cérébroïdes ; *i* et *j* : prélevé(s) sur des animaux infantiles (*i*) ou juvéniles (*j*).

N_0 : comparaison du nombre d'ovocytes répertoriés dans le fragment gonadique cultivé par rapport à celui enregistré dans le fragment témoin prélevé au moment de la mise en culture.

\emptyset_0 : Evolution du diamètre ovocytaire maximal en comparaison avec celui des témoins prélevés au moment de la mise en culture.

- quelques ovocytes présentent } une légère augmentation (10 μ m) de ce diamètre : Δ
 une augmentation importante (25 μ m) de ce diamètre : $\Delta\Delta$

- de nombreux ovocytes présentent } une légère augmentation (10 μ m) de ce diamètre : $\Delta\Delta\Delta$

0 : *statu quo* ; — : régression ; + : légère augmentation (N_0) ou légère stimulation (évolution de la lignée mâle) ; +++ : stimulation nette (lignée mâle) ou forte augmentation (N_0).

jours ou vingt-et-un jours de culture (Pl. XIX, fig. c) la présence d'ovocytes de diamètre supérieur à celui enregistré chez les témoins, ceux de plus grande taille pouvant atteindre un diamètre de 65 μm , plus particulièrement dans la portion de la gonade située à proximité des ganglions cérébroïdes. De plus, quelques acini renferment plusieurs ovocytes (Pl. XIX, fig. d), ce qui peut probablement s'expliquer par l'absence des tentacules oculaires. On constate d'autre part, un bon maintien de la lignée mâle (spermatogonies).

A la suite des résultats obtenus *in vivo*, ces séries de cultures qui avaient fait l'objet d'une publication (WATTEZ, 1978) ont été reprises afin de préciser la part prise par les ganglions cérébroïdes dans l'effet du cerveau. L'influence de complexes céphaliques tentacules oculaires - ganglions cérébroïdes a donc été recherchée (Tableau XIV).

◦ Association gonade - complexe céphalique tentacules oculaires - ganglions cérébroïdes

Dans ce cas d'association, l'aspect de l'explant cultivé pendant vingt-et-un jours est assez semblable à celui du fragment fixé au moment de la mise en culture. La lignée mâle est toujours représentée par des spermatogonies et l'on n'observe pas de poussée ovocytaire.

◦ Association gonade - ganglions cérébroïdes

Au terme de la culture (vingt-et-un jours), le nombre d'ovocytes présents dans l'explant gonadique cultivé est nettement supérieur à celui enregistré dans le fragment témoin prélevé au moment de la mise en culture (phénomène dû à l'absence des tentacules). Les ovocytes dont le diamètre est compris entre 45 et 60 μm sont nombreux par comparaison avec ceux du fragment témoin prélevé lors de l'explantation ; quelques uns peuvent même atteindre la taille de 65 à 70 μm (Pl. XIX, fig. e). Ainsi, les ganglions cérébroïdes des limaces juvéniles entraînent l'apparition d'ovocytes plus gros que ceux trouvés dans les fragments témoins cultivés isolément. Ils sont donc efficaces et représentent la partie active du cerveau.

β) Associations hétérologues

.....
Les résultats obtenus sont figurés dans les tableaux XIII et XIV.

◦ Cultures de gonades juvéniles associées avec le complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau "infantile" ou avec les seuls tentacules "infantiles"

Si l'on compare l'évolution des fragments gonadiques cultivés dans ces conditions à celle des explants gonadiques cultivés isolément, on constate après vingt-et-un jours de culture que la lignée mâle (spermatogonies) se maintient beaucoup mieux dans les cas d'associations.

Le nombre d'ovocytes présents dans l'explant gonadique associé au complexe (Pl. XVIII, fig. f) ou aux tentacules, est proche de celui observé dans le fragment témoin prélevé au moment de la mise en culture ; le diamètre des ovocytes n'augmente que très peu (tableau XIII).

L'association autologue gonade - tentacules avait montré l'activité du tentacule oculaire au stade infantile. La confirmation en est donnée ici en associant un tel tentacule à une gonade juvénile. En effet, sa seule présence empêche l'apparition de poussées ovocytaires.

- Cultures de gonades juvéniles associées avec le cerveau "infantile"

L'examen histologique d'un explant gonadique ainsi cultivé durant vingt-et-un jours (Pl. XIX, fig. f) révèle que les ovocytes y sont plus nombreux que dans le fragment prélevé au moment de la mise en culture mais qu'ils ne présentent pas un diamètre plus important que dans une gonade cultivée isolément. La lignée mâle, représentée par des spermatogonies, se maintient bien.

Ces trois types d'associations hétérologues ont été reconduits en substituant au cerveau les seuls ganglions cérébroïdes. Ces derniers, comme l'ont montré les résultats obtenus, représentent la partie active du cerveau (se référer au tableau XIV).

2 - Cultures sur milieu liquide

Elles ont été effectuées parallèlement à celles réalisées sur milieu semi-solide, afin de vérifier l'efficacité des extraits utilisés. Les résultats obtenus ont été publiés (WATTEZ, 1978).

Quatre types de cultures ont été pratiquées :

- cultures de glandes génitales isolées,
- cultures d'ovotestis après adjonction au milieu de culture d'extraits pouvant être de l'un des trois types suivants :
 - . tentaculaires, dont la dose, équivalente à deux tentacules, est renouvelée tous les six jours,
 - . cérébraux, dont la dose, équivalente à un cerveau, est renouvelée tous les six jours,
 - . mixtes, renouvelés tous les six jours, à une dose équivalente à un complexe céphalique (deux tentacules oculaires + un cerveau).

Les tableaux XV, XVI et XVII récapitulent les observations effectuées après vingt-et-un jours de culture sur milieu liquide.

TABEAU XV

EVOLUTION DES LIGNEES MÂLE ET FEMELLE DANS DES GONADES JUVENILES CULTIVEES ISOLEMENT OU EN PRESENCE D'EXTRAITS HOMOLOGUES TENTACULAIRES, CEREBRAUX OU MIXTES. (CULTURES SUR MILIEU LIQUIDE).

Durée de culture : 21 jours	Milieu de culture sans extrait	Nature de l'extrait introduit dans le milieu de culture			
		<i>T-Cj</i>	<i>Tj</i>	<i>Cj</i>	
Nombre de cultures exploitables	22	24	31	27	
Evolution de la lignée femelle	N_0	+++	0 et +	0	+++
	\varnothing_0	0 et Δ	0 et Δ	0 et Δ	$\Delta\Delta$ et $\Delta\Delta\Delta$
Evolution de la lignée mâle	—	0	+	0	

TC : extrait mixte (tentacules oculaires - cerveau) ; *T* : extrait tentaculaire ; *C* : extrait cérébral ; *j* : préparé à partir d'organes d'animaux en phase juvénile de leur cycle génital.

N_0 : comparaison du nombre d'ovocytes répertoriés dans le fragment gonadique cultivé par rapport à celui enregistré dans le fragment témoin prélevé au moment de la mise en culture.

\varnothing_0 : Evolution du diamètre ovocytaire maximal en comparaison avec celui des témoins prélevés au moment de la mise en culture.

- quelques ovocytes présentent } une légère augmentation (10 μ m) de ce diamètre : Δ
 une augmentation importante (25 μ m) de ce diamètre : $\Delta\Delta$

- de nombreux ovocytes présentent } une légère augmentation (10 μ m) de ce diamètre : $\Delta\Delta\Delta$

0 : *statu quo* ; — : régression ; + : légère augmentation (N_0) ou légère stimulation (évolution de la lignée mâle) ; +++ : stimulation nette (lignée mâle) ou forte augmentation (N_0).

a) Cultures de gonades juvéniles isolées

L'étude histologique (Pl. XX, fig. a) d'un tel explant cultivé pendant vingt-et-un jours en dehors de toute influence hormonale aboutit à deux constatations :

- La première est relative à la lignée femelle ; on observe une augmentation du nombre d'ovocytes présents dans l'ovotestis, vraisemblablement due à une autodifférenciation, et à l'apparition de quelques ovocytes dont le diamètre peut atteindre 55 μm .
- La seconde concerne la lignée mâle : elle est représentée par quelques spermatogonies mais est en nette régression.

b) Cultures de gonades juvéniles en présence d'extraits homologues, partiels ou totaux, de complexes céphaliques

Les fixations, à titre de comparaison avec les cultures réalisées sur milieu gélosé, ont été échelonnées de quinze à vingt-huit jours après l'explantation. Le tableau XV est consacré aux résultats obtenus après vingt-et-un jours de culture.

L'adjonction de tels extraits au milieu de culture permet de constater la persistance des deux lignées, mâle et femelle. Cependant, suivant l'extrait éprouvé, on observe des différences dans l'évolution de l'ovotestis.

α) Adjonction d'extrait total du complexe céphalique
.....
tentacules oculaires - cerveau
.....

Cultivé pendant vingt-et-un (tableau XV ; Pl. XX, fig. b) ou vingt-huit jours, un tel explant n'évolue ni dans le sens mâle ni dans le sens femelle. En effet, à la fixation, la glande hermaphrodite révèle un aspect histologique typique d'une phase juvénile avec présence de spermatogonies et d'ovocytes retrouvés à la fréquence d'un à deux par acinus.

β) Adjonction d'extrait tentaculaire
.....

Au bout de vingt-et-un (tableau XV ; Pl. XX, fig. c) ou vingt-huit jours de culture, les deux lignées persistent. Comme dans le cas précédent où le tentacule est également présent, il n'apparaît pas de nouveaux ovocytes. La lignée mâle, quant à elle, paraît être parfois stimulée (mitoses spermatogoniales).

γ) Adjonction d'extrait cérébral
.....

Un fragment gonadique cultivé pendant vingt-et-un (tableau XV ; Pl. XX, fig. d) ou vingt-huit jours dans de telles conditions, révèle l'apparition de poussées femelles et la présence de quelques gros ovocytes (65 à 70 μm), la lignée mâle étant toujours représentée par des spermatogonies.

Les résultats fournis par ces séries de cultures poursuivies pendant vingt-et-un jours en milieu liquide (adjonction d'extraits) confirment ceux obtenus après culture sur milieu semi-solide (associations d'organes). Ceci nous a donc permis d'entreprendre des séries de cultures de gonades juvéniles en présence d'extraits hétérologues.

c) Cultures de gonades juvéniles en présence d'extraits hétérologues, partiels ou totaux, de complexes céphaliques

On peut rechercher l'influence des complexes céphaliques infantile et juvénile sur l'évolution de la gonade juvénile en culture en effectuant des associations d'organes. Par contre, étant donnée l'impossibilité de disposer à une même époque de donneurs juvéniles et adultes au cours du cycle naturel, celle du complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau des animaux en fin de phase mâle (stade 4b du cycle sexuel) et en phase femelle (stade 5 de ce même cycle) doit l'être par introduction dans le milieu de culture d'extraits tentaculaires, cérébraux ou mixtes.

Parallèlement à l'expérimentation *in vivo* nous avons donc éprouvé l'influence des complexes céphaliques de ces deux types de limaces sur des gonades juvéniles. Les trois types d'extraits sont employés à la même dose et renouvelés à la même fréquence que dans le cas des extraits homologues (voir p.95). Les fixations ont été effectuées après trois semaines de culture. Les résultats sont consignés dans les tableaux récapitulatifs XVI et XVII.

α) Cas du complexe céphalique tentacules oculaires -
.....
cerveau prélevé sur des animaux en fin de phase mâle
.....
(tableau XVI)
.....

◦ Adjonction d'extrait mixte (tentacules - cerveau)

Après trois semaines de culture (Pl. XXI, fig. a), on n'observe dans un tel explant gonadique que quelques ovocytes présentant un diamètre (70 μ m) supérieur à celui relevé au moment de la mise en culture (45 μ m). La lignée mâle n'est représentée que par des spermatogonies.

◦ Adjonction d'extrait tentaculaire

L'examen histologique du fragment gonadique cultivé pendant trois semaines (Pl. XXI, fig. b) montre que les ovocytes présentent un aspect semblable à celui observé lors de la mise en culture. Seuls quelques uns présentent une augmentation de leur diamètre qui atteint 55 μ m. On observe fréquemment des mitoses spermatogoniales.

◦ Adjonction d'extrait cérébral

En présence d'un tel extrait, on constate après vingt-et-un jours de culture (Pl. XXI, fig. c) que les ovocytes sont beaucoup

TABLEAU XVII

EVOLUTION DES LIGNEES MÂLE ET FEMELLE DANS DES GONADES JUVENILES CULTIVEES ISOLEMENT OU EN PRESENCE D'EXTRAITS HETEROLOGUES TENTACULAIRES, CEREBRAUX OU MIXTES "FEMELLES". (CULTURES SUR MILIEU LIQUIDE).

Durée de culture : 21 jours	Milieu de culture sans extrait	Nature de l'extrait introduit dans le milieu de culture		
		<i>TC</i> ♀	<i>T</i> ♀	<i>C</i> ♀
Nombre de cultures exploitables	14	14	14	16
Evolution de la lignée femelle	N_0	+++	+++	+++
	\varnothing_0	0 et Δ	$\Delta\Delta\Delta\Delta$	0 et Δ
Evolution de la lignée mâle	—	0 et —	—	0

TC : extrait mixte (tentacules - cerveau) ; *T* : extrait tentaculaire ; *C* : extrait cérébral ; ♀ : préparé à partir d'organes d'animaux en phase femelle de leur cycle génital.

N_0 : comparaison du nombre d'ovocytes répertoriés dans le fragment gonadique cultivé par rapport à celui enregistré dans le fragment témoin prélevé au moment de la mise en culture.

\varnothing_0 : évolution du diamètre ovocyttaire maximal en comparaison avec celui des témoins prélevés au moment de la mise en culture.

- quelques ovocytes présentent une légère augmentation (10 μ m) de ce diamètre : Δ

- de nombreux ovocytes présentent une augmentation importante (25 μ m) de ce diamètre : $\Delta\Delta\Delta\Delta$

0 : *statu quo* ; — : régression ; + : légère augmentation (N_0) ou légère stimulation (évolution de la lignée mâle) ; +++ : stimulation nette (lignée mâle) ou forte augmentation (N_0).

plus nombreux qu'au moment de l'explantation. De plus, parmi ceux-ci un grand nombre présentent un accroissement notable de leur diamètre qui peut atteindre 70 μm . Comparée à celle des fragments témoins prélevés au moment de la mise en culture, l'évolution de la lignée mâle est normale.

8) Cas du complexe céphalique tentacules oculaires -
cerveau prélevé sur des animaux en phase femelle
(tableau XVII)

- Adjonction d'extrait mixte (tentacules oculaires -
cerveau)

On observe après vingt-et-un jours de culture des poussées femelles et de nombreux ovocytes présentent un diamètre (70 μm) nettement supérieur à celui enregistré lors de la mise en culture (Pl. XXI, fig. d).

- Adjonction d'extrait tentaculaire

L'aspect d'un explant gonadique cultivé pendant trois semaines dans ces conditions (Pl. XXI, fig. e) est assez semblable à celui d'une gonade juvénile cultivée isolément, ce qui montre l'inefficacité des tentacules des individus parvenus au stade femelle.

- Adjonction d'extrait cérébral

Dans ce cas, après trois semaines de culture (Pl. XXI, fig. f), les ovocytes sont en nombre plus important que lors de la mise en culture. De plus, ceux présentant un accroissement notable de leur diamètre, qui peut atteindre 70 μm , sont nombreux.

3 - Discussion et Conclusion

Les résultats obtenus dans cette deuxième série expérimentale permettent d'aboutir aux conclusions suivantes :

- la gonade juvénile cultivée isolément présente une tendance à la féminisation.

- Les extraits d'organes obtenus à partir de l'ensemble ou d'une partie du complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau ont sur la gonade d'*Arion subfuscus* des effets assez semblables à ceux observés à la suite d'associations *in vitro* d'organes entiers.

- Le complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau favorise le maintien de la lignée mâle en culture.

- Les tentacules oculaires sont en phases infantile et juvénile et en fin de stade mâle inhibiteurs de la différenciation de la lignée femelle ; ils empêchent *in vitro* l'apparition de poussées ovocytaires. Ceux

des limaces juvéniles et surtout ceux d'animaux en fin de phase mâle stimulent les mitoses spermatogoniales. Par contre, ceux des limaces en phase femelle sont inefficaces.

- Si le cerveau stimule, dès la phase juvénile, l'accroissement des ovocytes, il est particulièrement efficace chez les adultes en fin de phase mâle ou en phase femelle. En effet, une culture prolongée de gonade juvénile en présence d'extraits de cerveaux adultes montre après vingt-et-un jours un accroissement important du volume de nombreux ovocytes. Le diamètre des ovocytes les plus volumineux qui était de 45 μm au moment de l'explantation passe à 70 μm .

III - DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

Les résultats fournis par les cultures de gonades infantiles et juvéniles apportent des données relatives à la différenciation sexuelle et au fonctionnement de la gonade.

A - L'AUTODIFFERENCIATION FEMELLE

L'autodifférenciation ovocytaire a été démontrée primitivement chez les Crustacés Amphipodes (CHARNIAUX-COTTON : 1957, 1959 ; CHARNIAUX-COTTON et GINSBURGER-VOGEL, 1962) puis décrite chez d'autres Invertébrés hermaphrodites ou gonochoriques (se référer aux revues de CHARNIAUX-COTTON, 1965 et de GUYARD, 1971 a).

Il semble bien que ce phénomène soit également la règle chez les Mollusques Gastéropodes. En effet, chez les Prosobranches, STREIFF (1967 c) a montré chez *Calyptraea sinensis* en cultivant isolément des gonades immatures ou en phase mâle active, que les gonies indifférenciées évoluent, en l'absence de toute substance hormonale, en ovocytes. De même, LUBET et STREIFF (1969) ont constaté dans certains cas, chez *Crepidula fornicata*, la présence d'un certain nombre d'ovocytes et une dégénérescence de la spermatogenèse dans des gonades de mâles jeunes cultivées pendant vingt-et-un jours sur milieu an-hormonal. Chez les Pulmonés, GUYARD (1969 b, 1971 a) a établi, par cultures d'ébauches gonadiques d'escargots nouveau-nés de l'espèce *Helix aspersa*, que les cellules indifférenciées de l'ébauche évoluaient en gonocytes femelles.

Cependant, cette autodifférenciation femelle n'affecte que les gonocytes primordiaux, ce qui explique que si dans les gonades infantiles de limaces cultivées isolément en milieu an-hormonal on remarque l'apparition d'ovocytes, il y persiste toujours quelques spermatogonies.



B - LE RÔLE DU COMPLEXE CEPHALIQUE TENTACULES OCULAIRES - CERVEAU

1- En ce qui concerne la lignée mâle, la réalisation de cultures organotypiques a permis, par association de la gonade avec tout ou partie de complexes céphaliques et par adjonction au milieu de culture d'extraits partiels ou totaux de ce même complexe céphalique, de montrer que ce dernier est nécessaire chez les limaces au maintien de la lignée mâle en culture. Cette observation concorde avec les conclusions de BAILEY (1973).

De plus, ces mêmes cultures ont permis de constater que les tentacules oculaires prélevés chez des animaux juvéniles ou en fin de phase mâle provoquaient une stimulation des mitoses spermatogoniales, particulièrement dans le dernier cas. Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu par GOMOT (1973) chez *Helix aspersa*. Cet auteur, en effectuant l'association d'un fragment d'ovotestis en état d'activité avec le tentacule oculaire a distingué dans l'explant gonadique ainsi cultivé la présence de foyers de multiplication spermatogonale très abondants. Il en a conclu que le tentacule oculaire de l'escargot stimulait cette dernière.

2- L'influence du complexe céphalique sur la lignée femelle peut être subdivisée en deux volets concernant l'un les tentacules oculaires et l'autre le cerveau.

a) Influence des tentacules oculaires

Les résultats obtenus en culture organotypique démontrent que les tentacules oculaires sont très actifs en phases infantile et juvénile. Ils sont inhibiteurs de la différenciation de la lignée femelle, leur seule présence empêchant l'apparition de poussées femelles.

Prélevés sur des animaux en fin de phase mâle, leur pouvoir inhibiteur est toujours élevé mais à un moindre degré, ce qui se traduit dans les gonades infantiles cultivées en présence d'extraits de ces organes par l'apparition de quelques ovocytes. Par contre, les tentacules sont inefficaces en phase femelle.

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux obtenus par GUYARD (1971 a) et GOMOT (1973) chez l'escargot *Helix aspersa*.

GUYARD (1971 a) a montré que l'association autologue ébauche gonadique indifférenciée - tentacules oculaires aboutit à une "inhibition de l'autodifférenciation ovocytaire qui ne se manifeste pas et à un *statu quo* de l'activité mâle". De même, si cet auteur associe en culture une ébauche gonadique avec un tentacule oculaire excisé chez un adulte, l'autodifférenciation femelle ne se manifeste pas davantage.

GOMOT (1973) constate dans un ovotestis d'animal adulte sorti d'hibernation depuis deux mois cultivé en association avec un tentacule oculaire d'escargot en activité que les gros ovocytes présents dans la gonade conservent un aspect normal mais que l'on ne rencontre guère de jeunes ovocytes.

Ainsi, les résultats fournis par les cultures organotypiques confirment et précisent ceux obtenus *in vivo* après tentaculectomies accompagnées ou non d'injections répétées d'extraits tentaculaires quant au rôle des tentacules oculaires sur la différenciation de la lignée femelle.

b) Influence du cerveau

Dans le cas de cultures de gonades infantiles, l'interprétation du rôle du cerveau est difficile étant donnée la tendance que présente une gonade isolée à évoluer dans le sens femelle ; il n'est en effet alors pas possible de dissocier une action propre du cerveau d'un effet consécutif à l'absence des tentacules oculaires. Cette dernière pourrait être à l'origine des poussées ovocytaires enregistrées en culture.

Les cultures de gonades juvéniles apportent quant à elles la preuve que si le cerveau n'a pas, chez les limaces infantiles, d'influence sur l'accroissement des ovocytes, il exerce dès la phase juvénile, mais plus particulièrement chez les adultes en fin de phase mâle ou en phase femelle, un effet stimulateur sur l'accroissement des ovocytes. Ceci confirme les résultats obtenus *in vivo* par injection d'extraits de cerveaux à des animaux normaux ou castrés, détentaculés ou non.

Une telle influence du système nerveux central sur le fonctionnement de l'ovogenèse se retrouve chez divers Gastéropodes.

Chez les Prosobranches, STREIFF (1967 c) chez *Calyptraea sinensis* a réussi à démontrer, en associant à des ovaires autodifférenciés des systèmes nerveux, que seuls ceux prélevés sur des femelles en prévitellogenèse permettent la réalisation d'un début de vitellogenèse en culture. De même, CHOQUET (1969) a montré chez la patelle *Patella vulgata* que la vitellogenèse est déclenchée par un facteur émis au niveau du système nerveux central uniquement pendant la phase d'inversion ou au début de la vitellogenèse.

Chez les Pulmonés, selon GUYARD (1971 a), les ganglions cérébroïdes prélevés sur des adultes au moment du déclenchement de l'ovogenèse ont un effet favorable en culture sur l'accroissement des ovocytes de l'escargot *Helix aspersa*.

En conclusion, les résultats obtenus en cultures organotypiques montrent que :

- La réalisation du sexe femelle semble s'effectuer selon un processus d'autodifférenciation.

- Le complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau est nécessaire au maintien de la lignée mâle en culture.

- Les tentacules oculaires exercent un effet inhibiteur sur la différenciation de la lignée femelle et favorisent les mitoses spermatogoniales. Ils perdent ce pouvoir en phase femelle.

- L'accroissement des ovocytes est sous la dépendance du cerveau, particulièrement chez les adultes en fin de phase mâle ou en phase femelle.

Ainsi, ces séries de cultures apportent des éléments de réponse sur la participation du complexe céphalique dans la réalisation du sexe chez la limace et confirment, en les complétant, les résultats fournis par l'expérimentation *in vivo*.

CHAPITRE III

LE COMPLEXE CÉPHALIQUE
TENTACULES OCULAIRES-CERVEAU

Le complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau exerce une influence certaine sur la différenciation sexuelle et le fonctionnement de la gonade d'*Arion subfuscus*. Il importe donc de le décrire et de faire le point des recherches qui y ont été consacrées chez les limaces, afin de poser les bases d'une étude future relative à une tentative d'explication "structurale" des effets du tentacule et des ganglions cérébroïdes.

I - LES TENTACULES OCULAIRES

Les limaces, dont les yeux sont pédonculés (Stylommatophores) possèdent des tentacules oculaires. Ces organes sont capables de régénérer (CHETAIL, 1963). Ils ont fait l'objet des études de LANE (1962), BIERBAUER et TÖRÖK (1968), BIERBAUER et VIGH-TEICHMANN (1970), WRIGHT (1974), KATAOKA (1976).

A - OBSERVATIONS PERSONNELLES

Les ébauches des organes sensoriels apparaissent vers le dixième jour du développement embryonnaire : elles sont constituées, de part et d'autre de la masse buccale, par deux mamelons ectodermiques épaissis et symétriques. Vers le vingtième jour du développement (Pl. I, fig. a), l'oeil est presque parfaitement différencié.

Le tentacule oculaire d'*Arion subfuscus*, rétractile, possède une structure assez semblable à celle des Stylommatophores déjà étudiés (figure 13).

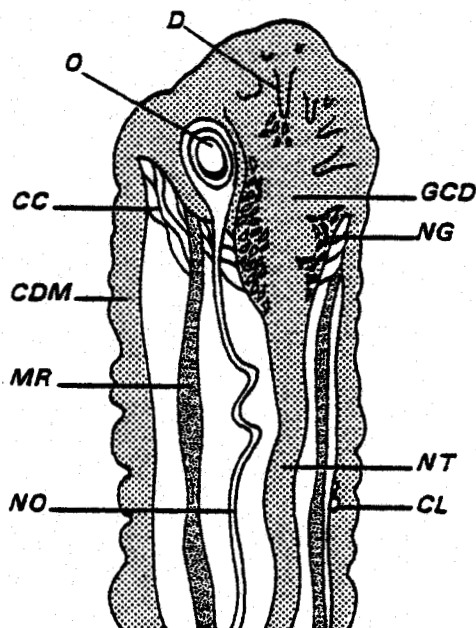


Figure 13 - Le tentacule oculaire des Stylommatophores (d'après LANE, 1962).
CC : cellules en collier ; CDM : couche "dermo-musculaire" ; CL : cellules latérales ; D : digitations ; GCD : ganglion central digité ; MR : muscle rétracteur du tentacule ; NG : neurones ganglionnaires ; NO : nerf optique ; NT : nerf tentaculaire ; O : oeil.

L'oeil est localisé le long du ganglion central digité, à l'extrémité distale du tentacule (Pl. XXII, fig. a).

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 envoie des prolongements en forme de doigt de gant, composés de fibres nerveuses, vers l'extrémité tentaculaire.

Des neurones périphériques au ganglion envoient des axones dans la masse fibreuse centrale (Pl. XXII, fig. b).

Entourant ce ganglion et l'oeil, on peut distinguer un collier de cellules formant un anneau incomplet (Pl. XXII, fig. a), d'où le nom de "collar cells" donné par LANE (1962). Ces cellules, d'une taille comprise entre 20 et 70 μm , présentent un noyau sphérique, parfois elliptique. Elles renferment dans leur cytoplasme de nombreux granules sphéroïdes (Pl. XXII, fig. c).

Des cellules similaires, mais situées latéralement, les cellules latérales, présentent également des granules de sécrétion dans leur cytoplasme (Pl. XXII, fig. d).

B - NATURE "ENDOCRINE" DU TENTACULE

L'ensemble des résultats expérimentaux obtenus chez les Stylomatophores plaide en faveur d'une fonction endocrine du tentacule. D'autre part, la notion de rôle endocrine étant corrélative de l'existence de structures cellulaires spécialisées, plusieurs auteurs se sont consacrés à leur recherche. Leur intérêt s'est porté essentiellement sur les cellules en collier que LANE (1962), considérait comme des neurones sensoriels modifiés. Celles-ci ont une relation morphologique étroite avec le ganglion tentaculaire ; cependant l'aspect ultrastructural des granules de sécrétion qu'elles renferment (LANE, 1964 ; RÖHLICH et BIERBAUER, 1966 ; ROGERS, 1969) diffère fortement de celui des granules élémentaires de neurosécrétion caractéristiques. Il est donc assez improbable qu'il s'agisse là de cellules neurosécrétrices comme l'avait prétendu LANE (1962).

Par ailleurs, il est maintenant prouvé que les cellules latérales sont exocrines (RÖHLICH et BIERBAUER, 1966 ; ROGERS, 1969 ; BIERBAUER et VIGH-TEICHMANN, 1970).

Ainsi, un rôle certain des tentacules oculaires dans la physiologie sexuelle des limaces a été mis en évidence. Cependant, aucune structure cellulaire de type endocrine n'a encore été identifiée. C'est pourquoi il conviendra de reprendre l'étude de cet organe et en particulier du ganglion tentaculaire.

II - LE CERVEAU

A - STRUCTURE

Formé par la fusion des neuf ganglions primitifs des Pulmonés en une structure complexe, le cerveau d'*Arion subfuscus* forme un collier périoesophagien. Cependant, on peut subdiviser ce système nerveux central en trois masses ganglionnaires : supraoesophagienne, pleuro-pariéto-viscérale et pédieuse (figure 14).

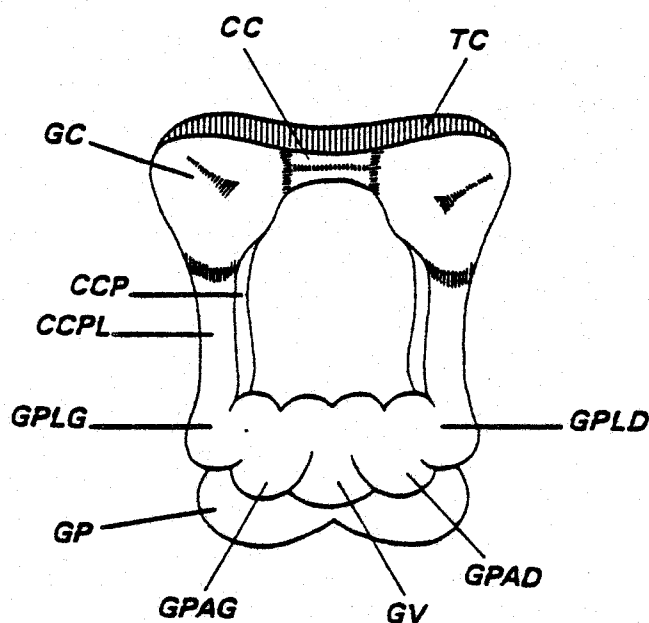


Figure 14 - Le cerveau d'*Arion subfuscus*.

CC : commissure cérébroïde ; CCP : connectif cérébro-pédiens ;
CCPL : connectif cérébro-pleural ; GC : ganglion cérébroïde ;
GP : ganglion pédieux ; GPAD : ganglion pariétal droit ;
GPAG : ganglion pariétal gauche ; GPLD : ganglion pleural droit ;
GPLG : ganglion pleural gauche ; GV : ganglion viscéral ; TC :
tissu conjonctif.

* 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 lobes constituant le ganglion cérébroïde. Les nerfs optiques et tentaculaires en sont issus.

- Le mésocérébron constitue la partie principale du ganglion cérébroïde ; il donne naissance à la commissure intercérébrale et au connectif cérébro-pleural.

- Le métacérébron est situé antérieurement.

* La masse ganglionnaire sous-oesophagienne

Elle comprend :

- La masse ganglionnaire pleuro-pariéto-viscérale, formée par la fusion des ganglions pleuraux et pariétaux latéraux et du ganglion viscéral médian.

- La masse ganglionnaire pédieuse, plus ventrale, dont sont issus les nerfs pédieux.

B - POSITION DU PROBLEME CONCERNANT LE LIEU D'ORIGINE DE LA SUBSTANCE RESPONSABLE DE L'INFLUENCE DES GANGLIONS CEREBROIDES SUR LE FONCTIONNEMENT DE LA GONADE

L'influence des ganglions cérébroïdes peut être due soit à une neurosécrétion soit aux corps dorsaux.

1 - La neurosécrétion cérébrale

Des cellules neurosécrétrices ont été décrites dans le cerveau et dans les ganglions buccaux chez plusieurs espèces de limaces (*Arion ater* : SMITH, 1966 b et 1967 - *Arion rufus* : HERLANT-MEEWIS et VAN MOL, 1959 ; VAN MOL, 1960 et 1967 - *Arion subfuscus* : HERLANT-MEEWIS et VAN MOL, 1959).

Seul VAN MOL (1967) a pu établir une relation entre cycle de neurosécrétion et cycle génital. Il a montré que chez les jeunes individus d'*Arion rufus*, des cellules neurosécrétrices sont présentes dans les ganglions cérébroïdes mais qu'elles ne manifestent aucune activité sécrétrice décelable ; ce n'est que vers l'âge de quatre à cinq mois que leur cytoplasme se remplit progressivement de grains de sécrétion. A la puberté, on

assiste à une activité intense de ces cellules avec accumulation de sécrétion dans le péricaryon et évacuation simultanée par voie axonale. Ce même auteur a également décrit en 1960 chez *Arion rufus* des traces importantes de neurosécrétion, tout le long du nerf de l'artère cérébrale ; à la suite de quoi il pense avoir trouvé 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".

Les neurones des Gastéropodes renferment un grand nombre d'inclusions cytoplasmiques de nature complexe, colorables par les techniques de mise en évidence de la neurosécrétion, ce qui entraîne "une utilisation parfois abusive du terme de cellule neurosécrétrice chez les Gastéropodes" (VAN MOL, 1967).

En utilisant la technique de coloration au Bleu Alcian - Jaune Alcian, mise au point chez *Lymnaea stagnalis* par WENDELAAR BONGA (1970), qui permet de différencier les cellules ayant des affinités différentes pour le bleu ou le jaune, l'intérêt des chercheurs s'est porté sur l'établissement de cartes des cellules neurosécrétrices cérébrales ; celles-ci ont jusqu'à présent pu être réalisées chez *Bulinus truncatus* (BOER, ROUBOS, VAN DALEN et GROESBEEK, 1977), *Helix aspersa* (KAI-KAI et KERKUT, 1979), *Arion hortensis* et *Agriolimax reticulatus* (WIJDENES, VAN MINNEN et BOER, 1978). Chez cette dernière espèce, il a été mis en évidence que certaines cellules neurosécrétrices ("medial cells") produisent une hormone qui stimule la croissance (WIJDENES et RUNHAM, 1977).

2 - Les corps dorsaux

Ces organes, ont été décrits et étudiés tout d'abord chez les Basommatophores (LEVER, 1958 ; JOOSSE, 1964 ; BOER, SLOT et VAN ANDEL, 1968) où ils sont situés sur la face dorsale des ganglions cérébroïdes. Ce sont des organes endocrines (BOER et JOOSSE, 1975) qui jouent un rôle dans la régulation de la reproduction (JOOSSE, 1979 a).

Chez les Stylommatophores, excepté chez *Succinea putris* (COOK, 1966), *Succinea elegans* (VAN MOL, 1967) et peut-être *Strophocheilus oblongus* (KUHLMANN, 1966) où ils forment des organes compacts, les corps dorsaux sont constitués par des groupes cellulaires dispersés dans le tissu conjonctif périganglionnaire entourant les ganglions cérébroïdes (NOLTE, 1965 et 1978 ; KUHLMANN, 1966 ; VAN MOL, 1967 ; OSTROUMOVA, 1975 ; KRUSCH, SCHODENMAKERS, VOOGT et NOLTE, 1979).

Chez la limace *Agriolimax reticulatus*, DUCE (1976) a montré que les corps dorsaux sont représentés par de petits groupes cellulaires séparés des vaisseaux sanguins et des lacunes par du tissu conjonctif. Leur fonction endocrine a été démontrée par WIJDENES et RUNHAM (1976).

Chez *Helix pomatia*, KRUSCH, SCHOENMAKERS, VOOGT et NOLTE (1979) ont récemment montré que les corps dorsaux pouvaient synthétiser des stéroïdes.

III - CONCLUSION

Cette brève analyse du complexe céphalique nous permet d'envisager un plan de recherche. Celui-ci comprendra une étude ultrastructurale du tentacule oculaire et de ses différents composants chez des animaux d'âges différents. De plus, en appliquant la technique du Bleu Alcian - Jaune Alcian, nous tenterons d'établir une carte des différents types de cellules neurosécrétrices présents dans le cerveau et de mettre en évidence une éventuelle relation entre cycles neurosécrétoires et cycle génital. Enfin, nous nous intéresserons aux corps dorsaux (inclus dans le conjonctif enveloppant les ganglions cérébroïdes) dont il conviendra d'étudier l'évolution au niveau ultrastructural.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le contrôle endocrine de la reproduction chez les Mollusques a fait l'objet de mises au point régulières (DURCHON, 1967 ; TOMBES, 1970 ; GOMOT, 1970 ; GUYARD, 1971 b ; MARTOJA, 1972 ; JOOSSE, 1972, 1976, 1979 a et b ; GOLDING, 1974 ; DURCHON et P. JOLY, 1978). Des articles ont été consacrés aux Gastéropodes (GOMOT, 1977 ; LE BRETON, 1979) ou plus particulièrement aux Pulmonés (JOOSSE, 1975 ; BOER et JOOSSE, 1975). Il conviendra donc de se reporter à ces publications pour y intégrer les résultats obtenus chez les limaces. De ces revues, il ressort que le complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau joue chez les Mollusques un rôle important dans les processus de sexualisation.

Chez les Gastéropodes, les travaux ont porté d'une part sur l'étude du cycle génital et des facteurs régissant la différenciation sexuelle et le fonctionnement de la gonade et, d'autre part, sur les corrélations fonctionnelles pouvant exister entre glande génitale, complexe céphalique et tractus génital.

Nous étant intéressé à la différenciation sexuelle et au fonctionnement de la gonade, il est tout d'abord utile de préciser ces termes :

- La différenciation sexuelle se caractérise par la sexualisation des protogonies.

- Le fonctionnement de la gonade concerne l'ensemble des phénomènes assurant la production des gamètes (multiplication, accroissement, maturation) et leur évolution dans les voies génitales.

Après avoir localisé la gonade chez l'embryon, c'est-à-dire à son stade le plus précoce, l'étude du cycle sexuel d'*Arion subfuscus* nous a permis de mettre en évidence l'existence de cellules souches et de cellules sexuelles indifférenciées (protogonies) morphologiquement identiques dans les deux sexes. De plus, nous avons pu établir les stades histologiques caractéristiques de l'évolution de la gonade et démontrer chez cette limace l'existence d'un hermaphrodisme successif à maturation asynchrone. Dans des recherches ultérieures, nous nous proposons de définir les différentes étapes de la vitellogenèse afin de pouvoir mieux interpréter les processus cellulaires qui aboutissent expérimentalement à une augmentation du diamètre des ovocytes.

Cette description du cycle génital a jeté les bases d'une approche expérimentale.

La réalisation d'ablations de tentacules oculaires, d'opérations chirurgicales (castrations), d'injections d'extraits tentaculaires et cérébraux et celle de cultures organotypiques nous a permis de préciser l'influence, au cours du cycle vital d'*Arion subfuscus*, du complexe céphalique

tentacules oculaires - cerveau sur la différenciation du sexe et le fonctionnement de la gonade.

Il a été démontré *in vitro* qu'une gonade infantile (définie par l'absence d'ovocytes) ou juvénile (caractérisée par la présence d'acini mixtes renfermant des ovocytes) cultivée isolément en milieu an hormonal évolue dans le sens femelle, ce que l'on constate chez plusieurs Gastéropodes (LE BRETON, 1979), et que la présence du complexe céphalique favorise le maintien de la lignée mâle en culture.

* L'influence des tentacules oculaires a été étudiée *in vivo* et *in vitro* :

- Des tentaculectomies ont été effectuées à l'éclosion sur des animaux indemnes de toute autre intervention ou sur des limaces juvéniles castrées quelques jours plus tard. Les deux types d'opérés ont alors subi des injections répétées de solution physiologique ou d'extraits de tentacules prélevés sur des animaux d'âges différents. En observant la gonade en cours de différenciation ou après sa régénération et par comparaison avec des animaux témoins représentés par des limaces normales recevant de la solution physiologique, nous avons pu constater que :

. l'ablation des tentacules oculaires provoque une nette féminisation de l'ovotestis ;

. les injections d'extraits tentaculaires corrigent l'effet produit par l'excision des tentacules ; totalement s'ils sont homologues ou obtenus à partir de donneurs juvéniles et partiellement s'ils sont préparés à partir d'animaux en phase mâle mature. Par contre, les injections d'extraits obtenus à partir de limaces en phase femelle sont inefficaces.

- La culture de gonades infantiles associées à l'ensemble du complexe céphalique : tentacules oculaires - cerveau, ou à l'une de ces deux composantes, a pu démontrer que la seule présence des tentacules "infantiles" empêche l'apparition des poussées ovocytaires enregistrées dans des gonades infantiles cultivées isolément. Ce pouvoir des tentacules oculaires est légèrement restreint en phase mâle mature et disparaît au stade femelle.

* L'influence des ganglions cérébroïdes a été mise en évidence par l'expérimentation *in vivo* et *in vitro*.

- La culture de la gonade juvénile en association avec un cerveau autologue ou en présence d'extraits cérébraux homologues (obtenus à partir de donneurs juvéniles) ou hétérologues (préparés à partir d'animaux adultes) a démontré le rôle stimulateur du cerveau sur l'accroissement des ovocytes ; ce rôle étant particulièrement net chez les adultes en fin de phase mâle ou en phase femelle.

- Parallèlement à la réalisation de cultures organotypiques, le rôle du cerveau a été confirmé et précisé *in vivo* par des injections répétées d'extraits cérébraux totaux ou partiels à des animaux normaux ou castrés, privés ou non de leurs tentacules. Celles-ci, sauf dans le cas d'injections d'extraits obtenus à partir de donneurs infantiles, ont montré que les extraits à base des seuls ganglions cérébroïdes provoquent une augmentation du diamètre des ovocytes. Les ganglions cérébroïdes constituent donc, particulièrement chez les adultes, la partie active du cerveau.

La participation du complexe céphalique dans le contrôle endocrine de la sexualité d'*Arion subfuscus* étant établie, nous analyserons successivement les rôles respectifs de ses deux composants, les tentacules oculaires et le cerveau, et les comparerons avec ceux démontrés chez d'autres Gastéropodes.

* Influence des tentacules oculaires chez les Gastéropodes

Chez les limaces, les premiers résultats relatifs à l'influence de ces organes sur l'évolution de la gonade ont été fournis par PELLUET et LANE (1961) et PELLUET (1964) à la suite de la réalisation de tentaculectomies suivies ou non d'injections d'extraits tentaculaires : les tentacules secrèteraient une hormone inhibitrice de l'ovogenèse, leur ablation provoquant dans la gonade une augmentation du nombre d'ovocytes pouvant être corrigée par injection d'extraits de ces mêmes organes. GOTTFRIED et DORFMAN (1970), après avoir effectué des ablations de tentacules sur de jeunes *Ariolimax californicus* "immatures" (ne possédant pas encore d'ovocytes dans leur gonade) ont obtenu un développement accéléré de la spermatogenèse ; ils en ont déduit après injections d'extraits tentaculaires à des limaces tentaculectomisées que le tentacule oculaire était impliqué dans le contrôle de la phase mâle de l'ovotestis. L'opposition de leurs résultats avec ceux de PELLUET et LANE est attribuée par ces auteurs à une différence d'espèce. Dans l'état actuel des recherches, il est impossible de proposer une interprétation valable.

Nos résultats démontrent l'influence inhibitrice des tentacules sur la différenciation de la lignée femelle, excepté en phase femelle. D'autre part, ceux obtenus en cultures organotypiques permettent de soupçonner un effet stimulateur sur les mitoses spermatogoniales, tout au moins lors des phases juvénile et mâle.

Une influence des tentacules oculaires sur la différenciation sexuelle et le fonctionnement de la gonade et du tractus génital se retrouve

chez de nombreux Prosobranches et Pulmonés Stylommatophores. Elle pose trois grands problèmes : celui de sa variabilité, celui de l'origine du facteur tentaculaire et enfin celui du cycle d'activité de ces organes au cours de la vie.

■ Si l'on considère tout d'abord celui de sa variabilité, on constate que ce rôle s'exerce généralement par voie inhibitrice sur la gamétogénèse et qu'il peut se situer :

. au niveau de la lignée femelle chez les Arionidés (*Arion ater*, *Arion subfuscus*, *Milax* sp. : PELLUET et LANE, 1961 ; PELLUET, 1964 - *Arion rufus* : BADINO, 1967), les Hélicidés (*Helix aspersa* : GUYARD, 1971 a ; GOMOT, 1973 - *Helix pomatia* : BIERBAUER, 1977, 1978 a et b), les Achatinidés (*Achatina fulica* : BERRY et CHAN, 1968) et les Soléolifères (*Laevicaulis alte* : NAGABHUSHANAM et KULKARNI, 1971).

. au niveau de la lignée mâle chez un Prosobranch (*Patella vulgata* : CHOQUET, 1969) et un Stylommatophore (*Ariolimax californicus* : GOTTFRIED et DORFMAN, 1970).

De plus, un rôle stimulateur sur la lignée mâle a également été attribué aux tentacules. Il peut s'exercer au niveau de la multiplication spermatogoniale (*Helix aspersa* : GOMOT, 1973) ou de la spermatogénèse (*Cryptozona belangeri* : RAJAN et SRIRAMULU, 1979).

TAKEDA (1977, 1979) a montré chez les Limacidés *Deroceras reticulatum* et *Limax flavus* un effet inhibiteur des tentacules sur la ponte.

Une influence des tentacules s'exerce également sur la différenciation du tractus génital et sur la croissance et l'activité des annexes glandulaires.

Les travaux effectués par STREIFF et ses collaborateurs chez les Prosobranches *Calyptraea*, *Crepidula*, *Littorina*, *Buccinum* et *Ocenebra* ont montré que le facteur morphogénétique du tractus génital mâle était libéré au niveau du tentacule oculaire droit. Chez l'Hélicidé *Eobania vermiculata*, NOPP (1971) constate à la suite d'une tentaculectomie, une augmentation du poids de la glande à albumen. MEENAKSHI et SCHEER (1969) chez le Stylommatophore *Ariolimax columbianus* ont mis en évidence un contrôle par les tentacules de la croissance de la glande de l'albumine ainsi qu'une inhibition par ces mêmes organes de la synthèse du galactogène. Chez *Helix aspersa*, l'inhibition tentaculaire s'exerce *in vitro* sur l'activité de la glande de l'albumine (COURTOT, 1977).

■ Le second problème concerne l'origine du facteur tentaculaire où deux hypothèses s'offrent actuellement : élaboration de la substance active par certaines cellules du tentacule ou origine extratentaculaire de cette substance qui serait libérée et stockée au niveau des tentacules (S. LE GALL et STREIFF, 1974).

■ Le dernier problème est relatif au cycle d'activité de ces organes au cours de la vie.

Notre expérimentation apporte des indications à ce sujet : très actifs au cours des stades infantile et juvénile, les tentacules ont un pouvoir restreint en phase mâle et sont inefficaces en phase femelle.

A la lumière des résultats obtenus, nos recherches futures seront tout d'abord consacrées à une étude du tentacule oculaire pour tenter de localiser l'origine du facteur mis en évidence et concerneront d'autre part ses relations nerveuses avec les ganglions cérébroïdes et son aspect ultrastructural au cours des différents stades gonadiques de l'animal. De plus, afin de rechercher s'il est possible chez les limaces, dont l'hermaphrodisme est naturel, de bloquer l'un des sexes et de transformer un hermaphrodite en individu unisexe, nous tenterons de priver les embryons de leurs tentacules dès la différenciation de ces derniers.

* Influence des ganglions cérébroïdes chez les Gastéropodes

Chez les limaces, PELLUET et LANE (1961) puis PELLUET (1964) ont obtenu en injectant des broyats de cerveaux chez *Arion ater*, *Arion subfuscus* et *Milax* sp. une augmentation du nombre d'ovocytes dans la gonade.

Nos résultats montrent que les ganglions cérébroïdes d'*Arion subfuscus* ont, excepté en phase infantile, un effet stimulateur sur l'accroissement des ovocytes, plus particulièrement chez les adultes en fin de phase mâle et en phase femelle.

Une influence des ganglions cérébroïdes sur l'évolution de la vitellogenèse a été démontrée chez les Stylommatophores et chez les Prosobranches.

GUYARD (1971 a) a pu montrer que chez *Helix aspersa* les ganglions cérébroïdes des adultes favorisent l'accroissement des ovocytes.

STREIFF (1967 c) chez *Calyptraea sinensis*, puis CHOQUET (1969) chez *Patella vulgata* ont mis en évidence l'existence d'un facteur émis au niveau du système nerveux central nécessaire à la réalisation de la vitellogenèse.

L'influence des corps dorsaux, formations étroitement accolées aux ganglions cérébroïdes chez les Basommatophores, a été envisagée par GERAERTS et JOOSSE (1975) qui ont prouvé que ces organes sont nécessaires à la réalisation de la vitellogenèse chez *Lymnaea stagnalis*. Chez le Stylommatophore *Agriolimax reticulatus*, WIJDENES et RUNHAM (1976) ont mis en évidence que la maturation des ovocytes nécessitait la présence des corps dorsaux.

Chez les Stylommatophores, tout prélèvement des ganglions cérébroïdes pour une mise en culture ou la préparation d'un extrait s'accompagne obligatoirement de celui des corps dorsaux localisés dans le conjonctif périganglionnaire ; l'effet des ganglions cérébroïdes ne peut donc être dissocié de celui des corps dorsaux qui reste à préciser chez la limace. Ainsi, se trouve posé le problème de connaître la partie active des ganglions cérébroïdes ; cette activité peut être attribuée à une neurosécrétion cérébrale ou aux corps dorsaux. La prochaine étape de notre travail consistera donc à étudier :

- . la structure des ganglions cérébroïdes et des corps dorsaux,
- . l'évolution de la neurosécrétion cérébrale au cours de la vie en vue d'établir une carte des différents types de cellules neurosécrétrices observés,
- . le cycle d'activité éventuel des corps dorsaux.

Parallèlement, nous essaierons de cultiver des gonades juvéniles en association avec des ganglions cérébroïdes privés ou non de leurs corps dorsaux par élimination du tissu conjonctif. Cette étude sera effectuée afin de déterminer la part revenant aux corps dorsaux dans l'effet stimulateur du cerveau sur la croissance des ovocytes.

En conclusion, nous avons établi, *in vivo* et *in vitro*, l'influence du complexe céphalique tentacules oculaires - ganglions cérébroïdes au cours de la vie sur la différenciation de la lignée femelle et sur le fonctionnement de la gonade d'*Arion subfuscus*. Nos travaux ont pu démontrer, comme chez de nombreux Invertébrés (HIGHNAM, 1978), l'existence d'un déterminisme endocrine.

Les résultats obtenus montrent que le tentacule oculaire est inhibiteur de la différenciation de la lignée femelle jusqu'à l'apparition de la phase femelle, son ablation entraînant une augmentation du nombre d'ovocytes

dans la gonade ; il sont à rapprocher de ceux enregistrés *in vivo* chez *Arion ater*, *Arion subfuscus* et *Milax sp.* [PELLUET et LANE (1961) et PELLUET (1964)] et *in vitro* chez *Helix aspersa* par GUYARD (1971 a).

Les ganglions cérébroïdes (difficilement dissociables des corps dorsaux) exercent un effet stimulateur, chez les animaux juvéniles et surtout chez les adultes, sur l'accroissement des ovocytes ; ce résultat peut se comparer à ceux obtenus chez les Prosobranches *Calyptraea sinensis* et *Patella vulgata* par STREIFF (1967 c) et CHOQUET (1969) et chez les Pulmonés *Helix aspersa*, *Agriolimax reticulatus* et *Lymnaea stagnalis* par GUYARD (1971 a), WIJDENES et RUNHAM (1976) et GERAERTS et JOOSSE (1975).

Ainsi, il semble bien que trois processus se superposent au cours de l'évolution de la lignée femelle dans la gonade de la limace :

- une autodifférenciation qui fait apparaître de jeunes ovocytes,
- une influence inhibitrice, excepté en phase femelle, des tentacules oculaires sur la différenciation de la lignée femelle,
- une action d'un facteur, originaire des ganglions cérébroïdes, favorisant l'accroissement des ovocytes.

BIBLIOGRAPHIE

A

ABELOOS (M), 1943 - Effets de la castration chez un Mollusque (*Limax maximus* L.) C.R.Acad. Sci.Paris, 216, 90 - 92.

ABELOOS (M), 1944 - Recherches expérimentales sur la croissance. La croissance des Mollusques Arionidés. Bull.Biol., 78, 215 - 256.

ALLARAKH (C), 1979 - Recherches histologiques et expérimentales de la différenciation sexuelle et du cycle de reproduction de *Chlamys opercularis* (Mollusque Lamellibranche). Thèse de 3ème cycle Endocrinologie Sexuelle Comparée, Caen.

ANCEL (P), 1903 - Histogenèse et structure de la glande hermaphrodite d'*Helix pomatia*. Arch.Biol., 19, 389-652.

AUBRY (R), 1962 - Etude de l'hermaphrodisme et de l'action pharmacodynamique des hormones de Vertébrés chez les Gastéropodes Pulmonés. Arch. Anat.micr.Morph.exp., Suppl.50, 521-602.

B

BABOR (J.F), 1894 - Über den Cyclus der Geschlechtsentwicklung der Stylomatophoren. Verh.dt.Zool.Ges., 4, 55-61.

BACCI (G), 1951 - Ermafroditismo e intersessualita nei Gastropodi e Lamellibranchi. Arch.Zool.Ital., Suppl.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, 1225.

BAILEY (T.G), 1973 - The *in vitro* culture of reproductive organs of the slug *Agriolimax reticulatus* (Müll). Neth.J.Zool., 23, 72-85.

BAKER (J.R), 1944 - The structure and chemical composition of the Golgi element. Quart.J.micr. Sci., 85, 1-72.

- BANK (O), 1931 - Der Einfluss hoher Temperatur auf die Gonade von *Helix pomatia*. *Biologia gen.*, 7, 429-444.
- BAUDELLOT (M), 1863 - Recherches sur l'appareil générateur des Mollusques Gastéropodes. *Ann.Sc.Nat.Zool.*, 19, 135-222, 268-289.
- BAYNE (C.J.), 1966 - Observations on the composition of the layers of the egg of *Agriolimax reticulatus*, the grey field slug (*Pulmonata*, *Stylommatophora*). *Comp.Biochem.Physiol.*, 19, 317-338.
- BAYNE (C.J.), 1967 - Studies on the composition of extracts of the reproductive glands of *Agriolimax reticulatus*, the grey field slug (*Pulmonata*, *Stylommatophora*). *Comp.Biochem.Physiol.*, 23, 761-773.
- BAYNE (C.J.), 1968 - Molluscan organ culture. *Malac.Rev.*, 1, 125-135.
- BAYNE (C.J.), 1973 - Physiology of the Pulmonate reproductive tract : location of spermatozoa in isolated, self-fertilizing Succinid snails (with a discussion of Pulmonate tract terminology). *Veliger*, 16, 169-175.
- BAYNE (C.J.), 1976 - Culture of Molluscan organs : A review. *In*: "Invertebrate tissue culture research applications". K.MARAMOROSCH.Ed., Academic Press, New York, 61-74.
- BERRY (A.J), CHAN (L.C), 1968 - Reproductive condition and tentacle extirpation in malayan *Achatina fulica* (*Pulmonata*). *Aust.J.Zool.*, 16, 849-855.
- BIERBAUER (J), 1977 - The connection of the optic tentacle as endocrine organ with the regulation of gametogenesis (en hongrois). *Allattani Közl*, 64, 31-40.
- BIERBAUER (J), 1978 a - Effect of hermaphroditic gland homogenate on the regulation of the gametogenesis in *Helix pomatia* (*Gastropoda Pulmonata*). *Acta.Biol.Acad.Sci.hung.*, 29, 181-187.

- BIERBAUER (J), 1978 b - An experimental study of the regulation of gametogenesis in *Helix pomatia* by the end of winter hibernation (en hongrois). *Biologia.*, 26, 99-104.
- BIERBAUER (J), FEHER (S), 1976 - Effect of cerebral ganglion homogenate on the gametogenesis in *Helix pomatia*. *Zentralblatt für Vet.Med. R.C.C. Anat.Hist. Embryol.*, 5, 98-99.
- BIERBAUER (J), FINALY (S), 1973 - Experimental study on the regulation of the gametogenesis in *Helix pomatia* (*Gastropoda*) in the period foregoing the oviposition. Proc. 7th Confer.Europ. Endocr,Budapest 26-31 August 1973, Akadémiai Kiadó, Budapest,J.SZENTA GOTHAI, F.HAJÓS Eds.
- BIERBAUER (J), MOLNAR (J), 1972 a - Die experimentelle Beeinflussung der Regulation der Gametogenese bei den Lungenschnecken zur Zeit des Winterschlafes. *Különyomataz Allattani Kölemények*, 59, 36-38.
- BIERBAUER (J), MOLNAR (J), 1972 b - Gametogenesis regulációjának kísérletes befolyásolása tüdőcsigákon a téli álm idején (en hongrois). *Allattani Közl.*, 59, 1-4.
- BIERBAUER (J), TOROK (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.Sci.hung.*, 19, 133-143.
- BIERBAUER (J), VIGH-TEICHMANN (I), 1970 - Histophysiological examination of the optic tentacle of Pulmonates. II. Cytochemistry of the special and secretory cells. *Acta.Biol.Acad.Sci.hung.*, 21,11-24.
- BOER (H.H), JOOSSE (J), 1975 - Endocrinology. In : Pulmonates, V.FRETTER, J.PEAKE Eds, Academic Press, London, New York, 1, 245-307.
- BOER (H.H), MOHAMED (A.M), VAN MINNEN (J), JONG-BRINK (M.de), 1976 - Effects of castration on the activity of the endocrine dorsal bodies of the freshwater Pulmonate snail *Bulinus truncatus*, intermediate host of *Schistosoma haematobium*. *Neth.J.Zool.*, 26, 94-105.

- BOER (H.H), ROUBOS (E.W), VAN DALEN (H), GROESBEEK (J.R.F.Th), 1977 - Neurosecretion in the basommatophoran snail *Bulinus truncatus* (Gastropoda, Pulmonata). Cell.Tiss.Res., 176, 57-67.
- BOER (H.H), SLOT (J.W), VAN ANDEL (J), 1968 - Electron microscopical and histochemical observations on the relation between medio-dorsal bodies and neurosecretory cells in the Basommatophoran snails *Lymnaea stagnalis*, *Ancylus fluviatilis*, *Australorbis glabratus* and *Planorbarius corneus*. Z.Zellforsch, 87, 435-450.
- BOUILLON (J), 1956 - Influence of temperature on the histological evolution of the ovotestis of *Cepaea nemoralis* L. Nature, 117, 142-143.
- BRIDE (J), GRIFFOND (B), 1979 - Influence d'extrait de gonades d'escargots *Helix aspersa* Müller en phase mâle dominante sur la gamétogenèse "in vitro" d'animaux juvéniles ou adultes. C.R.Acad.Sci.Paris, 288, D, 843-846.
- BRIDGEFORD (H.B), 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.Sci.Paris, 264, D, 131-133.
- BRISSON (P), 1971 - Castration chirurgicale et régénération gonadique chez quelques Planorbidés (Gastéropodes Pulmonés). Ann.Embryol.Morph., 4, 189-210.
- BRISSON (P), 1973 - Observation ultrastructurale de cellules germinales chez l'embryon d'*Acroloxus lacustris* (L) (Gastéropode Pulmoné Basommatophore). C.R.Acad.Sci.Paris, 277, D, 2205-2208.
- BRISSON (P), BESSE (C), 1975 - Etude ultrastructurale de l'ébauche gonadique chez l'embryon de *Lymnaea stagnalis* L. (Gastéropode Pulmoné Basommatophore) Bull.Soc.Zool.Fr., 100, 345-349.

- BRISSON (P), REGONDAUD (J), 1971 - Observations relatives à l'origine dualiste de l'appareil génital chez quelques Gastéropodes Pulmonés Basommatophores. C.R.Acad.Sci.Paris, 273, D, 2339-2341.
- BROCK (J), 1886 - Die Entwicklung des Geschlechtsapparates des Stylommato-phoren Pulmonaten, nebst Bemerkungen über Anatomie und Entwicklung einiger anderen Organsysteme. Z.Wiss.Zool., 44, 333-395.
- BRUSLE (J), 1972 - Les infrastructures germinales femelles précoces (gonocytes, ovogonies et ovocytes I). Ann.Biol., 11, 505-571.
- BURCH (J.B), CUADROS (C), 1965 - A culture medium for snail cells and tissues. Nature, 206, 637-638.
- BURTON (R.F), 1975 - A method of narcotizing snails (*Helix pomatia*) and cannulating the haemocoel and its application to a study of the role of calcium in the regulation of acide-base balance. Comp.Biochem.Physiol., 52, A, 483-485.

C

- CARRICK (R), 1938 - The life history and development of *Agriolimax agrestis*. Trans.Roy.Soc.Edinburgh, 59, 563-597.
- CHAPRON (C), RELEXANS (J.C), 1971 - Ultrastructure des gonocytes primordiaux et des gonies chez l'hermaphrodite *Eisenia foetida* (Oligochète, Lombricidé). C.R.Acad.Sci.Paris, 272, D, 2916-2919.
- CHARNIAUX-COTTON (H), 1957 - Croissance, régénération et déterminisme endocrinien des caractères sexuels d'*Orchestia gammarella* Pallas (Crustacé Amphipode). Ann.Sci.Nat., 19, 411-560.
- CHARNIAUX-COTTON (H), 1959 - Etude comparée du développement post-embryonnaire de l'appareil génital et de la glande androgène chez *Orchestia gammarella* et *Orchestia mediterranea* (Crustacés Amphipodes). Autodifférenciation ovarienne. Bull.Soc.Zool.Fr., 84, 105-115.

- ✓CHARNIAUX-COTTON (H), 1965 - Hormonal control of sex differentiation in Invertebrates. In: "Organogenesis". R.DEHANN, H.URSPRUNG Eds., Holt, Rinhart, Winston, New York, 701-740.
- CHARNIAUX-COTTON (H), GINSBURGER-VOGEL (T), 1962 - Preuve expérimentale de l'autodifférenciation ovarienne chez *Orchestia montagui* Audouin (Crustacés Amphipodes). C.R.Acad.Sci.Paris, 254, D, 2836-2838.
- CHEN (J), 1954 - The cultivation in fluid medium of organized liver, pancreas and other tissues of foetal rats. Exp.Cell.Res., 7, 518-529.
- 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 (P), 1969 - Taxonomie et biologie des grands *Arion* de France (*Pulmonata* : *Arionidae*). Malacologia, 9, 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 Doct. Sci.Nat.Lille, n°185.
- ✓CHOQUET (M), 1970 - Analyse des cycles sexuels naturels chez les Mollusques hermaphrodites et gonochoriques. Bull.Soc.Zool.Fr., 95, 393-405.
- CLARK (R.B), 1955 - The posterior lobes of the brain of *Nephtys* and the mucous glands of the prostomium. Quart.J.Micr.Sci., 96, 545-565.
- COE (W.R), 1943 - Sexual differentiation in Molluscs. I. Pelecypods. Quart. Rev.Biol., 18, 154-164.
- COE (W.R), 1944 - Sexual differentiation in Molluscs. II. Gastropods, Amphineurans, Scaphopods and Cephalopods. Quart.Rev.Biol., 19, 85-97.

- COGGESHALL (R.E), 1970 - A cytologic analysis of the bag cell control of egg laying in *Aplysia*. J.Morph., 132, 461-486.
- COOK (H), 1966 - Morphology and histology of the central nervous system of *Succinea putris* (L). Arch.Néerl.Zool., 17, 1-72.
- COURTOT (A.M), 1977 - Etude cytologique et expérimentale de la différenciation et de la sécrétion de la glande à albumine de l'escargot *Helix aspersa* Müll. Thèse Doct.Sci.Biol., Besançon.
- COWDEN (R.R), 1958 - A cytochemical study of the growth of the slug oocyte. In: "A symposium on the chemical basis of development". W.D.Mc ELROY, B.GLASS Eds, Johns Hopkins Press, Baltimore, 404-414.
- COWDEN (R.R), 1962 - Further cytochemical investigations on the growth and development of slug oocytes. Growth, 26, 209-234.
- CSABA (G), BIERBAUER (J), 1977 - Overlapping effects of different pituitary hormones on the oogenesis and spermatogenesis of *Helix pomatia*. Acta Biol.med.germ., 36, 201-204.
- CSABA (G), BIERBAUER (J), 1979 - Effect of oestrogenic, androgenic and gestagenic hormones on the gametogenesis (oogenesis and spermatogenesis) in the snail *Helix pomatia*. Acta Biol.med.germ., 38, 1145-1148.

D

- DUCE (I.R), 1976 - Studies on the dorsal bodies of *Agriolimax reticulatus*. Gen. Comp..Endocrinol., 29, 293.
- DUNCAN (C.J), 1975 - Reproduction. In : "Pulmonates". Vol.1; V.FRETTER, J.PEAKE Eds, Academic Press, London, New York, San Francisco, 309-365.
- DURCHON (M), 1967 - L'endocrinologie des Vers et des Mollusques. MASSON Ed., Paris, 241 p.

DURCHON (M), JOLY (P), 1978 - L'endocrinologie des Invertébrés. Presses Universitaires de France, 235 p.

DURCHON (M), PORCHET (M), 1971 - Premières données quantitatives sur l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens au cours de leur cycle sexuel. Gen.Comp.Endocrinol., 16, 555-565.

DURCHON (M), SCHALLER (F), 1963 - Application de la méthode de culture organotypique aux recherches endocrinologiques chez les Annélides Polychètes. C.R.Acad.Sci. Paris, 256, 5615-5617.

E

EISIG (H), 1869 - Beiträge zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Geschlechtsorgane von *Limnaeus*. Z.wiss.Zool., 19, 297-320.

ELS (W.J), 1974 - The histochemical demonstration of mucosubstances in the glandular layer of the spermoviduct of the slug *Deroceras laevis*. Histochem.J., 6, 531-541.

F

FERAL (C), 1978 - Présence des facteurs morphogénétique et dédifférenciateur du pénis chez un Mollusque Prosobranchie gonochorique *Ocenebra erinacea*. C.R.Acad.Sci., Paris, 287, D, 1235-1237.

FILHOL (J), 1938 - Recherches sur la nature des lépidosomes et les phénomènes cytologiques de la sécrétion chez les Gastéropodes Pulmonés. Arch.Anat.micr.Morph.exp., 34, 155-439.

FOCARDI (S), QUATTRINI (D), 1972 - Structure of the reproductive apparatus and life cycle of *Milax gagates* (Draparnaud), *Mollusca Gastropoda Pulmonata*. Boll.Zool., 39, 9-27.

FRANC (A), 1968 - Gastéropodes. In : Traité de Zoologie, P.P.GRASSE, MASSON Ed, Paris, 5, 1-893.

- GALANGAU (V), 1964 - Le cycle sexuel annuel de *Milax gagates* Drap. (Gastéropode Pulmoné) et ses deux pontes. Bull.Soc.Zool.Fr., 89, 510-513.
- GALANGAU (V), 1969 - Etude en microscopie 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 Doct.Sci.Nat., Montpellier.
- GERAERTS (W.P.M), 1976 a - Control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Gen.Comp.Endocrinol., 29, 61-71.
- GERAERTS (W.P.M), 1976 b - The role of the lateral lobes in the control of growth and reproduction in the hermaphrodite freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Gen.Comp.Endocrinol., 29, 97-108.
- GERAERTS (W.P.M), ALGERA (L.H), 1976 - The stimulatory effect of the dorsal body hormone on cell differentiation in the female accessory sex organs of the hermaphrodite freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Gen.Comp.Endocrinol., 29, 109-118.
- GERAERTS (W.P.M), BOHLKEN (S), 1976 - The control of ovulation in the hermaphrodite freshwater snail *Lymnaea stagnalis* by the neurohormone of the caudo-dorsal cells. Gen.Comp.Endocrinol., 28, 350-357.
- GERAERTS (W.P.M), BOHLKEN (S), JOOSSE (J), 1978 - The endocrine control of reproduction in the hermaphrodite Pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*. In : "Comparative Endocrinology", P.J.GAILLARD, H.H.BOER Eds, Elsevier / North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 21-24.
- GERAERTS (W.P.M), JOOSSE (J), 1975 - Control of vitellogenesis and of growth of female accessory sex organs by the dorsal body hormone (DBH) in the hermaphroditic freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Gen.Comp.Endocrinol., 27, 450-464.

- GERMAIN (L), 1930 - Mollusques terrestres et fluviatiles. *In* : " Faune de France", P.LECHEVALIER Ed, Paris, 897 p.
- GODDARD (C.K), 1960 - A study of the reproductive tract of *Helix aspersa* Müller after partial gonadectomy. *Aust.J.Biol.Sci.*, 13, 378-386.
- GOLDING (D.W), 1974 - A survey of neuroendocrine phenomena in nonarthropod invertebrates. *Biol.Rev.*, 49, 161-224.
- GOMOT (L), 1969 - Différenciation sexuelle des Mollusques en culture d'organes. *In* : " Cultures d'organes d'Invertébrés". Coll.Cours et Documents de Biologie, H.LUTZ ed., Gordon et Breach, Paris, London, New York, 109-140.
- GOMOT (L), 1970 - Analyse expérimentale du déterminisme du cycle de la gonade chez les Mollusques. *Bull.Soc.Zool.Fr.*, 95, 429-451.
- GOMOT (L), 1972 - The organotypic culture of Invertebrates other than Insects *In* : "Invertebrate tissue culture" Vol.2, C.VAGO Ed, Academic Press, New York, London, 41-136.
- GOMOT (L), 1973 - Etude du fonctionnement de l'appareil génital de l'escargot *Helix aspersa* par la méthode des cultures d'organes. *Arch.Anat. Hist.Embr.Norm.Exp.*, 56, 131-160
- GOMOT (L), 1974 - Culture *in vitro* de la glande hermaphrodite de l'Escargot *Helix aspersa* en présence de stéroïdes. *C.R.Sc.Soc.Biol.*, 168, 837-842.
- GOMOT (L), 1976 a - Ultrastructural changes in the multifid glands of the snail *Helix aspersa* following castration. *Gen.Comp.Endocrinol.*, 29, 298.
- GOMOT (L), 1976 b - Etude de l'activité génitale de Mollusques Gastéropodes (Paludines et escargots) par la méthode des cultures d'organes. *Bull.Soc.Zool.Fr.*, Suppl.au n°101, 23-34.

GOMOT (L), 1977 - L'hermaphrodisme chez les Mollusques Gastéropodes.
In : "Problèmes actuels d'Endocrinologie et de Nutrition",
H.P.KLOTZ Ed., 323-353.

GOMOT (L), COURTOT (A.M), 1979 - Etude en culture *in vitro* du contrôle
endocrine de la glande à albumen chez l'escargot *Helix aspersa*.
Malacologia, 18, 361-367.

GOMOT (L), GUYARD (A), 1964 - Evolution en culture *in vitro* de la glande
hermaphrodite de jeunes escargots de l'espèce *Helix aspersa* Müll.
C.R.Acad.Sci.Paris, 258, 2902-2905.

GOMOT (L), GUYARD (A), 1967 - La culture organotypique appliquée à l'endo-
crinologie d'un Mollusque Gastéropode Pulmoné *Helix aspersa* Müll.
2nd International Colloquium on Invertebrate tissue culture.
Istituto Lombardo : Fondazione Baselli, 22-31.

GOTTFRIED (H), DORFMAN (R.I), 1969 - The steroid biochemistry of the molluscan
ovotestis : A general concept of reproductive control mechanisms.
Proceedings 3 rd Congress of Endocrinology, Mexico 1968. Excerpta
Medica Foundation, 368-376.

GOTTFRIED (H), DORFMAN (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.Comp.Endocrinol.*
15, 101-119.

GOTTFRIED (H), DORFMAN (R.I), FORCHIELLI (E), WALL (P.E), 1967 - Aspects
of the reproductive endocrinology of the giant slug *Ariolimax*
californicus (*Stylommatophora* : *Gastropoda*). *Gen.Comp.Endocrinol.*,
2, 454.

GOTTFRIED (H), DORFMAN (R.I), WALL (P.E), 1967 - Steroids of Invertebrates:
Production of oestrogens by an accessory reproductive tissue
of the slug *Arion ater rufus* (Linn). *Nature*, 215, 409-416.

GOTTFRIED (H), LUSIS (O), 1966 - Steroids of Invertebrates : the *in vitro*
production of 11-ketotestosterone and other steroids by the eggs
of the slug *Arion ater rufus* (Linn). *Nature*, 212, 1488-1489.

- GOUDSMIT (E.M), 1972 - Carbohydrates and carbohydrate metabolism in *Mollusca*.
In : "Chemical Zoology", Vol VII, M.FLORKIN, B.T.SCHEER Eds.,
Academic Press, New York, London, 8, 219-243.
- GOUDSMIT (E.M), 1975 - Neurosecretory stimulation of galactogen synthesis
within the *Helix pomatia* albumen gland during organ culture.
J.Exp.Zool., 191, 193-198.
- GOUDSMIT (E.M), FELDMAN (S), 1974 - Organ culture of the *Helix pomatia*
albumen gland in a defined medium. Malac.Rev., 7, 53.
- GRAINGER (J.N.R), SHILLITOE (A.J), 1952 - Histochemical observations on
galactogen. Stain Technology, 27, 81-85.
- GRIFFOND (B), 1973 - Adaptation de milieux à la culture *in vitro* d'organes
du Mollusque dulçaquicole : *Viviparus viviparus* L. C.R.Acad.Sci.
Paris, 276, D, 2047-2050.
- GRIFFOND (B), 1977 - Recherches cytologiques et expérimentales sur la diffé-
renciation sexuelle et la gamétogenèse de la Paludine *Viviparus*
viviparus L. (Mollusque Gastéropode Prosobranch). Thèse Doct.
Sci.Nat., Besançon, n° 114.
- GRIFFOND (B), GOMOT (L), 1974 - Cultivation *in vitro* of organs of the
freshwater Gastropod Prosobranch Mollusc *Viviparus viviparus* L.
In vitro, 10, 206-215.
- GUYARD (A), 1969 a - Elaboration d'un milieu synthétique enrichi destiné
à la culture d'organes de Mollusques. C.R.Acad.Sci.Paris, 268,
162-164.
- GUYARD (A), 1969 b - Autodifférenciation femelle de l'ébauche gonadique
de l'escargot *Helix aspersa* Müll. cultivée sur milieu an hormonal.
C.R.Acad.Sci., Paris, 268, 966-969.
- GUYARD (A), 1970 - La différenciation gonocytaire des Mollusques Gastéropodes
en culture *in vitro*. Ann.Biol., 9, 401-408.

GUYARD (A), 1971 a - Etude de la différenciation de l'ovotestis et des facteurs contrôlant l'orientation sexuelle des gonocytes de l'escargot *Helix aspersa* Müller. Thèse Doct.Sci.Nat., Besançon, n° 56.

GUYARD (A), 1971 b - Nature endocrine des substances réglant la sexualisation de la gonade et son fonctionnement chez les Mollusques gonochoriques et hermaphrodites. *Haliotis*, 7, 167-183.

H

HARRY (H.W), 1965 - Evidence of gonadal hormone controlling the development of the accessory reproductive organs in *Taphius glabratus* (Say) (*Gastropoda, Basommatophora*). *Trans.Amer.microsc.Soc.*, 65, 45-68.

HEKSTRA (G.P), LEVER (J), 1960 - Some effects of ganglion extirpations in *Lymnaea stagnalis*. *Proc.Kon.Ned.Akad.v.Wetensch.Amsterdam*, C 64, 271-282.

HENDERSON (N.E), PELLUET (D), 1960 - The effect of visible light on the ovotestis of the slug *Deroceras reticulatum* (Müller). *Canad.J. Zool.*, 38, 173-178.

HERLANT-MEEWIS (H), VAN MOL (J.J), 1959 - Phénomènes neurosécrétoires chez *Arion rufus* et *Arion subfuscus*. *C.R.Acad.Sci.Paris*, 249, D, 321-322.

HEYDER (P), 1909 - Zur Entwicklung des Lungenhöhle bei *Arion*. Nebst Bemerkungen über die Entwicklung der Urniere, des Pericards und Herzens. *Z.wiss.Zool.*, 93, 90-156.

HIGHNAM (K.C), 1978 - Comparative aspects of endocrine control of reproduction in Invertebrates. In : "Comparative Endocrinology", P.J.GAILLARD, H.H.BOER Eds, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 3-12.

HILL (R.S), 1977 - Studies on the ovotestis of the slug *Agriolimax reticulatus* (Müller) 2.The epithelia. *Cell.Tiss.Res.*, 183, 131-141.

HILL (R.S), BOWEN (I.D), 1976 - Studies on the ovotestis of the slug *Agriolimax reticulatus* (Müller). 1. The oocyte. Cell.Tiss.Res., 173, 465-482.

HOFFMANN (H), 1922 - Über die Entwicklung der Geschlechtsorgane bei *Limax maximus*. Z.Wiss.Zool., 119, 493-536.

HOGG (N.A.S), WIJDENES (J), 1979 - A study of gonadal organogenesis, and the factors influencing regeneration following surgical castration in *Deroceras reticulatum* (Pulmonata:Limacidae). Cell.Tiss. Res., 198, 295-307.

J

JONG-BRINK (M de), KOOP (H.M), KRAAL (G), VAN WINGERDEN (B), 1976 - The regulation of secretory processes in the albumen gland, one of the accessory sex glands of Pulmonate snails. Gen.Comp.Endocrinol., 29, 298.

JONG-BRINK (M de), WIT (A de), KRAAL (G), BOER (H.H), 1976 - A light and electron microscope study on oogenesis in the freshwater Pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. Cell.Tiss.Res., 171, 195 - 219.

JOOSSE (J), 1964 - Dorsal bodies and dorsal neurosecretory cells of the cerebral ganglia of *Lymnaea stagnalis* L. Arch.Néerl.Zool., 15, 1-103.

JOOSSE (J), 1972 - Endocrinology of reproduction in Molluscs. Gen.Comp. Endocrinol., Suppl.3, 591-601.

JOOSSE (J), 1975 - Structural and endocrinological aspects of hermaphroditism in pulmonate snails, with particular reference to *Lymnaea stagnalis* (L). In : "Intersexuality in the animal kingdom", R.REINBOTH Ed., Springer Verlag, Berlin, 158-169.

JOOSSE (J), 1976 - Endocrinology of Molluscs. In: "Actualités sur les hormones d'Invertébrés". Colloques Internationaux CNRS n°251, 107-124.

JOOSSE (J), 1979 a - Endocrinology of Molluscs. *In* : "Pathways in Malacology", S.VAN DER SPOEL, A.C.VAN BRUGGEN, J.LEVER Eds., Scheltema Holkema BV, Utrecht, 107-137.

JOOSSE (J), 1979 b - Evolutionary aspects of the endocrine system and of the hormonal control of reproduction of Molluscs. *In* : "Hormones and Evolution", E.J.W.BARRINGTON, Ed., Academic Press, New York, 1, 119-158.

JOOSSE (J), BOER (M.H), CORNELISSE (C.J), 1968 - Gametogenesis and oviposition in *Lymnaea stagnalis* as influenced by γ - irradiation and hunger. *Symp.Zool.Soc.Lond.*, 22, 213-235.

JOOSSE (J), GERAERTS (W.P.M), 1969 - On the influence of the dorsal bodies and the adjacent neurosecretory cells on the reproduction and metabolism of *Lymnaea stagnalis*. *Gen.Comp.Endocrinol.*, 13, 511.

JOOSSE (J), REITZ (D), 1969 - Functional anatomical aspects of the ovotestis of *Lymnaea stagnalis*. *Malacologia*, 9, 101-119.

K

KAI-KAI (M.A), KERKUT (G.A), 1979 - Mapping and ultrastructure of neurosecretory cells in the brain of *Helix aspersa*. *Comp.Biochem.Physiol.*, A, 64, 97-108.

KANDASWAMY (C.K), 1978 - Occurrence of an endocrine centre in the gonad of a land slug *Laevicaulis alte* (*Gastropoda : Pulmonata*). *Experientia*, 34, 595-596.

KAPLAN (H.M), 1969 - Anesthesia in Invertebrates. *Fed.Proc.*, 28, 1557-1569.

KATAOKA (S), 1976 - Fine structure of the epidermis of the optic tentacle in a slug, *Limax flavus* L. *Tissue Cell.*, 8, 47-60.

KITTEL (R), 1956 - Untersuchungen über den Geruchs und Geschmackssinn bei den Gattungen *Arion* und *Limax* (*Mollusca : Pulmonata*). *Zool.Anz.*, 157, 185-195.

- KRUSCH (B), SCHOENMAKERS (H.J.N), VOOGT (P.A), NOLTE (A), 1979 -
Steroid synthesizing capacity of the dorsal body of *Helix pomatia*
L. (*Gastropoda*). An *in vitro* study. *Comp.Biochem.Physiol.*,
64, B, 101-104.
- KUGLER (O.E), 1965 - A morphological and histochemical study of the repro-
ductive system of the slug, *Philomycus carolinianus* (Bosc).
J.Morph., 116, 117-132.
- KUHLMANN (D), 1966 - Der Dorsalkörper der Stylommatophoren (*Gastropoda*).
Z.Wiss.Zool., 173, 218-231.
- KUHLMANN (D), NOLTE (A), 1967 - Spermiogenese, Eireifung und Neurosekretion.
Untersuchungen an der Weinbergschnecke *Helix pomatia* L. (*Gastropoda*).
Z.wiss.Zool., A, 176, 271-286.

L

- LANE (N.J), 1962 - Neurosecretory cells in the optic tentacles of certain
pulmonates. *Quart.J.micr.Sci.*, 103, 211-226.
- LANE (N.J), 1964 - The fine structure of certain secretory cells in the
optic tentacles of the snail, *Helix aspersa*. *Quart.J.micr.Sci.*,
105, 35-47.
- LAREMBERGUE (M de), 1939 - Etude de l'autofécondation chez les Gastéropodes
Pulmonés. Recherches sur l'aphallie et la fécondation chez *Bulinus*
(*Isidora*) *contortus* Michaud. *Bull.Biol.*, 73, 19-231.
- LAVIOLETTE (P), 1950 a - Différenciation des gamètes et cycle de la glande
hermaphrodite chez *Arion rufus* L. *C.R.Soc.Biol.Paris*, 144,
134-135.
- LAVIOLETTE (P), 1950 b - L'évolution de la glande hermaphrodite d'*Arion rufus*
et ses rapports avec la croissance. *C.R. Soc.Biol.Paris*, 144,
135-136.
- LAVIOLETTE (P), 1954 a - Etude cytologique et expérimentale de la régénération
germinale après la castration chez *Arion rufus* L., Gastéropode
Pulmoné. *Ann.Sci.Nat.Zool.*, 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.
- LAVIOLETTE (P), CUIR (P), 1959 - Action des rayons X sur la gonade d'*Arion rufus* L. (Mollusque Gastéropode). Arch.Anat.micr.Morph.exp., 48, 25-48.
- LE BRETON (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 3ème cycle, Biologie Animale, Caen.
- LE BRETON (J), 1979 - La sexualité des Mollusques Gastéropodes et les Trématodes parasites. Apport de l'endocrinologie de la sexualité des Gastéropodes à l'étude et à l'interprétation des conséquences du parasitisme. Haliotis, 8, 215-241.
- LE DOUARIN (N), 1969 - Méthodes et milieux de culture. In : " Cultures d'organes d'Invertébrés". Coll.Cours et Documents de Biologie, H.LUTZ Ed., Gordon et Breach, Paris, London, New York, 1-78.
- LE GALL (S), 1974 - Déterminisme de la morphogenèse et du cycle du tractus génital mâle externe chez *Crepidula fornicata* Phil.(Mollusque hermaphrodite protandre). Thèse Doct.Sci.Nat., Caen.
- LE GALL (S), GRIFFOND (B), STREIFF (W), 1974 - Existence de facteurs endocriniens de la morphogenèse et de la régression du pénis chez *Buccinum undatum* et *Viviparus viviparus*, Mollusques Gastéropodes gonochoriques. C.R.Acad.Sci.Paris, 278, D, 773-776.
- LE GALL (S), STREIFF (W), 1974 - Présence du facteur morphogénétique du pénis au niveau des ganglions pédieux chez les Mollusques Prosobranches hermaphrodites (*Crepidula*, *Calyptraea*) et gonochoriques. (*Littorina*, *Buccinum*). C.R. Acad.Sci.Paris, 279, D, 183- 186.
- LE GALL (S), STREIFF (W), 1975 - Protandric hermaphroditism in Prosobranch Gastropods. In : "Intersexuality in the animal kingdom", R.REINBOTH Ed., Springer Verlag, Berlin, 170-178.

- LE GALL (S), STREIFF (W), 1978 - Contrôle du facteur pédieux morphogénétique du pénis par les ganglions cérébro-pleuraux chez *Crepidula fornicata* Phil. (Mollusque hermaphrodite protandre). C.R.Acad.Sci.Paris, 287, D, 1305-1307.
- LEVER (J), 1958 - On the relation between the medio-dorsal bodies and the cerebral ganglia in some Pulmonates. Arch.Néerl.Zool., 13, 194-201.
- LEVER (J), JAGER (J.C), WESTERVELD (A), 1964 - A new anesthetization technique for freshwater snails, tested on *Lymnaea stagnalis*. Malacologia, 1, 331-338.
- LUBET (P), 1978 - Le cycle sexuel et son contrôle endocrinien chez quatre espèces de Mollusques Lamellibranches. Haliotis, 9, 99-105.
- LUBET (P), MATHIEU (M), 1978 - Experimental studies on the control of the annual reproductive cycle in the Pelecypod Molluscs (*Mytilus edulis* L. and *Crassostrea gigas* Th). Gen.Comp.Endocrinol., 34, 109.
- LUBET (P), 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". Coll.Cours et Documents de Biologie, H. LUTZ Ed., Gordon et Breach, Paris, London, New York, 141-160.
- LUCHTEL (D), 1972 a - Gonadal development and sex determination in Pulmonate Molluscs. I - *Arion circumscriptus*. Z.Zellforsch, 130, 279-301.
- LUCHTEL (D), 1972 b - Gonadal development and sex determination in Pulmonate Molluscs. II - *Arion ater rufus* and *Deroceras reticulatum*. Z.Zellforsch, 130, 302-311.
- LUSIS (O), 1961 - Postembryonic changes in the reproductive system of the slug *Arion ater rufus* L. Proc.Zool.Soc.London, 137, 433-468.
- LUSIS (O), 1962 - Pigment of the hermaphrodite gland of *Arion ater rufus* L. Nature, 194, 1191-1192.

LUSIS (O), 1966 - Changes induced in the reproductive system of *Arion ater rufus* L. by varying environmental conditions. Proc.malac.Soc.Lond. 37, 19-26.

M

Mc CRONE (E.J), SOKOLOVE (P.G), 1979 - Brain-gonad axis and photoperiodically-stimulated sexual maturation in the slug, *Limax maximus*. J.comp.Physiol., 133, 117-124.

MARTOJA (M), 1964 - Développement de l'appareil reproducteur chez les Gastéropodes Pulmonés. Ann.Biol., 3, 199-232.

MARTOJA (M), 1972 - Endocrinology of Mollusca. In : " Chemical Zoology", M.FLORKIN, B.T. SCHEER Eds., Academic Press, New York, 7, 349-392.

MASETTI - ZANNINI (A), 1960 - La succezione dei fenomeni di differenziamento citosessual nella gonade giovanile di *Helix cineta* Müll. Caryologia, 13, 285-296.

MATHIEU (M), 1979 - Etude expérimentale du contrôle neuroendocrinien des cycles de développement de la gonade et du tissu de réserve chez la moule adulte *Mytilus edulis* L. (Mollusque Lamellibranche). Thèse 3ème cycle, Endocrinologie sexuelle comparée, Caen.

MATHIEU (M), LUBET (P), 1979 - Analyse expérimentale, en culture d'organes, de l'action des ganglions nerveux sur la gonade adulte de la moule, *Mytilus edulis* Linné (Mollusque Lamellibranche). Colloque de la Société Zoologique de France, Poitiers.

MATHIEU (M), LUBET (P), COLLIN (F), 1976 - Ovogenèse des Mollusques Lamellibranches en cultures organotypiques. Bull.Soc.Zool.Fr., 101, 889-890.

MAY (F), 1934 - Chemische und biologische Untersuchungen über Galaktogen (Biologischer Teil: Der Jahreszyklus in Galaktogen und Glykogenbestand der Weinbergschnecke).Z.Biol., 95, 401-430.

MEENAKSCHI (V.R), SCHEER (B.T), 1968 - Studies on the carbohydrates of the slug. *Ariolimax columbianus* with special reference to their distribution in the reproductive system. *Comp.Biochem.Physiol.*, 26, 1091-1097.

MEENAKSHI (V.R), SCHEER (B.T), 1969 - Regulation of galactogen synthesis in the slug *Ariolimax columbianus*. *Comp.Biochem.Physiol.*, 29, 841-845.

MORGAN (J.F), MORTON (H.J), PARKER (R.C), 1950 - Nutrition of animal cells in tissue culture. I - Initial studies on a synthetic medium. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 73, 1-8.

N

NAGABHUSHANAM (R), KULKARNI (B), 1971 - Neurosecretion in the slug *Laevicaulis alte*. *Proc.Ind.Acad.Sci.*, B, 73, 290-302.

NIELAND (M.L), GOUDSMIT (E.M), 1969 - Ultrastructure of galactogen in the albumen gland of *Helix pomatia*. *J.Ultrastr. Res.*, 29, 119-140.

NOLTE (A), 1965 - Neurohämäl-Organe bei Pulmoneten (*Gastropoda*). *Zool.Jb. Anat.*, 82, 365-380.

NOLTE (A), 1978 - Ultrastructure of the dorsal neurohemal area of the snail *Theba pisana* L. (*Stylommatophora, Gastropoda*). In : "Neurosecretion and neuroendocrine activity. Evolution, Structure and function". W.BARGMANN, A.OKSCHE, A.POLENNOV, B.SCHARRER Eds., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 386-389.

NOPP (H), 1971 - Einige Wirkungen der Amputation der optischen Tentakel bei einer Landlungenschnecke (*Eobania vermiculata* Müll, *Helicidae*). *Experientia*, 27, 855.

NY (K), LE GALL (S), 1976 - Présence du facteur morphogénétique du vagin au niveau des ganglions pleuraux chez des Mollusques prosobranches hermaphrodites (*Crepidula fornicata*) et gonochorique (*Thais lapillus*) *C.R.Acad.Sci.*, Paris, 283, D, 1659-1662.

O

OSTROUMOVA (N.K), 1975 - Structure fine des corps dorsaux et du perineurium d'*Achatina fulica* (en russe). Zool.Zh., 54, 119-121.

P

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), 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.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ (A), 1964 - Effects of ionizing radiation on the population kinetics of the snail *Australorbis glabratus* : Age at exposure and the effects on reproduction. Radiat.Res., 23, 392-404.

Q

QUATTRINI (D), 1967 - Structure and ultrastructure of the molluscan prostate. 3.Observations on *Milax gagates* (Draparnaud) (*Gastropoda Pulmonata Stylommatophora*). Monit.Zool.Ital., 1, 109-128.

QUATTRINI (D), LANZA (B), 1965 - Ricerche sulle 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.

QUICK (H.E), 1946 - The mating process in *Arion hortensis* Fér. and in *Arion subfuscus* Draparnaud. J.Conch., 22, 178-182.

R

- RAJAN (R.K), SRIRAMULU (V), 1979 - *In vitro* studies on the influence of optic tentacular principle in maintenance of male germ cell line in the snail *Cryptozonia belangeri* (Deshayes). Ind.J.Exp.Zool., 17, 701-703.
- RANZOLI (F), 1956 - Osservazioni sulla spermatogenesi di *Helix lucorum*. Bol.Zool.Ital., 23, 565-571.
- RANZOLI (F), 1957 - Osservazioni sull'ovogenesi di *Helix lucorum* e sui rapporti fra gametogenesi maschile o femminile e cellule nutrici. Bol.Zool.Ital., 24, 1-8.
- RAVERA (O), 1966 - Effects of X-irradiation on various stages of the cycle of *Physa acuta* Draparnaud, a freshwater gastropod. Symposium on the disposal of radioactive wastes into seas, oceans and surface water-Vienne. Int.atom.Energy Agency, 799-808.
- RAVERA (O), GADDI (G), GIANNOVI (L), 1969 - Different radio-sensitivity of male and female cells of *Physa acuta* Draparnaud (*Gastropoda*, *Basommatophora*). Proceedings of the Symposium on Molluscs, Cochin January 1968. Marine Biological Association of India, Mandapam Camp., India, Symposium series, 3, 439-440.
- RENZONI (A), 1969 - Observations on the tentacles of *Vaginulus borellianus* Colosi (*Mollusca : Gastropoda : Soleolifera*). Veliger, 12, 176-181.
- REYNOLDS (E.S), 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J.Cell.Biol., 17, 208-212.
- RICHARD (A), 1970 - Différenciation sexuelle des Céphalopodes en culture *in vitro*. Ann.Biol., 9, 409-415.
- RICHARD (A), 1971 - Contribution à l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Thèse Doct.Sci.Nat. Lille, n° 243.

- RICHTER (E), 1935 - Der Bau der Zwitterdrüse und die Entstehung der Geschlechtszellen bei *Agriolimax agrestis*. Iena Zeit.Naturwiss. 119, 507-544.
- ROGERS (D.G.), 1969 - The fine structure of the collar cells in the optic tentacles of *Helix aspersa*. Z.Zellforsch., 102, 113-128.
- RÖHLICH (P), BIERBAUER (J), 1966 - Electron microscopic observations on the special cells of the optic tentacle of *Helicella obvia* (Pulmonata). Acta Biol.Hung, 17, 359-373.
- ROLLO (C.D), WELLINGTON (W.G), 1979 - Intra-and-inter-specific agonistic behavior among terrestrial slugs (Pulmonata, Stylommatophora). Canad.J.Zool., 57, 846-855.
- ROSE (M), 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 des Geschlechtswechsels von *Limax laevis*. Z.indukt.Abstamm.Vereblehre, 43, 238-251.
- ROUBOS (E.W), MOORER-VAN DELFT (C.M), 1976 - Morphometric *in vitro* analysis of the control of the activity of the neurosecretory dark green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Cell.Tiss.Res., 174, 221-231.
- ROUBOS (E.W), VAN MINNEN (J), WIJDENES (J), MOORER-VAN DELFT (C.M), 1976 - An ultrastructural *in vitro* study on the regulation of neurosecretory activity in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* with particular reference to caudo-dorsal cells. Cell.Tiss.Res., 174, 201-219.
- ROUZAUD (H), 1885 - Recherches sur le développement des organes génitaux de quelques Gastéropodes hermaphrodites. Thèse Doct.Sci.Nat. Montpellier.

- RUNHAM (N.W), 1976 - The effects of castration on the maturation of the reproductive tract of the Pulmonate slug, *Agriolimax reticulatus*. Gen.Comp.Endocrinol., 29, 293.
- RUNHAM (N.W), 1978 - Reproduction and its control in *Deroceras reticulatum*. Malacologia, 17, 341-350.
- RUNHAM (N.W), BAILEY (T.G), LARYEA (A.A), 1973 - Studies of the endocrine control of the reproductive tract of the grey field slug *Agriolimax reticulatus*. Malacologia, 14, 135-142.
- RUNHAM (N.W), HOGG (N), 1979 - The gonad and its development in *Deroceras reticulatum* (*Pulmonata:Limacidae*). Malacologia, 18, 391-399.
- RUNHAM (N.W), HUNTER (P.J), 1970 - Terrestrial slugs. Hutchinson University Library, London, 184 p.
- RUNHAM (N.W), ISARANKURA (K), SMITH (B.J), 1965 - Methods for narcotizing and anesthetizing Gastropods. Malacologia, 2, 231 - 238.
- RUNHAM (N.W), LARYEA (A.A), 1968 - Studies on the maturation of the reproductive system of *Agriolimax reticulatus* (*Pulmonata : Limacidae*). Malacologia, 7, 93-108.

S

- SANCHEZ (S), SABLIER (H), 1962 - Histophysiologie neurohormonale chez quelques Mollusques Gastéropodes. II. Corrélations hormonales. Bull.Soc.Zool.Fr., 87, 319-330.
- SCHARRER (B), 1935 - Über das Hanströmsche Organ X bei Opisthobranchien. Publ.Staz.Zool.Napoli, 15, 132-142.
- SCHEERBOOM (J.E.M), GELDOF (A.A), 1978 - A quantitative study of the assimilation of different diets in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L), introducing a method to prevent coprophagy. Proc.Kon.Ned.Akad. Wetensch.Amsterdam, C 81, 173-183.

- SIMROTH (H), 1887 - Über die Genitalentwicklung der Pulmonaten und die Fortpflanzung von *Agriolimax laevis*. Z.Wiss.Zool., 45, 646-663.
- SMITH (B.J), 1965 - The secretions of the reproductive tract of the slug *Arion ater*. Ann.N.Y. Acad.Sci., 118, 997 - 1014.
- SMITH (B.J), 1966 a - Maturation of the reproductive tract of *Arion ater* (*Pulmonata : Arionidae*). Malacologia, 4, 325-349.
- SMITH (B.J), 1966 b - The structure of the central nervous system of the slug *Arion ater* L., with notes on the cytoplasmic inclusions of the neurons. J.Comp.Neur., 126, 437-452.
- SMITH (B.J), 1967 - Correlation between neurosecretory changes and maturation of the reproductive tract of *Arion ater* (*Gastropoda, Stylommatophora, Arionidae*). Malacologia, 5, 285 - 298.
- SOKOLOVE (P.G), Mc CRONE (E.J), 1978 - Reproductive maturation in the slug *Limax maximus* and the effects of artificial photoperiod. J.Comp. Physiol., 125, 317-325.
- SPALLANZANI (L), 1768 - Promodo di un opera ad impresersi sopra le reproductioni animali - Modena.
- STEEN (W.J.Vander), JAGER (J.C), TIEMERSMA (D), 1973 - The influence of food quantity on feeding, reproduction and growth in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L), with some methodological comments. Proc.Kon.Ned.Akad.v.Wetensch.Amsterdam, C 24, 47-60.
- STREIFF (W), 1963 - Survie d'organes de Mollusques marins en culture *in vitro*. Présentation des Milieux A 6, A 7, A 7c et B 2. Améliorations apportées à la technique de culture. Gen.Comp.Endocrinol., 3 733 - 734.
- STREIFF (W), 1964 - Survie d'organes de Mollusques marins en culture *in vitro*. Résultats obtenus sur les milieux A 6, A 7, A 7c et A 8c. Bull. Soc.Zool.Fr., 89, 56-59.

- 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* des facteurs hormonaux conditionnant l'évolution du tractus génital mâle. Ann. Endocrinol. Paris, 27, suppl., 385-400.
- STREIFF (W.), 1967 a - Recherches cytologiques et endocrinologiques sur le cycle sexuel de *Calyptraea sinensis* L. (Mollusque Prosobranchie hermaphrodite protandre). Thèse Doct. Sci. Nat., Toulouse, n° 294.
- STREIFF (W.), 1967 b - Etude endocrinologique du déterminisme du cycle sexuel chez un Mollusque hermaphrodite protandre *Calyptraea sinensis* L. : II. Mise en évidence par culture *in vitro* de facteurs hormonaux conditionnant l'évolution du tractus femelle. Ann. Endocrinol. Paris, 28, 461-472.
- STREIFF (W.), 1967 c - 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. Paris, 28, 641-656.
- STREIFF (W.), 1970 - Apports récents de la culture organotypique dans l'étude du déterminisme de la morphogenèse et du cycle du tractus génital chez les Mollusques Gastéropodes hermaphrodites et gonochoriques. Ann. Biol., 9, 417-426.
- STREIFF (W.), LE BRETON (J.), 1970 a - Etude endocrinologique des facteurs régissant la morphogenèse et la régression du pénis chez un Mollusque Prosobranchie gonochorique *Littorina littorea* L. C. R. Acad. Sci. Paris, 270, D, 547-549.
- STREIFF (W.), LE BRETON (J.), 1970 b - Etude comparée en culture *in vitro* des facteurs responsables de la morphogenèse et de la régression du tractus génital mâle externe chez deux Mollusques Gastéropodes Prosobranches : *Crepidula fornicata* Phil. (espèce protandre) et *Littorina littorea* L. (espèce gonochorique). C. R. Acad. Sci. Paris, 270, D, 632-634.

STREIFF (W.), LE BRETON (J.), SILBERZAHN (N.), 1970 - Non spécificité des facteurs hormonaux responsables de la morphogénèse et du cycle du tractus génital mâle chez les Mollusques Prosobranches. Ann. Endocrinol. Paris, 31, 548-556.

STREIFF (W.), PEYRE (A.), 1963 - Survie en culture *in vitro* d'organes de *Calyptraea sinensis* L. (Mollusque Prosobranch). C. R. Acad. Sci. Paris, 256, 292-294.

T

TAKEDA (N.), 1977 - Stimulation of egg-laying by nerve extracts in slugs. Nature, 267, 5611, 513-514.

TAKEDA (N.), 1979 - Induction of egg-laying by steroid hormones in slugs. Comp. Biochem. Physiol., 62 A, 273-278.

TARDY (J.), 1967 - Régénération de la gonade après castration chirurgicale chez quelques *Aeolidiidae* (Mollusques Nudibranches). C. R. Soc. Biol., 161, 10, 2013-2016.

TARDY (J.), 1971 - Etude expérimentale de la régénération germinale après castration chez les *Aeolidiidae*. Ann. Sci. Nat. Zool., 12, 91-147.

TAYLOR (G.T.), ANDERSON (E.), 1969 - Cytochemical and fine structural analysis of oogenesis in the Gastropod, *Ilyanassa obsoleta*. J. Morph., 129, 211-248.

TOMBES (A.S.), 1970 - An introduction to Invertebrate endocrinology. Academic Press, New York and London, 217 p.

TROWELL (A.O.), 1959 - Culture of mature organs in synthetic medium. Exp. Cell. Res., 16, 118-147.

V

- VAN MOL (J.J.), 1960 - Phénomènes neurosécrétoires dans les ganglions cérébroïdes d'*Arion rufus*. C. R. Acad. Sci. Paris, 250, 2280-2281.
- VAN MOL (J.J.), 1967 - Etude morphologique et phylogénétique du ganglion cérébroïde des Gastéropodes Pulmonés (Mollusques). Thèse Acad. Roy. Belg., Cl. Sci., 37, 1-168.
- VELDHUIJZEN (J.P.), CUPERUS (R.), 1976 - Effects of starvation, low temperature and the dorsal body hormone on the *in vitro* synthesis of galactogen and glycogen in the albumen gland and the mantle of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Neth. J. Zool., 26, 119-135.
- 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, 249-258.
- VIANEY-LIAUD (M.), 1972 a - Gamétogenèse et voies génitales chez le Planorbe *Australorbis glabratus* Say (Mollusque Gastéropode Pulmoné) ; description et étude expérimentale de leur contrôle. Thèse 3ème cycle, Biologie animale, Paris VI.
- VIANEY-LIAUD (M.), 1972 b - Etude du contrôle de la maturité des tractus génitaux et de la ponte par castration chirurgicale chez le Planorbe *Australorbis glabratus* (Pulmoné Basommatophore). Bull. Soc. Zool. Fr., 97, 4, 675-690.
- VIANEY-LIAUD (M.), 1973 - Données nouvelles sur la culture organotypique de l'ovotestis du Planorbe *Australorbis glabratus* (Gastéropode Pulmoné). Arch. Zool. exp. gén., 114, 525-535.
- VIANEY-LIAUD (M.), LANCASTRE (F.), 1968 - Utilisation d'un milieu diphasique pour la culture organotypique d'explants d'*Australorbis glabratus* (Pulmoné Basommatophore). C. R. Acad. Sci. Paris, 266, D, 1317-1319.

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.

VOLTAIRE, 1771 - In : "Questions sur l'encyclopédie".

W

WATTEZ (Ch.), 1973 - Effet de l'ablation des tentacules oculaires sur la gonade en croissance ou en cours de régénération chez *Arion subfuscus* Draparnaud (Gastéropode Pulmoné). Gen. Comp. Endocrinol., 21, 1-8.

WATTEZ (Ch.), 1975 - Effet d'injections répétées de broyats de tentacules oculaires sur la gonade en croissance et en cours de régénération d'Arionidés tentaculectomisés : étude chez *Arion subfuscus* Draparnaud (Gastéropode Pulmoné). Gen. Comp. Endocrinol., 27, 479-487.

WATTEZ (Ch.), 1978 - Influence du complexe céphalique (tentacules oculaires - cerveau) sur l'évolution, en culture *in vitro*, de gonades infantiles et juvéniles d'*Arion subfuscus* Drap. (Gastéropode Pulmoné). Gen. Comp. Endocrinol., 35, 360-374.

WATTEZ (Ch.), DURCHON (M.), 1972 - Influence des tentacules oculaires dans la différenciation génitale chez *Arion subfuscus* Draparnaud (Mollusque Gastéropode Pulmoné). C. R. Acad. Sci. Paris, 274, D, 2328-2331.

WATTS (A.H.G.), 1952 - Spermatogenesis in the slug *Arion subfuscus*. J. Morph., 91, 53-78.

WENDELAAR BONGA (S.E.), 1970 - Ultrastructure and histochemistry of neurosecretory cells and neurohaemal areas in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). Z. Zellforsch., 108, 190-224.

- WIJDENES (J.), RUNHAM (N.W.), 1976 - Studies on the function of the dorsal bodies of *Agriolimax reticulatus* (Mollusca ; Pulmonata). Gen. Comp. Endocrinol., 29, 545-551.
- WIJDENES (J.), RUNHAM (N.W.), 1977 - Studies on the control of growth in *Agriolimax reticulatus* (Mollusca, Pulmonata). Gen. Comp. Endocrinol., 31, 154-156.
- WIJDENES (J.), VAN MINNEN (J.), BOER (H.H.), 1978 - A comparative study of neurosecretion in Pulmonates. In : "Comparative Endocrinology", P.J. GAILLARD , H.H. BOER Eds. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 337.
- WOLFF (E.), HAFFEN (K.), 1952 - Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. Tex. Rep. Biol. Med., 10, 463-472.
- WRIGHT (B.R.), 1974 - Sensory structure of the tentacles of the slug, *Arion ater* (Pulmonata, Mollusca). I. Ultrastructure of the distal epithelium, receptor cells and tentacular ganglion. Cell Tiss. Res., 151, 229-244.

PLANCHES

PLANCHE I

L'EMBRYON

Les tentacules oculaires et la gonade.

a : Fixation au Bouin-Hollande acétique - Triple coloration de Prenant.

b, c, d : Fixation au Zenker - Coloration selon la technique de Cleveland-Wolfe.

a - Vue de détail des tentacules oculaires chez un embryon âgé de vingt jours.

b et c - Localisation de la gonade (embryon âgé de quinze jours). L'ébauche gonadique (flèche) est située au contact du cul-de-sac stomacal (e).

d - Aspect du massif cellulaire gonadique chez un embryon âgé de quinze jours. On y distingue deux types cellulaires : des cellules souches (c.s) et des cellules accumulées dans la partie centrale du massif (c.c). Remarquer les divisions (flèche).

ABREVIATIONS UTILISEES : c.c : cellules centrales ; c.s : cellules souches ;
e : estomac ; o : oeil.



BUS
LILCE

PLANCHE II

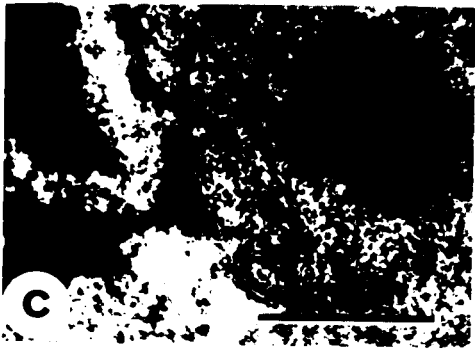
CYCLE SEXUEL

La gonade infantile chez des limaces âgées de huit jours (stade 1).

a, b : Fixation au Bouin-Hollande acétique - Coloration à l'Hémalun-Eosine.
c, d, e : Double fixation glutaraldéhyde/acide osmique - Coloration des coupes par l'acétate d'Uranyle et le citrate de Plomb selon Reynolds.

- a - Localisation de la gonade (g). Elle est située au niveau du cul-de-sac stomacal (e).
- b - Aspect histologique de la gonade. Trois types cellulaires sont présents : cellule souche (cs), protogonie (p) et spermatogonie (spg).
- c - Détail d'une protogonie. Remarquer la présence dans le cytoplasme de corps granulaires (c.g).
- d - Aspect ultrastructural d'une cellule souche. Elle renferme un noyau (n) à chromatine dense.
- e - Aspect ultrastructural d'une protogonie. On observe une dispersion de la chromatine dans l'espace nucléaire.

2115
ABREVIATIONS UTILISEES : c.g : corps granulaire ; cs : cellule souche ; e :
estomac ; g : gonade ; gl : glycogène ; n : noyau ;
p : protogonie ; spg : spermatogonie.



MS
LILLE

PLANCHE III

CYCLE SEXUEL

*La gonade infantile chez des limaces âgées de vingt jours (stade 1) [a, b].
Le début de la phase juvénile (stade 2) [c, d].*

a à d : Fixation au Bouin-Hollande acétique - Coloration à l'Hémalun-éosine.

a - Aspect de la gonade infantile vingt jours après l'éclosion. Les massifs cellulaires sont à présent plus nombreux et disposés autour de la paroi de l'artère génitale (a.g).

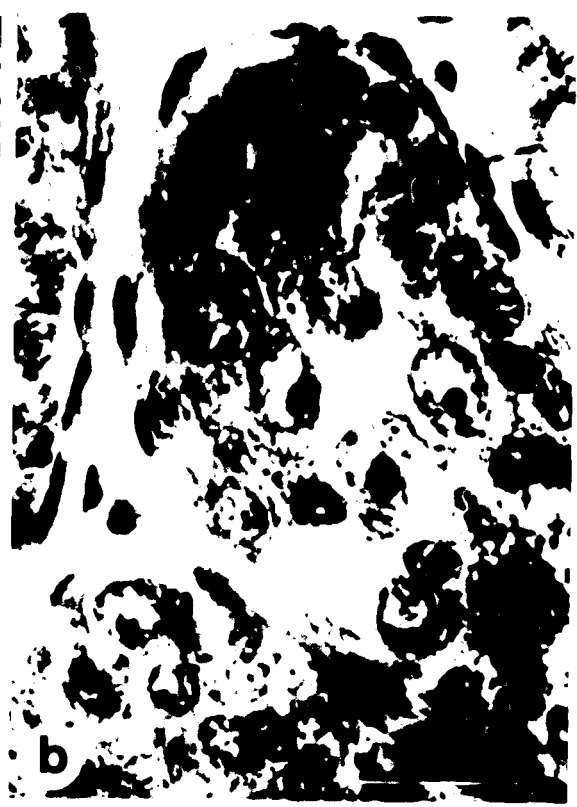
b - Vue de détail de la gonade prélevée sur un animal âgé de vingt jours. Remarquer une mitose dans la couche cellulaire corticale (flèche) et une mitose spermatogoniale (astérisque).

c - Ovotestis en début de phase juvénile. Les acini sont désormais mixtes ; ils renferment des spermatogonies et de jeunes ovocytes (flèches).

d - Apparition en début de phase juvénile d'une cellule femelle (flèche) qui va évoluer en position corticale.

ABREVIATIONS UTILISEES : a.g : artère génitale ; c.s : cellule-souche ;
spg : spermatogonies.





BUS
LILLE

PLANCHE IV

CYCLE SEXUEL

La gonade juvénile (stade 2) : Détails ultrastructuraux.

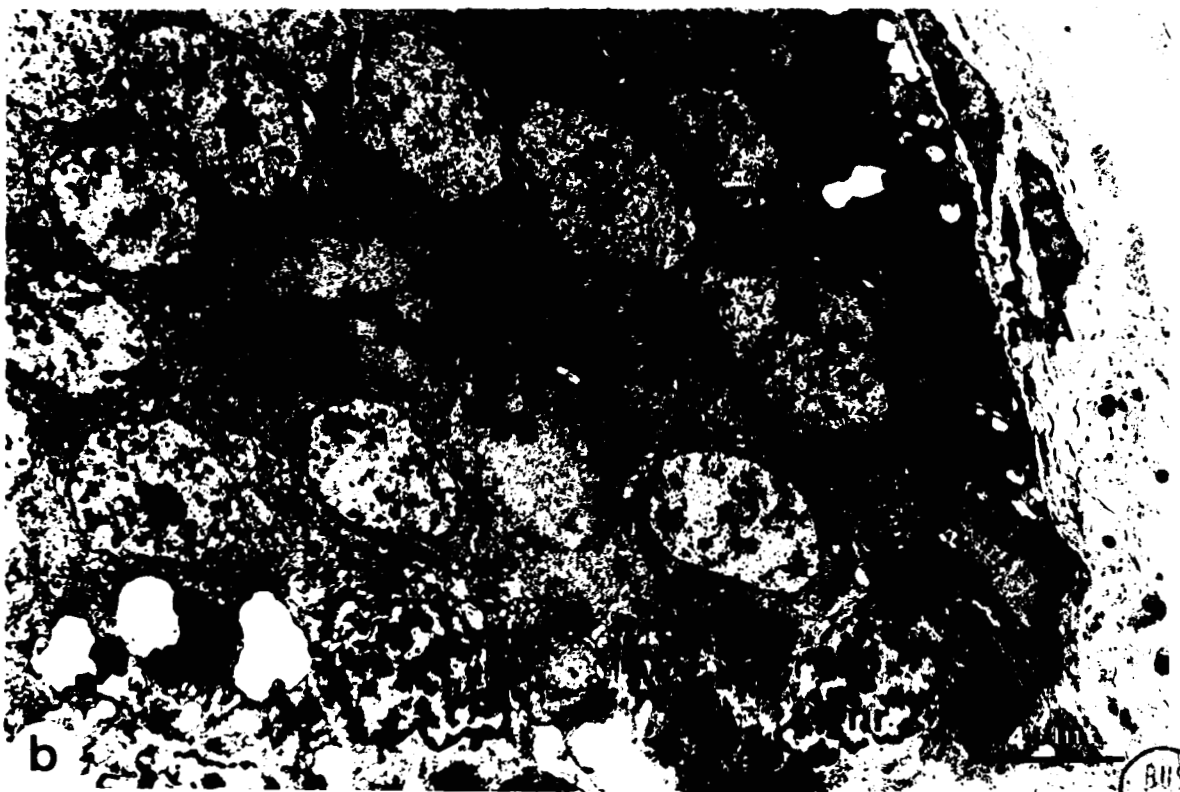
a et b : Double fixation glutaraldéhyde/acide osmique - Coloration des coupes par l'acétate d'Uranyle et le citrate de Plomb selon Reynolds.

a - Paroi d'un acinus gonadique. On peut observer le noyau (n) aplati sur la paroi ainsi que les prolongements pseudopodiaux (p) d'une cellule nourricière chargée d'inclusions denses (id) et de glycogène (gl).

b - Vue d'ensemble d'un acinus à prédominance mâle. Les spermatogonies occupent toute la lumière de l'acinus et se multiplient activement. (La flèche indique une mitose spermatogoniale).

ABREVIATIONS UTILISEES : ccs : cellule conjonctive de soutien ; gl : glycogène ; id : inclusions denses ; lb : lame basale ; m.A : membrane d'Ansel ; n : noyau d'une cellule nourricière ; nr : cellule nourricière ; p : prolongements pseudopodiaux ; spg : spermatogonies.





BUS
LIFE

PLANCHE V

CYCLE SEXUEL

La gonade juvénile (stade 2) : détails ultrastructuraux concernant les spermatogonies et les cellules nourricières.

a à c : Double fixation glutaraldéhyde-acide osmique. Coloration des coupes par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb selon REYNOLDS.

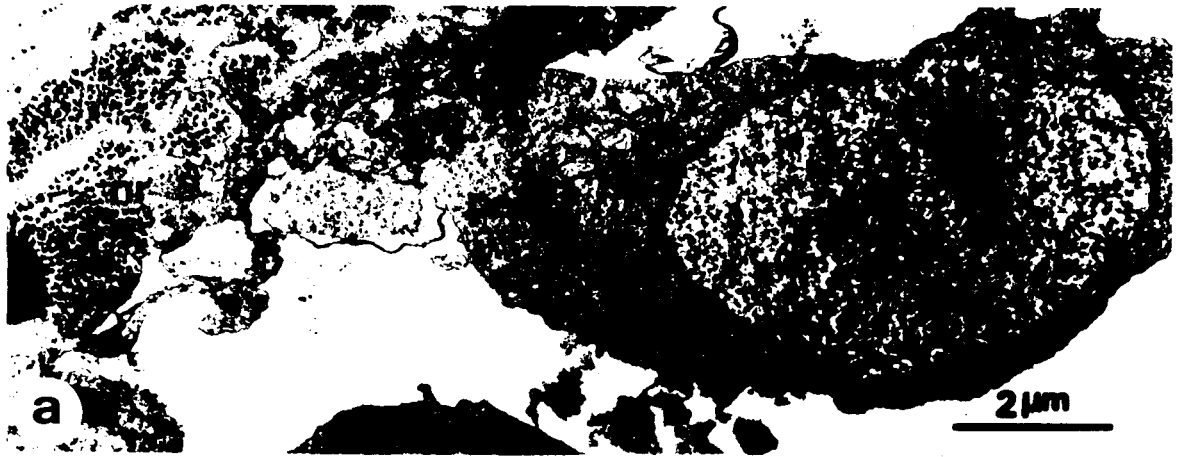
a - Les spermatogonies évoluent au sein de la lumière de l'acinus mais on peut constater sur ce cliché que la cellule mâle reste en relation avec une cellule nourricière (nr) par un pédoncule (ped).

b - Aspect d'une cellule nourricière. Elle est bourrée d'inclusions denses (id) et de glycogène (gl).

c - Ultrastructure d'une spermatogonie. Noter la nette polarisation de la cellule.

ABREVIATIONS UTILISEES : fm : figure myélinique ; g : appareil de Golgi ;
gl : glycogène ; id : inclusion dense ; m : mitochondries ; nr : cellule nourricière ; ped : pédoncule.





INS
LILLE

PLANCHE VI

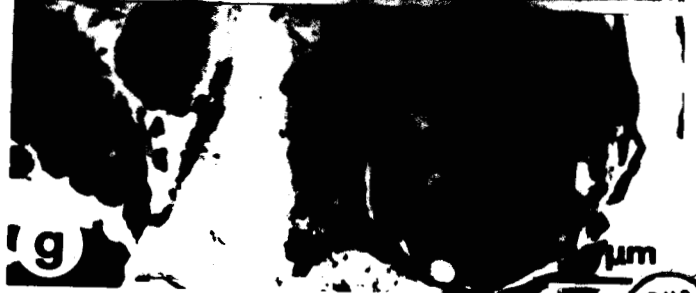
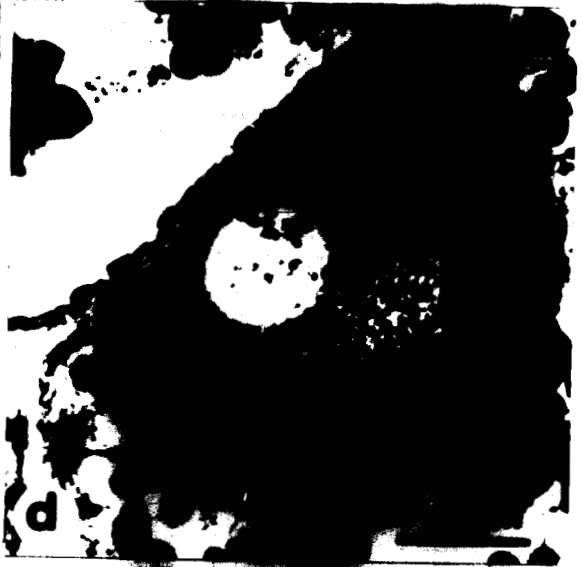
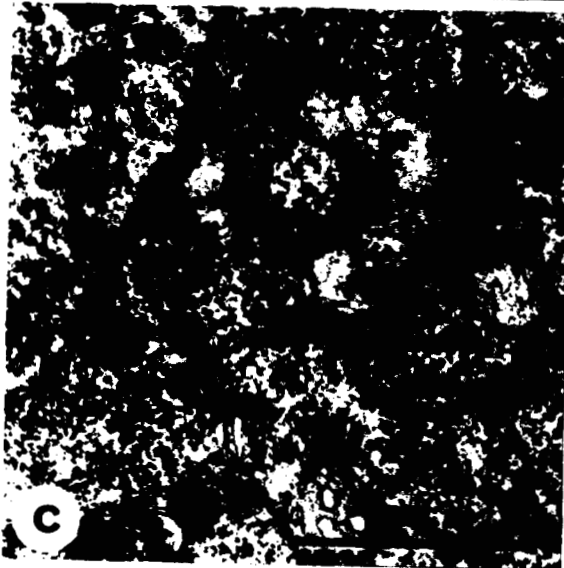
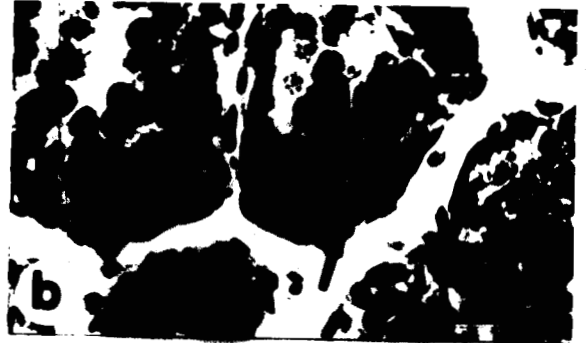
CYCLE SEXUEL

Evolution de l'ovogenèse pendant les stades 2, 3 et 4 du cycle sexuel.

- a, c, e, f : Double fixation glutaraldéhyde/acide osmique - Coloration des coupes par l'acétate d'Uranyle et le citrate de Plomb selon Reynolds.
- b, d, g : Fixation au Bouin-Hollande acétique.
- b et g : Coloration à l'Hémalun-éosine.
- d : Triple coloration de Prenant.

- a - Aspect ultrastructural de l'ovogonie. Remarquer l'ergastoplasme (e) représenté par des citernes lamellaires concentriques, parallèles à l'enveloppe nucléaire.
- b - Jeunes ovocytes au stade initial de leur croissance. Noter la basophilie importante du cytoplasme (flèche).
- c - Ultrastructure d'un jeune ovocyte. Aucune polarité n'a pu y être décelée.
- d - Ovocyte à un stade plus avancé de sa croissance. Remarquer les deux zones cytoplasmiques : acidophile et basophile.
- e - Disposition périnucléaire des mitochondries dans un ovocyte de type figuré en d.
- f - Aspect de l'appareil de Golgi dans un ovocyte de type figuré en d.
- g - Ovocyte en dégénérescence. Observer la vacuolisation du cytoplasme (flèche).

206
ABRÉVIATIONS UTILISEES : e : ergastoplasme ; m : mitochondrie ; n : noyau.



BUS
LIFE

PLANCHE VII

CYCLE SEXUEL

La gonade en début de phase mâle mature (stade 4a)

a à d : Fixation au Bouin-Hollande acétique.

a, b : Coloration à l'Azan.

c : Coloration à l'Hémalun-éosine.

d : Triple coloration de Prenant.

a - Présence de spermatocytes (spc) et de spermatides (spt) dans la glande hermaphrodite d'une limace en début de stade 4a.

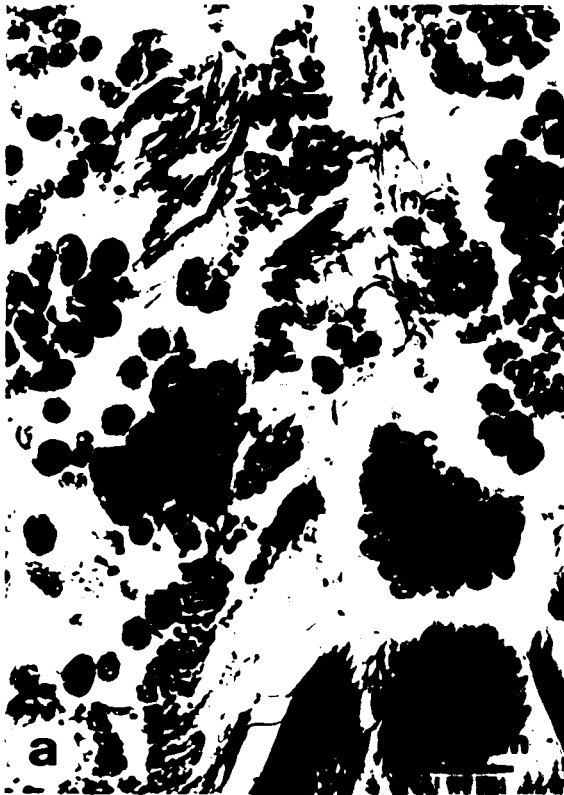
b - Gonade d'animal en début de stade 4a. Remarquer quelques spermatozoïdes attachés à une cellule nourricière (flèche).

c - Glande génitale d'un animal en fin de stade 4a. On observe des spermatocytes et des spermatides ; les spermatozoïdes sont nombreux.

d - Aspect de la lignée femelle (flèche) dans l'ovotestis d'un animal au stade 4a. On n'observe pas encore la présence d'ovocytes de grande taille.

ABREVIATIONS UTILISEES : Spc : spermatocytes ; Spt : spermatides.





S
LILLE

PLANCHE VIII

CYCLE SEXUEL

La gonade en fin de phase mâle mature (stade 4b)

a à d : Fixation au Bouin-Hollande acétique.

a, d : Coloration à l'Azan.

b, c : Coloration à l'Hémalun-éosine.

a - Vue d'ensemble de l'ovotestis. A côté des cellules mâles, on remarque l'apparition d'ovocytes de grande taille (flèches). Le canal hermaphrodite (ch) présente une ciliature.

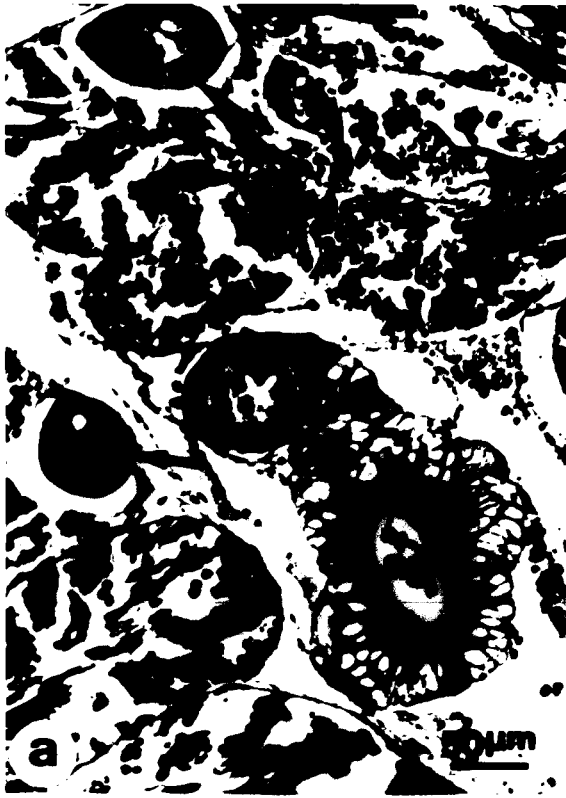
b - Disposition des spermatozoïdes autour d'un ovocyte dégénéré (flèche).

c - Disposition des spermatozoïdes en faisceaux.

d - Aspect des ovocytes (flèche) en fin de stade. Par comparaison avec la figure d de la Planche VII, on constate que ceux-ci ont subi un accroissement de taille important.

ABREVIATIONS UTILISEES : ag : artère génitale ; ch : canal hermaphrodite.





HIS
LILLE

PLANCHE IX

CYCLE SEXUEL

La gonade en phase femelle (stade 5) et au stade d'atrophie complète (stade 6)

a à d : Fixation au Bouin-Hollande acétique.

a et b : Coloration à l'Hémalun-éosine.

c et d : Triple coloration de Prenant.

a - Gonade d'une limace au début de la phase femelle. Quelques spermatozoïdes n'ont pas encore été éliminés.

b - Aspect de l'ovocyte mature. Il est intrafolliculaire.

c - Glande génitale d'un animal en fin de phase femelle ayant pondu une fois. Remarquer les trois stades d'évolution : acinus renfermant un ovocyte, acinus vide, acinus obturé par les cellules nourricières (flèche).

d - Gonade d'un individu au stade d'atrophie. Les acini s'oblitérent ; on n'y décèle aucun gamète.

ABREVIATIONS UTILISEES : c.f : cellule folliculaire ; c.n : cellules nourricières.





PLANCHE X

EXPÉRIMENTATION IN VIVO

Examen histologique de régénérats gonadiques obtenus chez des limaces castrées privées ou non de leurs tentacules oculaires et ayant subi des injections répétées de solution physiologique de CHIARANDINI ou d'extraits de tentacules "juvéniles" (fixations six mois après l'opération).

a à d : Fixation au Bouin-Hollande acétique.

a, b, d : Triple coloration de Prenant.

c : Coloration à l'Hémalun-éosine.

a - Régénérat obtenu après castration simple suivie d'une injection hebdomadaire de solution physiologique (série témoin). La gonade a l'aspect typique d'une phase juvénile.

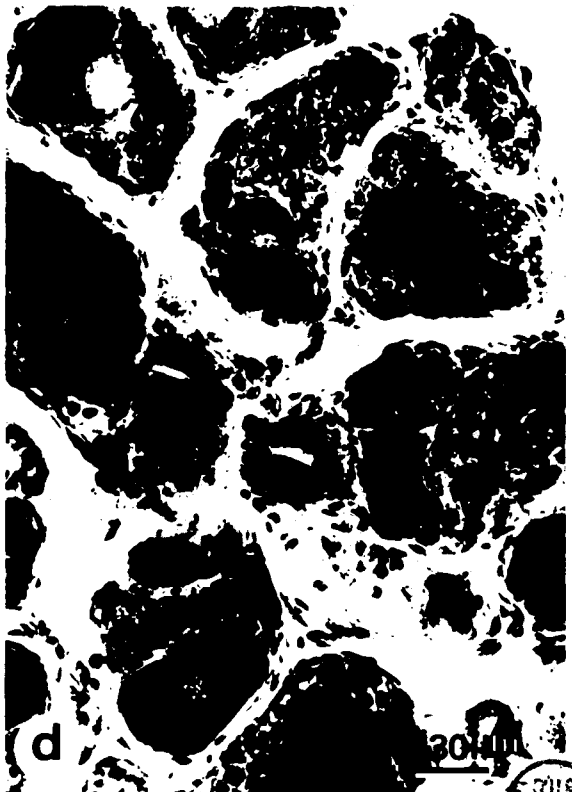
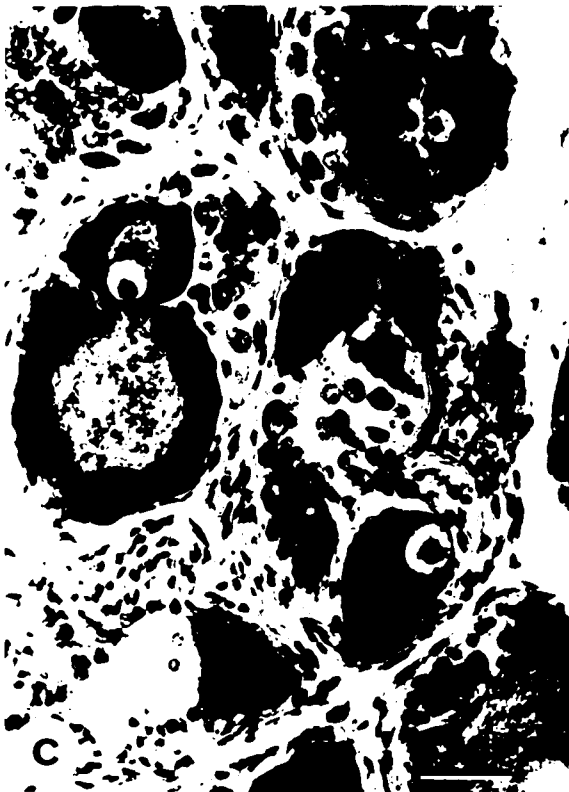
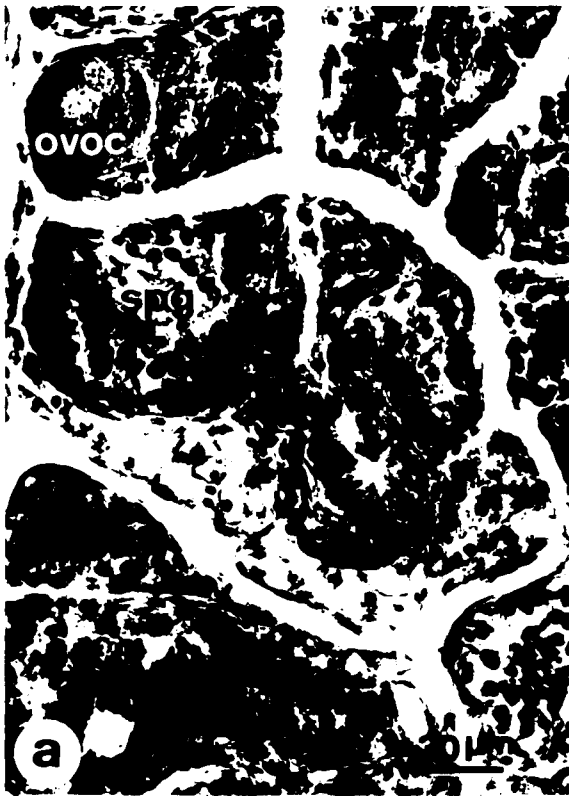
b - Vue d'ensemble d'un régénérat prélevé chez un castrat tentaculectomisé ayant reçu une injection hebdomadaire de solution physiologique. En comparant les figures a et b, on constate que la tentaculectomie provoque une nette féminisation de la gonade.

c - Poussées ovocytaires observées dans un régénérat prélevé chez un castrat détentaculé ayant subi toutes les semaines jusqu'à la fixation une injection de solution physiologique.

d - Aspect d'une gonade néoformée chez une limace détentaculée puis castrée ayant reçu une injection hebdomadaire d'extrait de tentacules oculaires prélevés sur des animaux en phase juvénile. En comparant l'aspect de l'ovotestis avec celui de la figure b, on constate que l'injection d'extrait tentaculaire corrige l'effet produit par la tentaculectomie.

ABREVIATIONS UTILISEES : ovoc : ovocyte ; spg : spermatogonies.





3115
LILLE

PLANCHE XI

EXPÉRIMENTATION IN VIVO

Examen histologique de gonades prélevées chez des limaces normales ou tentaculectomisées à l'éclosion ayant subi des injections répétées de solution physiologique de CHIARANDINI ou d'extraits de tentacules homologues ou "juvéniles" ou "mâles" (fixations à l'âge de six mois).

a à f : Fixation au Bouin-Hollande acétique.

a, b : Triple coloration de Prenant.

c à f : Coloration à l'Hémalun-éosine.

- a - Aspect histologique de la gonade d'un animal normal ayant reçu une injection hebdomadaire de solution physiologique. On remarque chez ce témoin la présence de spermatogonies (spg) et d'un à deux ovocytes (ovoc) par acinus.
- b - Glande génitale d'un animal privé de ses tentacules oculaires dès l'éclosion et ayant reçu une injection hebdomadaire de solution physiologique. Les ovocytes sont plus nombreux que chez les animaux normaux ayant subi le même type d'injection (comparer l'aspect de l'ovotestis avec celui de la figure a).
- c - Acini à prédominance femelle observés dans l'ovotestis d'une limace tentaculectomisée à la naissance ayant subi toutes les semaines jusqu'à la fixation une injection de solution physiologique.
- d - Glande hermaphrodite d'un animal tentaculectomisé à la naissance et ayant reçu des injections hebdomadaires d'extraits de tentacules homologues ("infantiles" puis "juvéniles"): L'aspect de la gonade est typique d'une phase juvénile.
- e - Aspect de l'ovotestis d'un animal détentaculé dès l'éclosion et ayant reçu toutes les semaines jusqu'à la fixation une injection d'extrait de tentacules "juvéniles". On n'observe pas l'apparition de poussées ovocytaires, contrairement à ce que l'on constate chez les détentaculés injectés avec de la solution physiologique (figure b).
- f - Poussées femelles (flèche) observées dans la gonade d'une limace détentaculée à la naissance et ayant subi une injection hebdomadaire d'extraits de tentacules obtenus à partir de donneurs en phase mâle mature.

ABREVIATIONS UTILISEES : ovoc : ovocyte ; spg : spermatogonies.

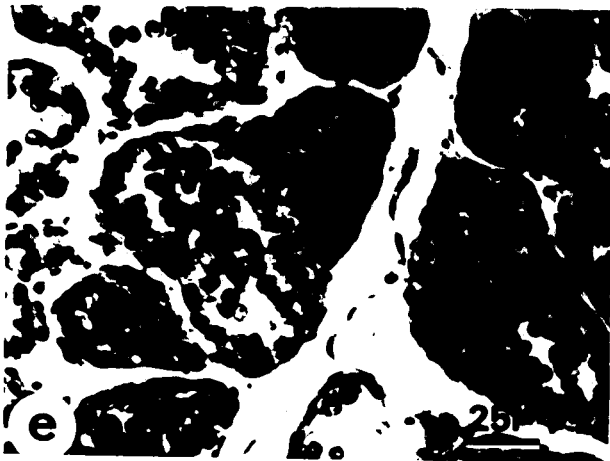
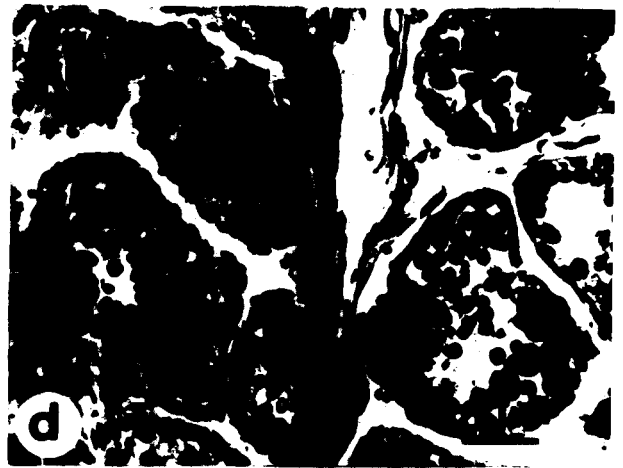
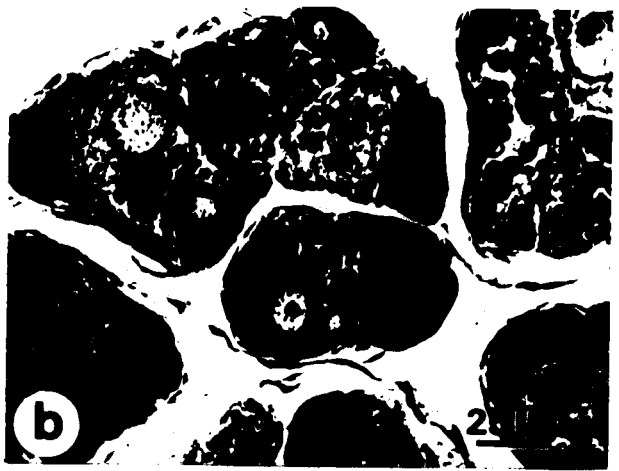
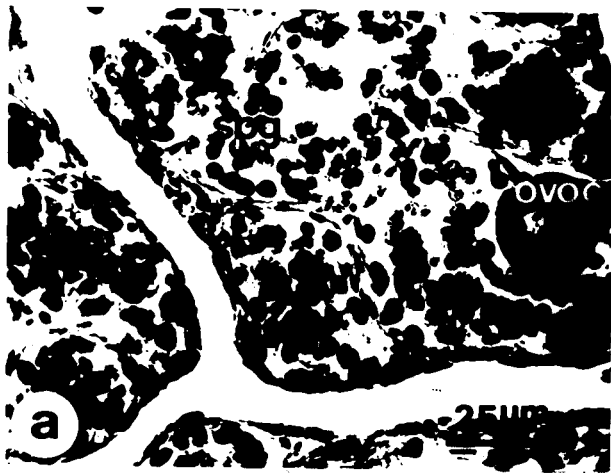


PLANCHE XII


EXPÉRIMENTATION IN VIVO

Examen histologique de gonades prélevées chez des limaces normales ou tentaculectomisées à l'éclosion ayant subi des injections répétées de solution physiologique de CHIARANDINI ou d'extraits de tentacules homologues ou "juvéniles" ou "mâles" (fixations à l'âge de dix mois).

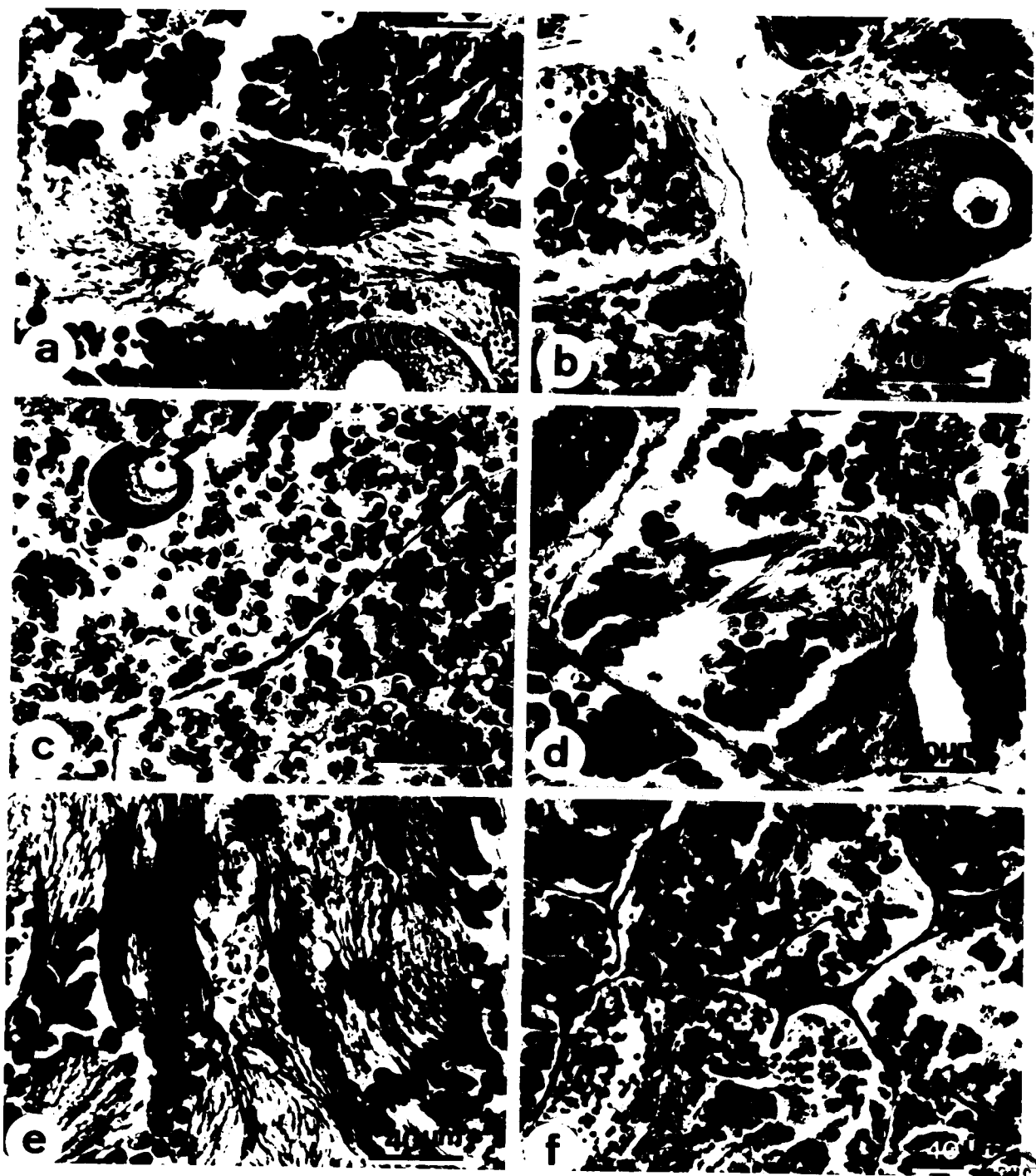
a à f : Fixation au Bouin-Hollande acétique.

a, b, e, f : Coloration à l'Hémalun-éosine.

c, d : Triple coloration de Prenant.

- a - Aspect histologique de la glande hermaphrodite d'un animal ayant reçu une injection hebdomadaire de solution physiologique. Tous les stades de la lignée mâle sont présents.
 - b - Aspect de la gonade d'une limace détentaculée dès l'éclosion et ayant subi toutes les semaines jusqu'à la fixation une injection de solution physiologique. Acini féminisés et poussées femelles sont très fréquemment retrouvés chez un tel individu.
 - c - Glande génitale d'un animal tentaculectomisé à l'éclosion et ayant reçu une injection hebdomadaire d'extrait tentaculaire homologue. Noter la présence de spermatozoïdes et d'ovocytes.
 - d - Aspect le plus fréquemment observé dans la gonade d'individus détentaculés dès l'éclosion et ayant subi une injection hebdomadaire d'extrait tentaculaire homologue. La gonade se trouve en phase mâle mature.
 - e - Glande hermaphrodite d'une limace privée de ses tentacules oculaires à l'éclosion et ayant reçu toutes les semaines jusqu'à la fixation une injection d'extrait de tentacules "juvéniles". Une comparaison de l'aspect histologique de la gonade (phase mâle mature) avec celui figuré en b démontre le haut pouvoir inhibiteur du tentacule en phase juvénile sur la différenciation de la lignée femelle.
-  Ovotestis au stade mâle mature chez un animal tentaculectomisé à la naissance et ayant subi une injection hebdomadaire d'extrait de tentacules obtenus à partir de donneurs en phase mâle mature.

ABREVIATIONS UTILISEES : ovoc : ovocyte ; spz : spermatozoïdes.



THE
LIFE

PLANCHE XIII

EXPÉRIMENTATION IN VIVO

Examen histologique d'ovotestis néoformés, prélevés sur des limaces castrées, privées ou non de leurs tentacules oculaires, et ayant subi des injections répétées de solution physiologique de CHIARANDINI ou d'extraits préparés à partir de cerveaux d'animaux adultes ou de ganglions cérébroïdes de limaces juvéniles (fixations cinq mois après opération).

a à d : Fixations au Bouin-Hollande acétique.

a, d : Coloration au Bleu de Toluidine.

b, c : Coloration à l'Hémalun-éosine.

a - Régénérat gonadique prélevé sur un castrat simple ayant reçu une injection hebdomadaire de solution physiologique. L'aspect histologique est typique d'une phase juvénile avec présence de spermatogonies (spg) et d'ovocytes (ovoc).

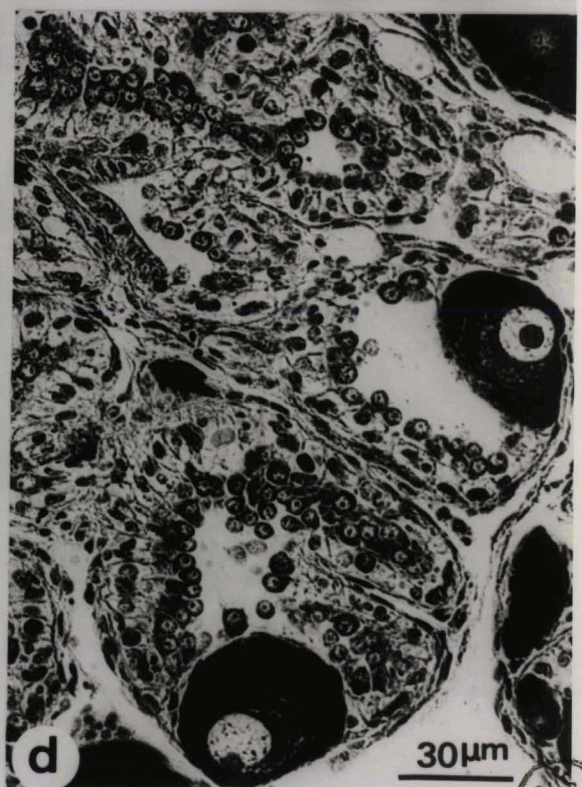
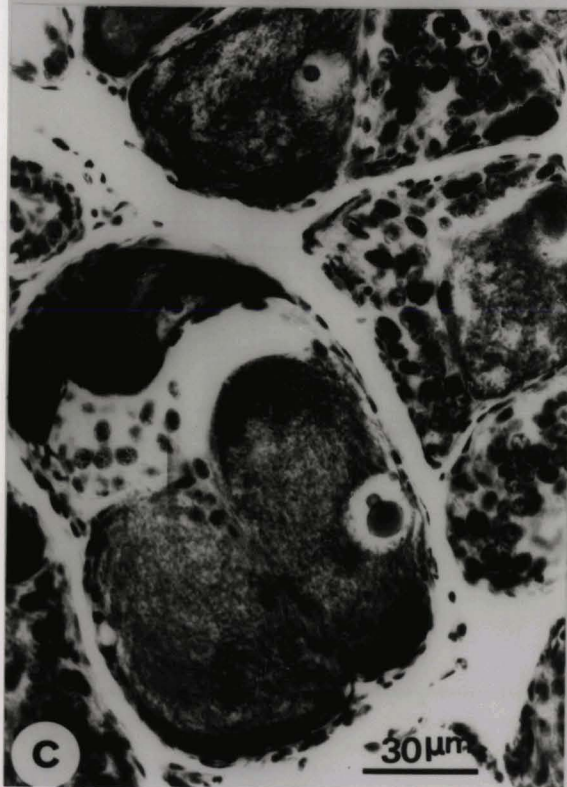
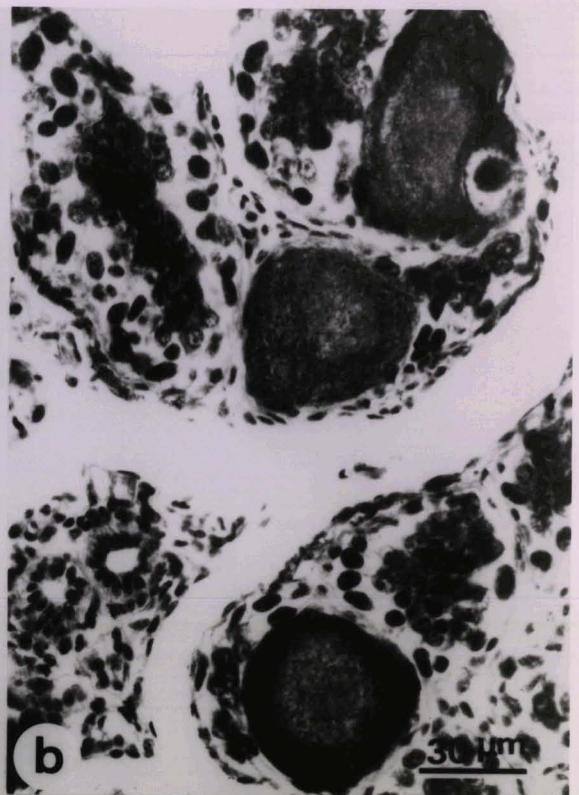
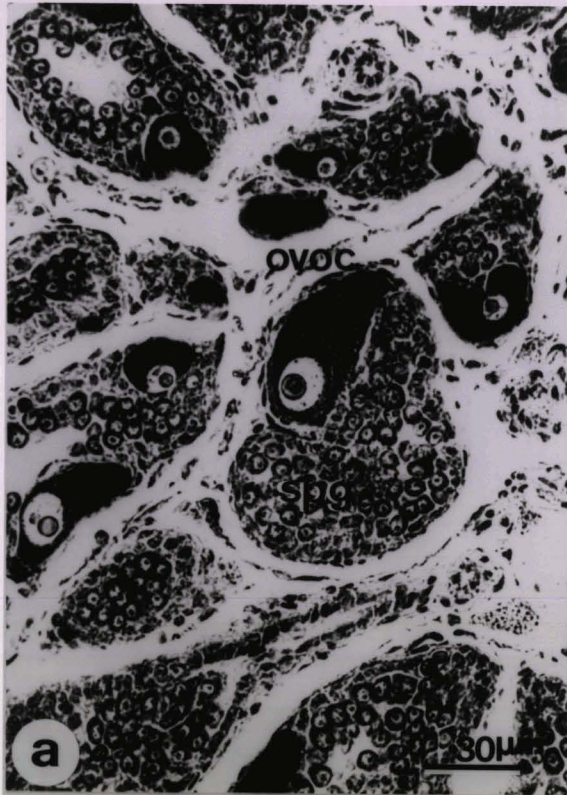
b - Type d'ovocytes fréquemment observés dans un régénérat gonadique prélevé sur un castrat simple ayant subi toutes les semaines jusqu'à la fixation une injection d'extrait cérébral préparé à partir de cerveaux d'animaux en fin de phase mâle.

c - Régénérat gonadique de castrat détentaculé ayant subi toutes les semaines jusqu'à la fixation une injection d'extrait de cerveaux obtenus à partir de donneurs en fin de phase mâle. On observe la présence de nombreux ovocytes de grande taille.

d - Régénérat gonadique prélevé sur une limace castrée ayant subi des injections hebdomadaires d'extraits préparés à partir de ganglions cérébroïdes "juvéniles". On enregistre une stimulation notable de l'accroissement des ovocytes.

ABREVIATIONS UTILISEES : ovoc : ovocyte ; spg : spermatogonies.





BIS
LILLE

PLANCHE XIV

EXPÉRIMENTATION IN VIVO

Examen histologique de glandes hermaphrodites prélevées chez des limaces normales ou tentaculectomisées à l'éclosion, ayant subi des injections répétées de solution physiologique de CHIARANDINI ou d'extraits de ganglions cérébroïdes prélevés chez des adultes (fixations à l'âge de cinq mois).

a à d : Fixation au Bouin-Hollande acétique.

a, c, d : Triple coloration de Prenant.

b : Coloration au Bleu de Toluidine.

a - Gonade prélevée chez un animal normal ayant reçu une injection hebdomadaire de solution physiologique. Cinq mois après l'éclosion, elle se trouve en phase juvénile.

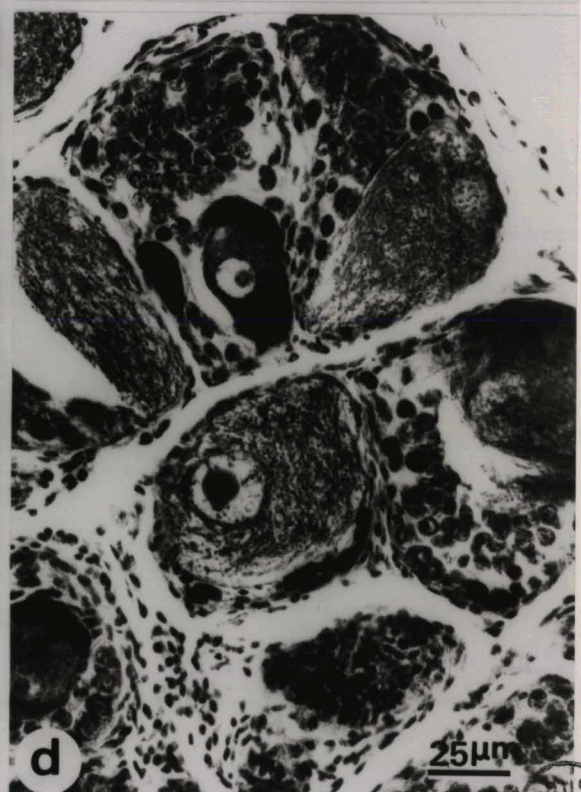
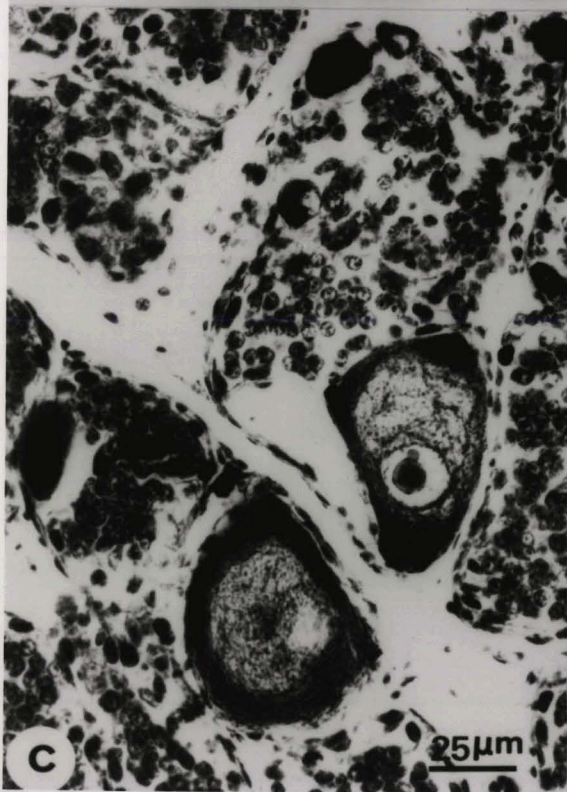
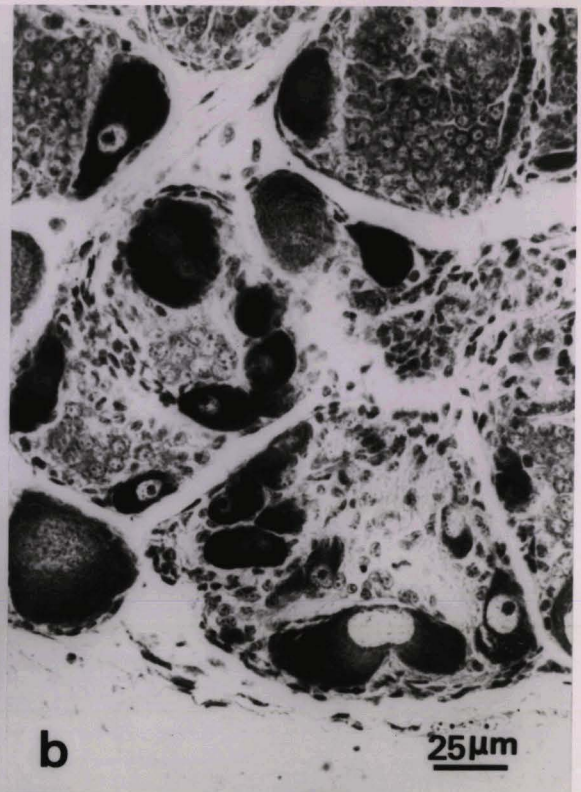
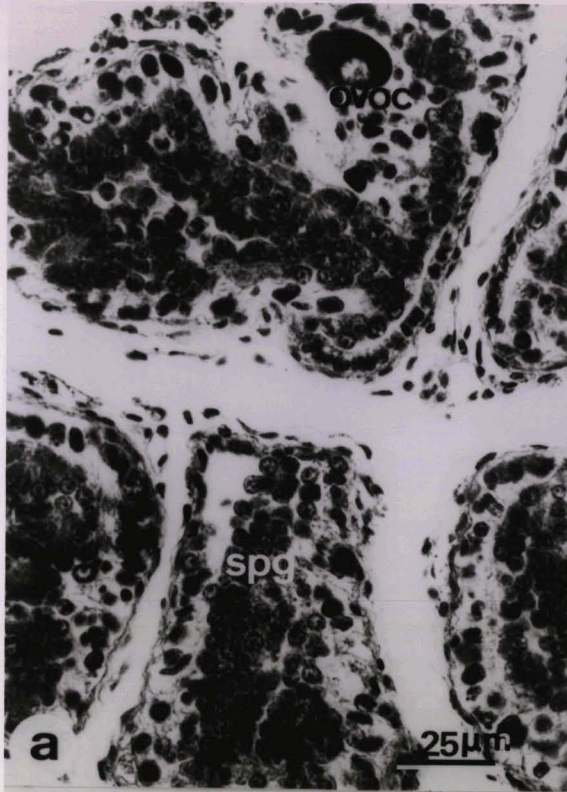
b - Aspect histologique de la glande hermaphrodite d'une limace tentaculectomisée à l'éclosion et ayant subi toutes les semaines jusqu'à la fixation une injection de solution physiologique. Remarquer l'apparition de nettes poussées femelles.

c - Ovotestis prélevé chez une limace normale ayant reçu une injection hebdomadaire d'extrait à base de ganglions cérébroïdes prélevés chez des adultes en phase femelle. Par comparaison avec les témoins (voir figure a), on constate une augmentation du diamètre des ovocytes.

d - Ovocytes de grande taille observés dans la glande génitale d'une limace privée de ses tentacules oculaires dès l'éclosion et ayant subi toutes les semaines jusqu'à la fixation une injection d'extrait de ganglions cérébroïdes prélevés chez des adultes en fin de phase mâle.

ABREVIATIONS UTILISEES : ovoc : ovocytes ; spg : spermatogonies.





MIS
LILLE

PLANCHE XV

EXPÉRIMENTATION IN VITRO

La gonade infantile cultivée isolément ou en association autologue avec tout ou partie du complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau (cultures sur milieu gélosé).

a à f : Fixation au Bouin-Hollande acétique.

a, b, e : Triple coloration de Prenant.

c, d, f : Coloration à l'Hémalun-éosine.

a - Gonade infantile cultivée isolément pendant vingt-et-un jours. Noter l'apparition d'ovocytes.

b - Aspect d'une association autologue gonade infantile - complexe céphalique "infantile" après vingt-et-un jours de culture. Un ovocyte est fléché.

c - Vue d'ensemble après quinze jours de culture d'une association autologue gonade - tentacules oculaires réalisée au stade infantile.

d - Détail de la figure c. On peut constater que la présence des tentacules empêche toute apparition d'ovocytes.

e - Association autologue gonade infantile - tentacules oculaires "infantiles" cultivée pendant vingt-et-un jours. La gonade n'évolue pas dans le sens femelle.

f - Détail d'une association autologue gonade infantile - cerveau "infantile" cultivée pendant quinze jours. Remarquer les poussées ovocytaires.

ABREVIATIONS UTILISEES : c : cerveau ; g : gonade ; t : tentacule oculaire.

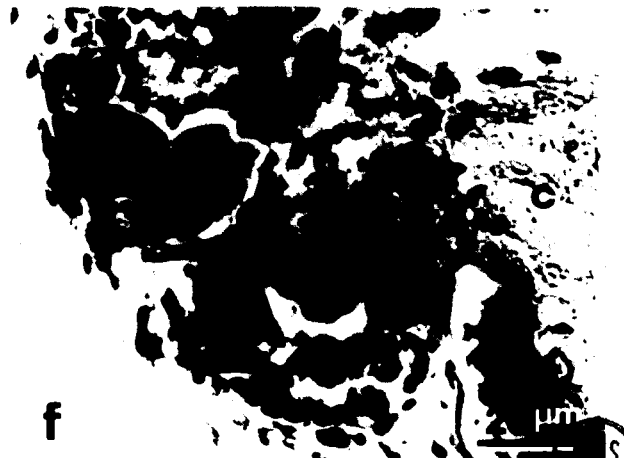
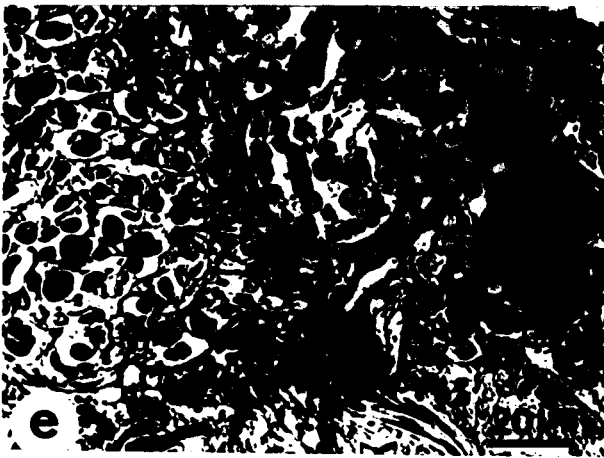
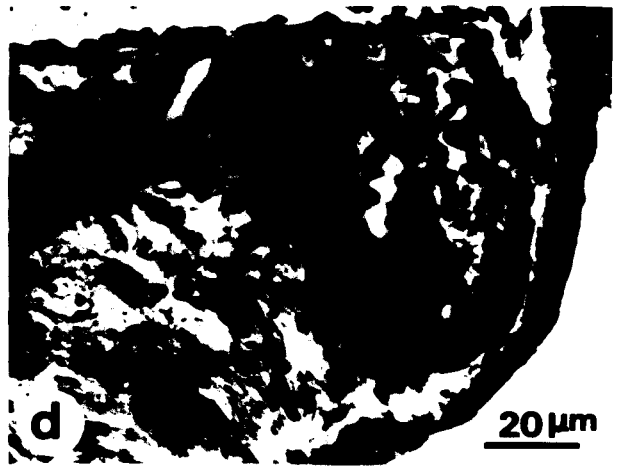


PLANCHE XVI

EXPÉRIMENTATION IN VITRO

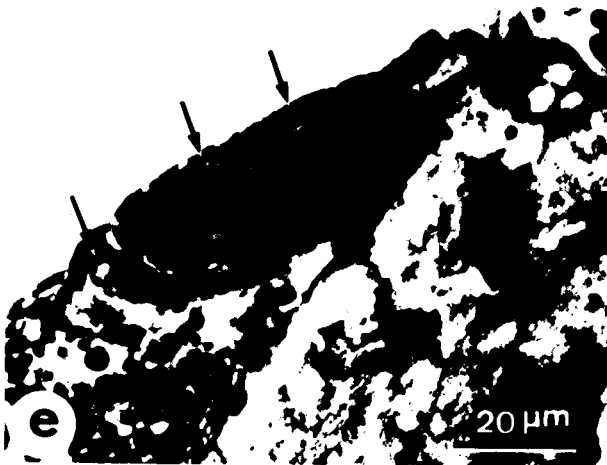
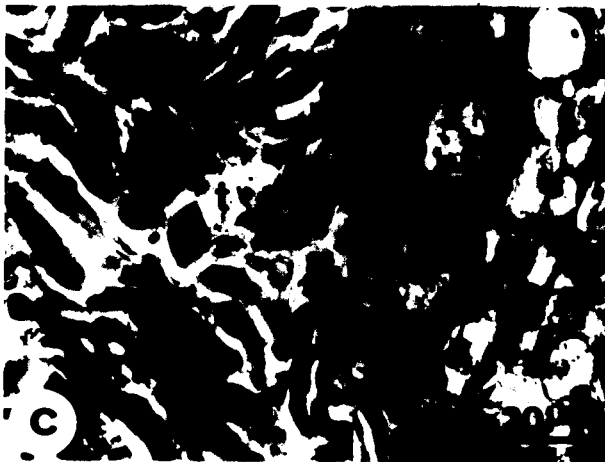
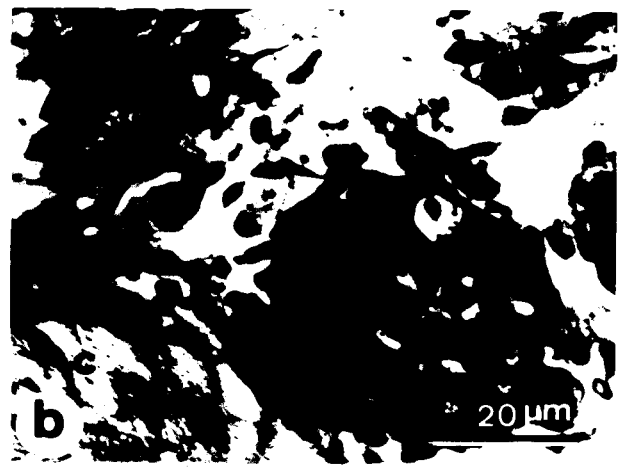
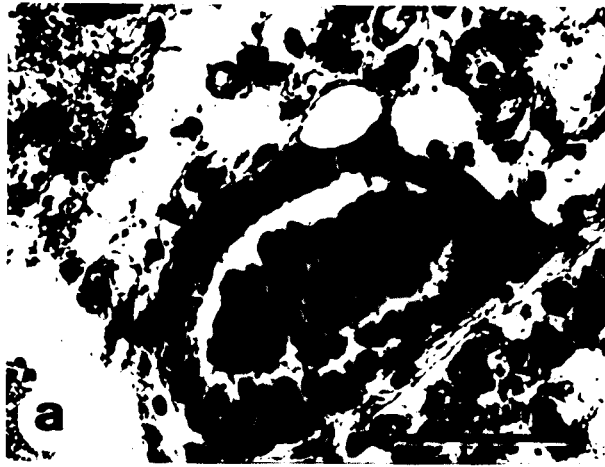
Cultures de gonades infantiles associées à tout ou partie de complexes céphaliques tentacules oculaires - cerveau hétérologues (cultures sur milieu gélosé).

a à f : Fixation au Bouin-Hollande acétique.

Triple coloration de Prenant.

- a - A titre de comparaison : aspect histologique d'une gonade prélevée sur une limace infantile et cultivée pendant vingt-et-un jours en association avec le complexe céphalique autologue. Il n'apparaît pas d'ovocyte.
- b - Gonade infantile cultivée pendant vingt-et-un jours en association avec un complexe céphalique "femelle". Remarquer les nettes poussées ovocytaires.
- c - Aspect histologique d'une gonade infantile cultivée pendant vingt-et-un jours en association avec les tentacules oculaires prélevés sur des limaces en phase femelle. On constate l'inefficacité du tentacule, ce qui se traduit par l'apparition d'ovocytes.
- d - Aspect histologique d'une association triple gonade infantile - tentacules oculaires "infantiles" - cerveau "femelle" après vingt-et-un jours de culture. On dénote dans quelques cultures l'apparition de rares ovocytes malgré la présence des tentacules "infantiles".
- e - Aspect histologique d'une gonade infantile cultivée vingt-et-un jours en association avec un cerveau prélevé sur un animal en phase femelle. Les ovocytes sont fléchés.
- f - Gonade infantile cultivée vingt-et-un jours en association avec des tentacules oculaires "femelles" et un cerveau "infantile". Noter la présence d'ovocytes.

ABREVIATIONS UTILISEES : c : cerveau ; t : tentacule oculaire.



THIS
LIFE

PLANCHE XVII

EXPÉRIMENTATION IN VITRO

Evolution de la gonade infantile ou d'associations gonade infantile - tentacules oculaires (ou cerveau) "infantiles" ou "femelles" en présence d'extraits hétérologues tentaculaires ou cérébraux, obtenus à partir d'animaux en phase mâle (cultures sur milieu liquide).

a à f : fixation au Bouin-Hollande acétique.

Triple coloration de Prenant.

- a - Gonade infantile cultivée pendant vingt-et-un jours en présence d'extrait de tentacules "mâles". Noter l'apparition de rares ovocytes (flèche).
- b - Aspect histologique d'une gonade infantile après vingt-et-un jours de culture en présence d'extrait de cerveaux "mâles". De nombreux ovocytes sont apparus.
- c - Association autologue gonade infantile - cerveau "infantile" cultivée pendant vingt-et-un jours en présence d'extrait tentaculaire "mâle". On constate la présence de rares ovocytes (flèche).
- d - Association gonade infantile - cerveau "femelle" cultivée pendant vingt-et-un jours en présence d'extrait de tentacules "mâles". Les ovocytes sont rares.
- e - Association autologue gonade infantile - tentacules "infantiles" cultivée pendant vingt-et-un jours en présence d'extrait de cerveau "mâle". Dans la plupart des cultures, la présence des tentacules "infantiles" empêche toute apparition d'ovocyte.
- f - Aspect histologique, après vingt-et-un jours de culture, d'une association gonade infantile - tentacules oculaires "femelles" cultivée en présence d'extrait de cerveau "mâle". Les poussées ovocytaires enregistrées démontrent qu'en phase femelle le tentacule a perdu son pouvoir inhibiteur sur la différenciation de la lignée femelle.

ABREVIATIONS UTILISEES : c : cerveau ; t : tentacule oculaire.

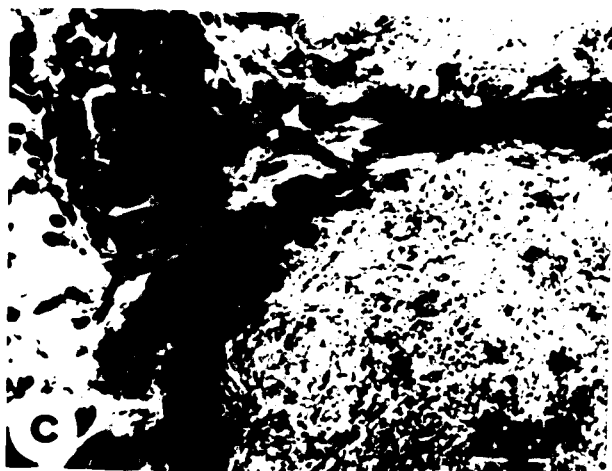


a

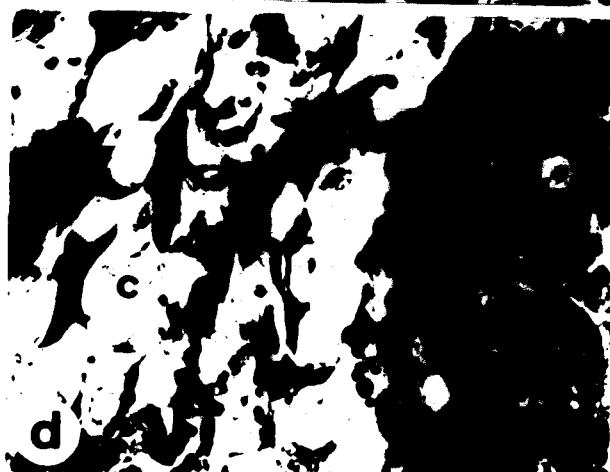
20µm



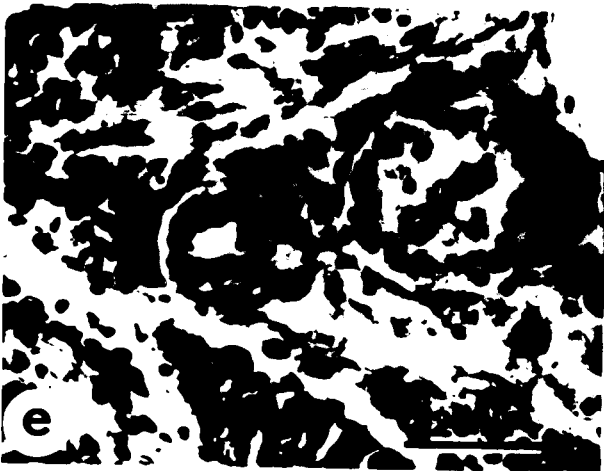
b



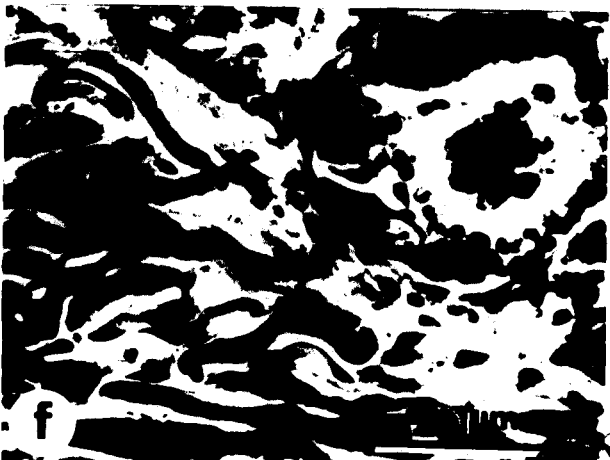
c



d



e



f

1982
LILLE

PLANCHE XVIII

EXPÉRIMENTATION IN VITRO

La gonade juvénile cultivée isolément ou en association autologue ou hétérologue avec le complexe céphalique tentacules oculaires - cerveau (cultures sur milieu gélosé).

a à f : Fixation au Bouin-Hollande acétique.

Triple coloration de Prenant.

a - Fragment gonadique juvénile témoin prélevé au moment de la mise en culture. Les acini sont mixtes (présence de spermatogonies et d'ovocytes).

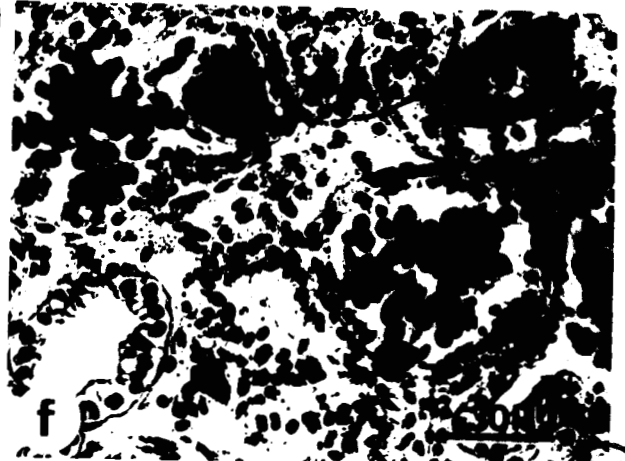
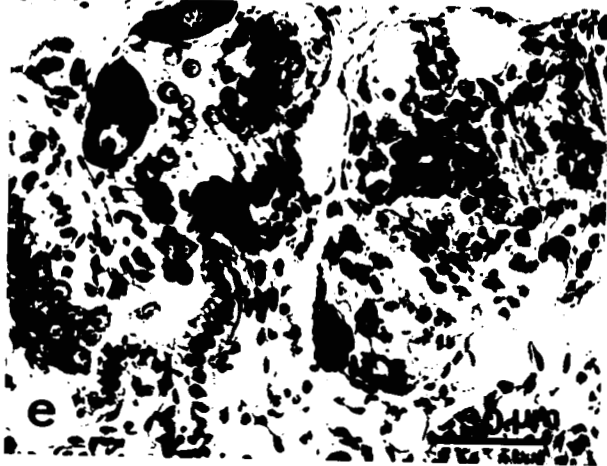
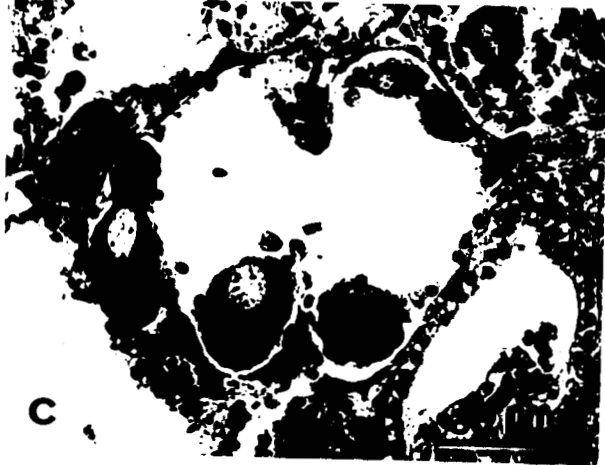
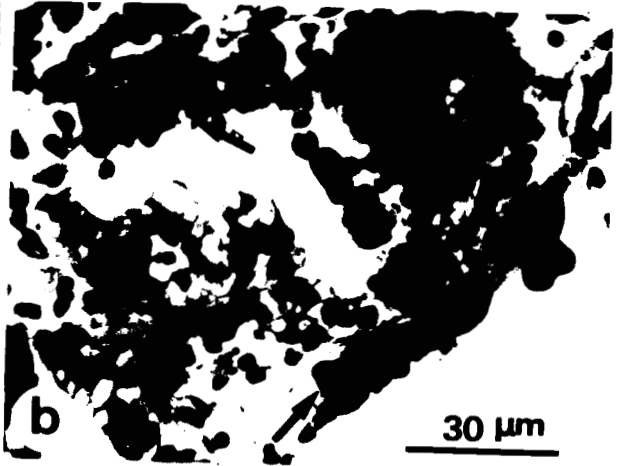
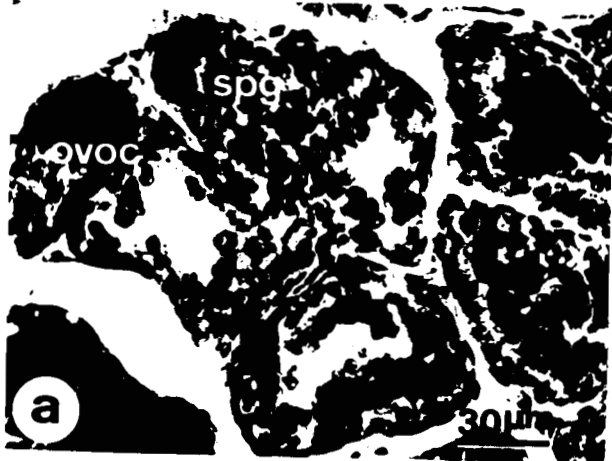
b, c, d - Aspect histologique d'une gonade juvénile après vingt-et-un jours de culture isolée en milieu an hormonal. On note la présence de nombreux jeunes ovocytes (flèches) ; la lignée mâle est en nette régression.

e - Aspect histologique d'un fragment gonadique juvénile cultivé pendant vingt-et-un jours en présence du complexe céphalique autologue. Il est assez proche de celui du fragment témoin prélevé au moment de la mise en culture.

f - Ovotestis juvénile cultivé pendant vingt-et-un jours en association avec le complexe céphalique "infantile". Comme dans le cas précédent (cf. fig. e), on n'observe pas l'apparition de poussées ovocytaires.



ABREVIATIONS UTILISEES : ovoc : ovocyte ; spg : spermatogonies.



ITS
LILL

PLANCHE XIX

EXPÉRIMENTATION IN VITRO


Associations autologues ou hétérologues de la gonade juvénile avec les tentacules oculaires ou le cerveau ou les ganglions cérébroïdes de limaces infantiles ou juvéniles (cultures sur milieu gélosé).

a à f : Fixation au Bouin-Hollande acétique.

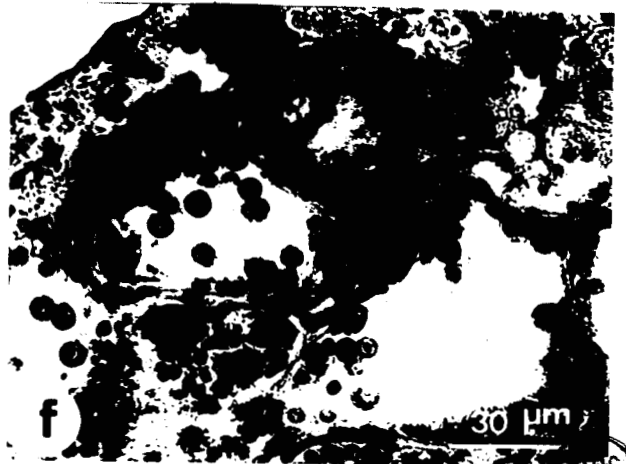
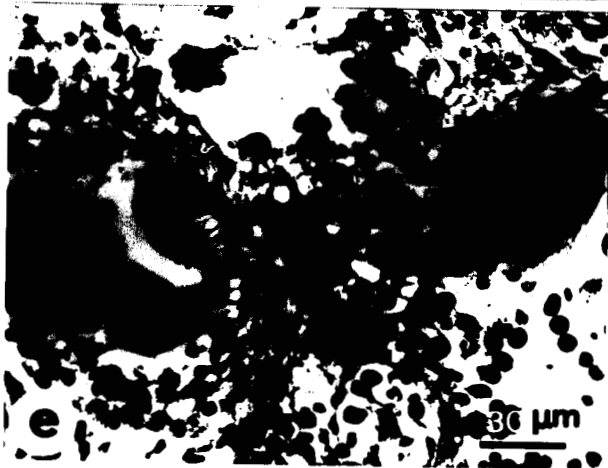
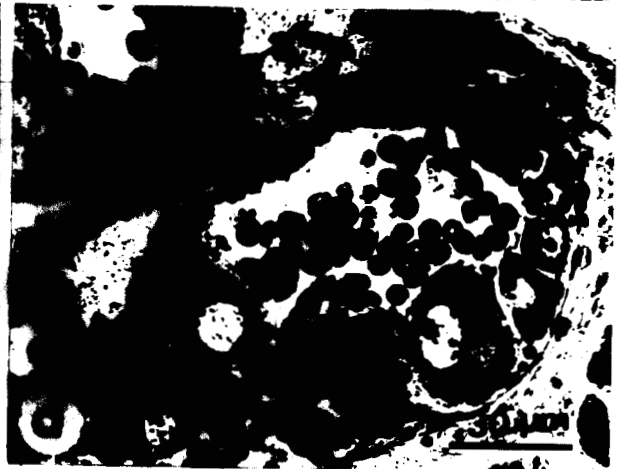
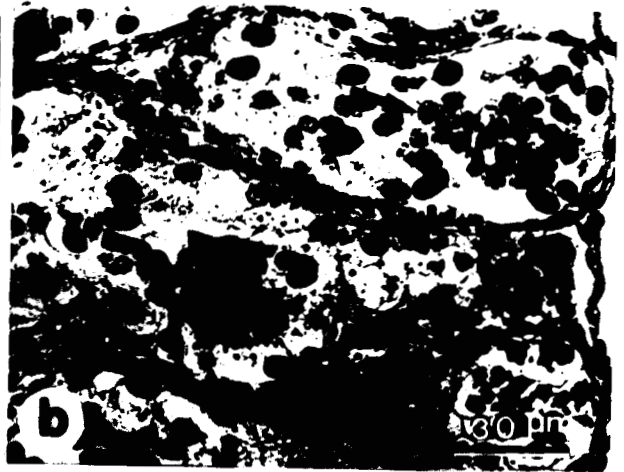
a, c, d, e, f : Triple coloration de Prenant.

b : Coloration à l'Hémalun-éosine.

- a - Association autologue, en phase juvénile, de la gonade avec les tentacules oculaires (quinze jours de culture). Noter un ovocyte dégénéré (flèche) en bordure du tentacule (t).
- b - Mitoses spermatogoniales (flèche) observées dans un explant gonadique juvénile cultivé pendant vingt-et-un jours en association autologue avec les tentacules oculaires.
- c - Association autologue, en phase juvénile, de l'ovotestis avec le cerveau. On constate, après quinze jours de culture, par comparaison avec le fragment témoin prélevé au moment de la mise en culture, une augmentation de la taille des ovocytes.
- d - Gonade juvénile cultivée pendant vingt-et-un jours en association autologue avec le cerveau. Remarquer un acinus renfermant de nombreux ovocytes.
- e - Cas d'une association autologue, réalisée en phase juvénile, de l'ovotestis avec les ganglions cérébroïdes. Après vingt-et-un jours de culture, certains ovocytes ont subi une augmentation de leur diamètre.

 Association hétérologue gonade juvénile - cerveau "infantile". Si l'on compare l'explant gonadique cultivé pendant vingt-et-un jours au fragment témoin prélevé au moment de la mise en culture, on y constate une augmentation du nombre d'ovocytes.

ABREVIATION UTILISEE : t : tentacule oculaire.



U.S.
LILLE

PLANCHE XX

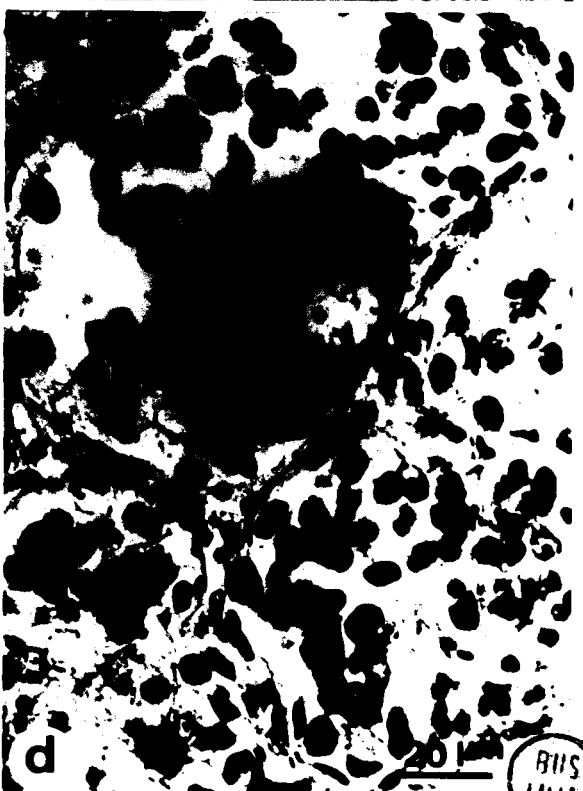
EXPÉRIMENTATION IN VITRO

La gonade juvénile cultivée isolément ou en présence d'extraits homologues tentaculaires, cérébraux ou mixtes (tentacules oculaires - cerveau) (cultures sur milieu liquide).

- a à d : Fixation au Bouin-Hollande acétique.
- a, b, c : Triple coloration de Prenant.
- d : Coloration à l'Hémalun-éosine.

- a - Aspect histologique d'une gonade juvénile cultivée isolément durant vingt-et-un jours. Noter la régression de la lignée mâle.
- b - Explant gonadique juvénile cultivé pendant vingt-et-un jours après adjonction au milieu de culture d'extrait homologue mixte. On n'observe pas l'apparition de poussées ovocytaires.
- c - Ovotestis juvénile cultivé durant vingt-et-un jours en présence d'extrait tentaculaire homologue. Les lignées mâle et femelle persistent.
- d - Ovocyte d'assez grande taille apparu dans une gonade juvénile cultivée pendant vingt-et-un jours en présence d'extrait cérébral homologue.





BIIS
LILLE

PLANCHE XXI

EXPÉRIMENTATION IN VITRO

La gonade juvénile cultivée en présence d'extraits hétérologues tentaculaires, cérébraux ou mixtes (tentacules oculaires - cerveau) obtenus à partir de donneurs en fin de phase mâle ou en phase femelle (cultures sur milieu liquide).

a à f : Fixation au Bouin-Hollande acétique.

Triple coloration de Prenant.

- a - Gonade juvénile cultivée vingt-et-un jours en présence d'extrait mixte préparé à partir de donneurs en fin de phase mâle. Noter la présence d'un ovocyte de grande taille.
- b - Mitoses spermatogoniales (flèches) observées, après trois semaines de culture, dans une gonade juvénile cultivée en présence d'extrait tentaculaire obtenu à partir d'organes prélevés sur des animaux en fin de phase mâle.
- c - Ovocytes observés dans un explant gonadique juvénile cultivé vingt-et-un jours en présence d'extrait cérébral obtenu à partir de donneurs en fin de phase mâle.
- d - Gonade juvénile cultivée vingt-et-un jours en présence d'extrait mixte préparé à partir d'organes prélevés sur des limaces en phase femelle. Noter les poussées ovocytaires (flèche) et l'apparition d'ovocytes de grande taille.
- e - Aspect histologique d'un ovotestis juvénile cultivé vingt-et-un jours en présence d'extrait tentaculaire préparé à partir de donneurs en phase femelle. L'extrait éprouvé est inefficace, il n'empêche pas l'apparition de poussées ovocytaires.
- f - Fragment gonadique juvénile cultivé vingt-et-un jours en présence d'extrait de cerveaux "femelles". On constate que dans une telle culture de nombreux ovocytes ont subi un accroissement important de leur taille.

FILE
508

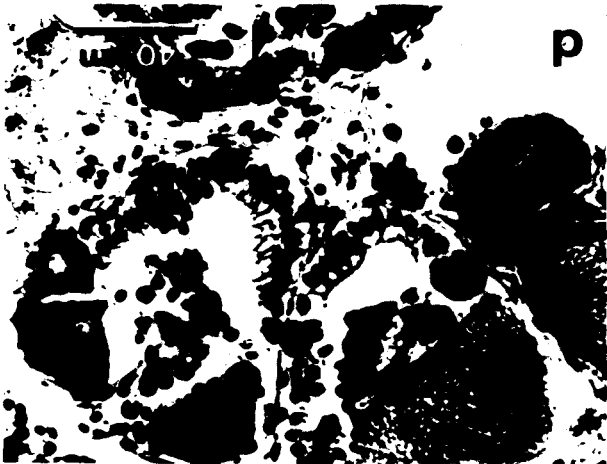
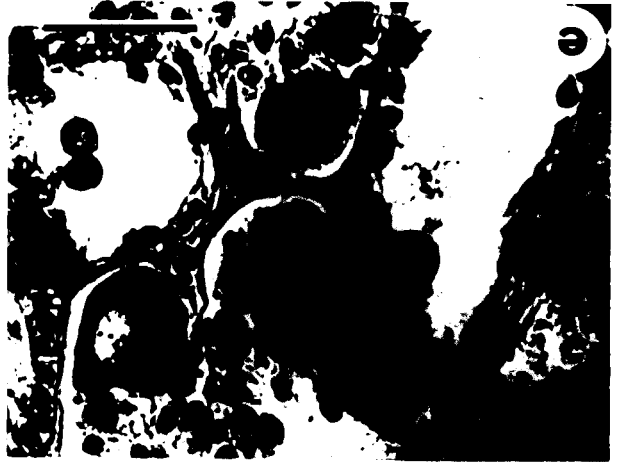
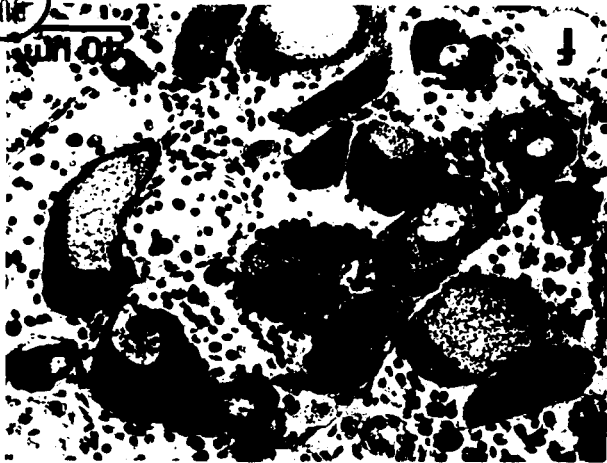


PLANCHE XXII

LE TENTACULE OCULAIRE

a à d : Fixation au Bouin-Hollande sans acide acétique.
Coloration selon la technique de CLARK.

a - Localisation des cellules en collier (c.c).

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

c - Cellules en collier d'une jeune limace. Leur cytoplasme renferme de nombreuses granulations.

d - Aspect des cellules latérales (flèche).

ABREVIATIONS UTILISEES : c.c : cellules en collier ; gcd : ganglion central digité ; n.p : neurones périphériques ; o : oeil.

