Les possibilités de la culture organo-typique en milieu liquide dans l'étude des problèmes parasitaires

I. — La culture organo-typique en milieu liquide d'explants de Planorbes

Par J. BENEX

INTRODUCTION

Les études sur la survie expérimentale sont complexes et multiples, leur domaine interfère avec de nombreuses méthodes de cultures de tissus et certaines techniques de cultures organo-typiques. De très nombreux objets biologiques ont ainsi été mis en survie dans des buts les plus divers.

Pour notre part, nous avons envisagé d'introduire, parmi les méthodes applicables à la biologie parasitaire, le maintien en survie *in vitro* d'organes ou de fragments d'organes, séparés de leurs attaches normales, et appartenant soit à l'hôte intermédiaire, soit à l'hôte définitif.

Cette technique nous a paru devoir faciliter par exemple l'étude de certaines spécificités parasitaires, en particulier la susceptibilité des Planorbes, hôtes vecteurs des Schistosomes, envers la larve infestante, le miracidium.

C'est pourquoi, dans le travail que nous vous présentons aujourd'hui, nous avons été amenés à rechercher la survie *in vitro* d'explants de Planorbes, pendant un temps suffisant pour permettre la pénétration et le développement éventuel du miracidium chez son hôte.

HISTORIQUE

Les recherches poursuivies jusqu'à ce jour sur le maintien en survie de tissus de Mollusques se divisent en deux groupes :

A) Les cultures tissulaires et cellulaires

Ces méthodes ont pour but d'obtenir la multiplication au-dehors de l'organisme de cellules douées de pouvoir de synthèse propre ; les auteurs cherchent à obtenir des lignées cellulaires à partir d'explants de Mollusques sans se préoccuper du devenir de l'explant lui-même.

Les travaux exécutés en vue de telles cultures de tissus diffèrent donc totalement, dans leurs techniques et leurs buts, de ceux poursuivis par nous dans cette étude. Nous en retiendrons cependant ceux relatifs aux tissus des Mollusques, les expérimentateurs s'étant heurtés à des problèmes voisins des nôtres pour la réalisation de leurs solutions de survie.

Les premiers travaux ont souvent été effectués avec peu de succès (Dobrowolskaïa, Rumjanzew, Krontowsky, Janda et Bohuslav).

Il faut attendre les travaux de Gatengy et coll. dans les années 1931 à 1934, pour voir obtenir quelques résultats positifs. En effet, ces auteurs tentèrent maintes cultures à partir de tissus de Mollusques *Helix aspersa*. De petits fragments d'un demi-millimètre carré étaient mis en culture en goutte pendante dans des milieux allant du simple sang de Mollusques à des milieux plus complexes : Ringer, Hedon et Fleig, Ringer-Locke, Lewis avec ou sans addition d'extraits de tissus de Mollusques homologues.

Dans les conditions optimums, la survie maximum obtenue était d'une semaine sans asepsie rigoureuse. Après essais de stérilisation des Mollusques par rayons ultraviolets, et de la solution par autoclave ou filtration, les tissus furent mis en culture, par la même technique, en solution de Hedon-Fleig ; la durée de vie de la culture fut plus longue mais la prolifération cellulaire moins dense.

Premys Bohuslav, en 1933, tenta des essais de cultures de tissus en goutte pendante à partir du tractus digestif, du tractus génital, des glandes salivaires et du cœur d'*Helix*.

Il nota que le sang seul (à la place du liquide amniotique des Vertébrés) était insuffisant comme solution de survie car trop pauvre en éléments nutritifs.

Koniček en 1933, sur le même Mollusque, essaie sans succès des survies d'explants cardiaques. Mais l'année suivante Haugton les réalisa pendant une durée de trois à six jours.

En 1936 Buschbaum, puis en 1949 Bevelander et Martin revinrent à l'expérimentation sur des Mollusques marins plus facile à réaliser grâce à la possibilité d'utiliser l'eau de mer comme milieu de survie. Ces auteurs maintinrent des petits fragments de manteaux de *Pintata radiata* dans un milieu à base de plasma, mais le délai maximum de survie ne dépassait pas six jours.

En 1958 Friedl cultiva des explants d'atrium ou de vaisseaux sanguins de *Limnea stagnalis*, qui continuèrent à battre de manière intermittente durant cinq à quarante jours.

La même année, Vago et Chastang mirent en survie des explants de tunique pédieuse du Mollusque *Helix aspersa*, puis en 1963 Flandre et Vago adaptèrent à la

culture des tissus de Gastéropodes leur technique de culture de tissus d'Insectes en coagulum plasmatique.

Enfin, Elie Chernin, depuis 1963 et encore actuellement, poursuit ses recherches sur la culture de tissus à partir d'explants de muscle cardiaque d'*Australorbis glabratus*, Mollusque qui fait l'objet de notre propre étude.

B) Les cultures organo-typiques

Parmi les méthodes de la culture organo-typique, on doit distinguer deux techniques différentes :

a) La culture organo-typique en milieu solide

C'est principalement une culture *in vitro* d'organes embryonnaires pris au début de leur développement, aux stades d'ébauches, qui n'ont pas encore révélé toute leur potentialité.

Cette méthode s'apparente beaucoup aux techniques de cultures tissulaires. Elle a suscité de très nombreux travaux chez les Vertébrés et en particulier les Amniotes. Depuis quelques années, certains auteurs tentent de l'adapter aux organes d'Invertébrés. Mais les réalisateurs reconnaissent que les difficultés techniques sont plus grandes du fait de la complexité des divers milieux intérieurs et des problèmes posés par l'asepsie des cultures.

La plupart des essais conduits par cette méthode chez les Mollusques ont été faits sur des organismes marins pour lesquels l'eau de mer fournissait un milieu de survie idéal (P. Sengel 1961, Streiff et Peyre 1963). Toutefois, tout récemment, Gomot et Guyard (1964) ont adapté cette technique à l'explantation des gonades de Gastéropodes pulmonés *Helix aspersa*. Ces auteurs étudient ainsi l'influence de divers facteurs nutritifs sur l'évolution de la différenciation des gonades de jeunes *Helix*.

Dans les travaux conduits par la méthode de Wolff et Haffen, les survies réalisées ne cherchent pas à être de longue durée et s'effectuent la plupart du temps sans renouvellement du milieu, les fragments d'organes mis en culture sont de petites dimensions et le support solide à base de gélose toujours indispensable.

b) La culture organo-typique en milieu liquide

Cette méthode a pour but d'obtenir la survie hors de l'organisme d'un organe ou d'un fragment d'organe, déjà différencié, où sont représentées toutes les structures caractéristiques de l'organe considéré.

Dans la survie obtenue expérimentalement, on tente de reproduire, dans les meilleures conditions, la continuation de la vie des tissus telle qu'elle se présente dans l'organisme entier. Les explants peuvent se mouvoir librement au sein du milieu de survie liquide, ils respirent, se nourrissent, se transforment, mais ne se multiplient pas. Cette méthode est en quelque sorte intermédiaire entre la culture proprement dite et l'élevage.

Les premiers essais conduits par cette méthode peuvent être rapportés à Vulpian en 1858 et 1859, lorsqu'il cherche à maintenir en survie des queues de têtard séparées de leurs attaches. Mais les premiers résultats positifs furent décrits en 1909 par Carlgreen expérimentant sur les tentacules d'Actinies, puis par Schultz en 1916 sur les pieds ambulacraires d'Echinides, et par Baltzer en 1917 sur trompe de Bonellie.

Zeibaum en 1925 publie également un travail très intéressant sur la survie de l'épithélium vibratile des branchies d'Anodontes.

En 1932 Odette Tuzet conserve trois mois et demi en survie, en aquarium, des trompes isolées de Bonellie. La même année J.-André Thomas maintient en survie des urnes et des vésicules énigmatiques de Siponcles, pendant trois à six mois. Mais c'est à partir de 1939 que cet auteur étudie systématiquement les possibilités de survie de toute une série d'organites prélevés chez les Invertébrés, en particulier chez les Coelentérés, les Annélides polychètes sédentaires, les différentes classes des Echinodermes : Echinides, Holothurides, Crinoïdes, Ophiurides, Stellérides. J.-André Thomas analyse ainsi les phénomènes de survie et de différenciation structurale au cours de cette survie, chez un grand nombre d'organes ou fragments d'organes externes (pédicellaires, tubes ambulacraires, tentacules, pédicelles, pinnules) prélevés chez diverses espèces. Les temps de survie et la vitalité sont différents selon les organes considérés et leur provenance.

Les phénomènes de survie les plus intéressants chez les Invertébrés ont été étudiés, par cet auteur, en 1941 chez les Stellérides, où certains organes séparés du corps peuvent garder forme et fonction jusqu'à la mort. Tels les tubes ambulacraires de *Marthasterias glacialis* (L.) dont la survie est de plus de vingt jours.

Mais les manifestations de vitalité les plus grandes sont observées par J.-A. Thomas lorsqu'il isole des petits pédicellaires droits d'Astérides. Ces petits organismes libres continuant à se défendre, se contracter, se tordre, ouvrir et fermer leurs valves. Ces manifestations peuvent être conservées pendant plus de trois mois. Des coupes histologiques montrent que la structure est encore voisine de la normale au 60^e jour de survie. Des phénomènes de régénération peuvent même être observés chez des pédicellaires en survie depuis vingt-trois jours.

Au cours de cette série d'expériences, le milieu de survie des organismes était constitué par de l'eau de mer. J.-André Thomas cherchant à prolonger le temps de survie, entreprit alors de réaliser des survies en milieu enrichi à la fois en facteurs alimentaires (protéose-peptone-glucose-extraits d'organes) et en substances antibactériennes (p.-amino-phénylsulfamide) d'une part, et d'autre part régulièrement renouvelé.

Pour ces études, l'auteur s'est adressé aux *organes des Batraciens*. Et c'est ainsi qu'en 1943 il explante des organes de têtards de Grenouille dans diverses solutions salines : Ringer pour Poïkilothermes ou liquide de Holtfreter.

Ce dernier liquide lui permet de maintenir en survie pendant quelques jours des queues de têtards de six à sept millimètres de long, qui continuent à croître et à se mouvoir jusqu'au cinquième jour, puis dégèrent rapidement.

Puis, en 1947, J.-André Thomas met au point un milieu nutritif et antiseptique qu'il propose comme moyen d'analyse morphogénétique. Ce milieu se compose d'une solution physiologique tamponnée, d'une solution antibactérienne (p.-aminophénylsulfamide et pénicilline) et d'une solution nutritive à base de cystéine, d'acides aminés, des deux acides nucléiques et d'acide ascorbique. Elle lui permet de maintenir en survie trois à quatre semaines des petits organes prélevés chez les *Urodèles adultes* : (*T. cristatus* (Laurs.), *T. vulgaris* (Laurs.), *T. palmatus* (Schneid.), *Salamandra maculosa* (Laurs.), (J.-André Thomas et J. Borderioux, 1947-48).

Chez les organites et fragments pourvus d'un squelette (doigts entiers, fragments de membres), on observe peu de modifications de la forme au cours de la survie. Dans le milieu complet, les doigts en survie se maintiennent en bon état dix à quinze jours, puis les tissus internes commencent à dégénérer, les cellules glandulaires se vident, les grains de mélanine sont libérés des mélanocytes, les muscles perdent leur striation, la substance collagène se développe, la vascularisation persiste longtemps. La survie des fragments de doigts peut ainsi atteindre vingt-sept jours.

Par contre, chez les fragments sans armature squelettique (jeunes blastèmes de régénération, branchies de larves), on assiste à une dédifférenciation structurale, qui aboutit à la formation de masses globuleuses. La survie est plus courte (trois semaines), et une lente autolyse interne s'établit progressivement.

Au cours de la survie, les fragments de membres embryonnaires et adultes rénovent et régularisent leur épiderme. Des mues ont pu être observées dès la fin de la première semaine de survie, et trois mues successives ont pu s'opérer chez le même fragment.

C'est cette technique qui nous a paru devoir correspondre aux exigences de notre expérimentation. Nous avons donc choisi d'adapter la méthode de J.-André Thomas aux problèmes particuliers du maintien en survie d'explants de Planorbe.

MATERIEL ET METHODES

Dans la famille des *Planorbidae*, nous avons utilisé deux genres :

1° le genre *Australorbis*, espèce *glabratus*, vectrice de la bilharziose : souches des Caraïbes, Brésil et Porto-Rico ;

2° le genre *Planorbis*, espèce *corneus*, qui n'est pas vectrice.

Dans le cycle de *S. mansoni*, le stade qui nous intéresse correspond à l'infestation du Mollusque par le miracidium.

Lors de nos expériences, le tentacule a été choisi comme explant pour sa facilité de section, la présence d'un épithélium cilié et la pénétration préférentielle du miracidium dans cet organe.

Si la méthode de J.-André Thomas ne nécessite pas une stérilité absolue, nous avons, pour notre part, été amenés à rechercher la désinfection préalable du Mollusque entier, avant la section de l'explant ; ceci afin d'éviter une trop grande prolifération bactérienne dans notre milieu, laquelle, par la suite, contrarierait la survie.

Après de nombreux essais d'antibactériens divers (permanganate, solution d'hypochlorite, d'ammonium quaternaire, rayons U.V.) qui sont résumés dans le tableau I, notre choix s'est porté sur une immersion pendant dix minutes dans une solution de furadoïne saturée et filtrée.

TABLEAU I

	Survie	Aspects des téguments	Survie à longue échéance	Stérilité du milieu après 1 h	Epithé- lium cilié
MnO₄K :					
0,50 ‰	—	—	—	+	—
0,25 ‰	—	—	—	+	—
0,10 ‰	+	—	—	+	—
0,05 ‰	+	+	+	±	+
ClO Na :					
1/10	—	—	—	+	—
1/100	+	—	—	+	—
Chloramine T :					
0,10	—	—	—	+	—
Biocidan :					
3 %	±	—	—	+	—
2 %	±	+	+	+	±
1 %	+	+	+	±	±
Furadoïne solution saturée et filtrée :	++	++	++	+	++
Propionate de Na ...	+	+	+	±	+

Furadoïne = N — (ntiro-5-furfurylidène-2-amino-hydantoïne).

Après rinçage du Mollusque à l'eau stérile, l'explant, constitué par le tentacule en extension, est sectionné sous la loupe binoculaire, près de sa base, d'un coup de ciseau rapide et net, prélevé à la pipette Pasteur rodée, stérile, et immédiatement transféré dans une petite boîte de Pétri contenant 5 ml de la solution saline de survie pour un dernier lavage. Il est ainsi débarrassé de quelques grosses souillures pouvant être restées accrochées dans les cils vibratiles. Puis il est alors porté, toujours à l'aide d'une pipette Pasteur rodée et stérilisée (toute manipulation avec des objets en métal est évitée), dans un tube contenant 5 ml du milieu complet où se poursuivra la survie.

Les tubes ont été préférés aux boîtes de Pétri par suite de la décomposition du bicarbonate et des modifications du pH, dues à l'emploi de ces dernières.

Le changement de milieu est effectué, en général, tous les jours ou tous les deux jours, mais en tout cas dès que le pH du milieu indique une acidification par la variation de l'indicateur coloré.

Lors du changement de milieu, le tentacule est nettoyé, si besoin est, à l'aide d'un pinceau très fin ou de deux effilures de pipettes rodées, à l'aide desquelles on le débarrasse de la gangue microbienne qui l'entoure. Cette opération de nettoyage n'est en général utile qu'aux premiers jours de la survie. Ensuite s'établit une stérilisation suffisante pour éviter cette opération.

Les critères de survie sont :

- Mobilité de l'explant. Contractions musculaires.
- Battements des cils vibratiles.
- Acidification du milieu.

La température optima est de 23°, au-dessus la prolifération bactérienne augmente, au-dessous la vitalité de l'explant diminue.

ETUDE DU MILIEU DE SURVIE

Le problème primordial pour l'obtention d'une survie fut l'établissement du milieu dans lequel devra se poursuivre cette survie.

Si nous avons pour principe de base que notre milieu devait comprendre les trois solutions qui définissent la méthode de J.-André Thomas, à l'époque où nous avons entrepris la réalisation de ce travail, la plupart des cultures organo-typiques d'Invertébrés avaient été effectuées sur des organismes marins pour lesquels l'eau de mer constituait un milieu de survie facile. Les quelques tentatives qui avaient été faites sur des organes d'animaux non marins utilisaient des solutions salines de survie mises au point plus ou moins arbitrairement.

Pour notre part, notre solution physiologique devait répondre à certains critères impératifs :

Elle devait à la fois permettre la survie de nos explants et celle des larves infestantes, les miracidiums, qui seraient appelés à y séjourner.

Pour ce faire, sa composition devait :

- se rapprocher le plus possible du milieu interne des Planorbes avec un Δ° voisin de celui de l'hémolymph ;
- ne pas dépasser pour chaque ion les taux toxiques déterminés pour les Planorbes entiers vivants et pour les miracidiums (Deschiens 1954, Benex 1963) ;
- être équilibrée, tamponnée, stérilisable et se maintenir dans les limites de pH compatible avec la survie de l'explant et du miracidium.

Devant ces impératifs, nous avons entrepris d'établir la composition de notre solution saline d'après l'analyse de l'hémolymph de Planorbe par Florkin en 1943. Les chiffres de cette analyse ont été portés sur le tableau II. Nous avons calculé la correspondance en sels de ces taux déterminés en ions et en cathions, sans dépasser les taux toxiques et en respectant la balance ionique.

TABLEAU II. — *Analyse de l'hémolymph de Planorbes* (Florkin, 1943)
(mg/ml)

Na +	1,98
K +	0,09
Ca +	0,24
Mg +	0,027
Cl —	0,7
P —	0,007
S —	0,01

Toutefois, nous avons été amené à introduire quelques modifications à nos déterminations de base pour respecter des impératifs commandés par d'autres éléments. (La composition finale de la solution saline se trouve sur le tableau III).

Ainsi, le taux de sodium a dû être ramené à 1,35 ‰ pour maintenir la vitalité des miracidiums.

Nous avons d'autre part maintenu la totalité des autres ions, nos explants, eux, exigeant des apports de Ca, de K et de Mg compatibles avec les contractions musculaires, la restauration de l'épithélium et les battements ciliaires.

Le calcium nous a été fourni par le gluconate introduit en quantité correspondante à celle du calcium métal déterminée par Florkin, la pauvreté analytique de l'hémolymph en ion Cl nous interdisant une nouvelle addition de chlorure. D'autre part, la meilleure utilisation par les tissus en survie du gluconate a déjà été démontrée.

L'analyse de Florkin fait apparaître une carence en anion, ce déficit peut s'expliquer selon la théorie de Duval, pour lequel les métaux se trouveraient liés aux carbonates. Cette possibilité nous a enclin, d'autre part, à nous servir de bicarbonate, à la fois comme tampon et comme facteur d'alcalinisation ; le pH des Planorbes se situant vers 7,8, c'est-à-dire légèrement alcalin.

Nous avons donc envisagé, d'une manière générale, l'adaptation la meilleure possible de notre solution physiologique au milieu interne des explants. La survie par inhibition nous faisant pratiquement l'obligation d'un tel équilibre.

Cet équilibre fut d'ailleurs contrôlé par l'égalité de l'abaissement du point de congélation, à la fois dans le milieu interne des Planorbes et dans notre solution.

Ces Δ° cryoscopiques se sont trouvés respectivement de $-0,22^\circ$ et $-0,21^\circ$.

Le respect des facteurs d'équilibre : pH, pression osmotique, balance ionique, nous paraît la condition essentielle d'une bonne survie.

TABLEAU III
Composition du milieu de survie

Solution saline		Solution nutritive	Antibactériens
g ‰		g ‰	Colimycine : 80 µg/ml
NaCl 3,25		Glucose 1,00	Tétracycline : 50 µg/ml
KCl 0,25		E. de levure 1,00	
MgSO ₄ 0,08		Hydrolysate de caséine 1,00	
gluconate de Ca 2,40		Cystéine 0,20	
Système tampon	Na ₂ HPO ₄ 0,10	Glycocolle 0,20	
	KH ₂ PO ₄ 0,02	Acide ascorbique 0,02	
	NaHCO ₃ 0,20	+	
		Sang total + Extrait musculaire	} 10 %
pH 6,96 à 7,02 en 28 jours	pH = 7,07 à 7,65 en 21 jours		
Δ° = — 0,22		NaOH N/10	
pH = 7,6			

Bien entendu, une addition de substances nécessaires à la nutrition des tissus est, elle aussi, indispensable.

La composition de la solution nutritive est également indiquée dans le tableau III.

Après une série d'essais, la concentration glucosique nécessaire et suffisante pour la survie des tentacules fut arrêtée à 1 g ‰.

En ce qui concerne l'apport d'acides aminés, deux substances nous ont paru propres à apporter à nos explants les acides aminés indispensables à la prolongation de la survie : la lactalbumine et l'hydrolysate de caséine. L'analyse du contenu en acides aminés des tissus de *A. glabratus* effectuée par Chernin en 1963, faisant état de 17 acides aminés, mais n'en déterminant pas les concentrations respectives, nous avons testé ces deux substances à des taux de 0,25 à 1 g ‰. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IV. On peut voir que les meilleures survies, par la durée et l'activité de l'explant, furent obtenues avec un hydrolysate de caséine fourni par l'Institut Pasteur de Garches, utilisé dans des proportions de 0,50 g ‰.

Outre cet hydrolysate de caséine, source des acides aminés essentiels, nous avons

été amené à additionner notre milieu d'un complexe sulphydrylé : la cystéine, et à l'enrichir de glycolle, notre matériel explanté étant éminemment contractile.

D'autre part, un apport vitaminique nous a paru indispensable.

Nous avons donc ajouté à ces facteurs nutritifs 0,02 g % d'acide ascorbique, dont la nécessité est reconnue par de nombreux auteurs. Nous avons également apporté à notre milieu le groupe des vitamines B grâce à un extrait de levure. En effet, en plus de la nécessité de la vitamine B1, l'action de certaines des vitamines du groupe B (biotine et acide folique) semble être considérable sur certaines cultures.

TABLEAU IV

Action comparée de la lactalbumine et de l'hydrolysate de caséine sur la survie des explants

	Concentration 0/00 →	0,25	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	1,00
	Durée de la survie en jours ↓									
Lactalbumine	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0
	2	+++	+++	+++	+++	++	++	++	0	0
	5	+	+	++	++	+	+	+	0	0
	8	0	0	+	++	+	+	0	0	0
	10	0	0	+	+	+	0	0	0	0
Hydrolysate de caséine	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
	2	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	0
	5	+	+	++	+++	++	+	±	0	0
	8	0	±	+	+++	++	±	0	0	0
	10	0	0	+	+++	+	±	0	0	0

Désireux, en outre, d'enrichir notre milieu nutritif de survie en extraits spécifiques, nous avons effectué des séries d'essais préliminaires avec, soit des extraits totaux de Planorbes, soit des extraits musculaires, soit du sang, soit du liquide de la cavité interne, soit de ces divers éléments mélangés. Le tableau V résume les résultats obtenus sur cinq jours de survie.

Les extraits totaux de Planorbes entraînent la mort presque immédiate de l'explant, les extraits musculaires au contraire donnent des résultats satisfaisants.

L'adjonction de sang total et de liquide de la cavité interne nous donnait de bons résultats, mais les quantités que l'on peut extraire sont très limitées. Nous avons donc utilisé un mélange d'extraits musculaires + sang total + liquide de cavité interne.

Outre ces facteurs, diverses substances réputées favorables dans les milieux nutritifs ont été testées sans succès quant à leur action sur la survie ; ce furent principalement l'A.T.P. et la carnithine.

— L'A.T.P. a été utilisée sous forme de sel disodique à des concentrations allant de 1/100.000 à 1/1.000 et n'apporta que des résultats peu encourageants créant une dédifférenciation plus rapide (cf. tableau V).

— La carnithine (acide chlorométhyl- γ -diméthyl-amino- β -hydroxybasynique) a été essayée à des taux allant de 10 à 45 % du liquide nutritif total. Là non plus, les résultats n'ont pas été satisfaisants, les phénomènes de dédifférenciation sont accélérés.

Nous nous sommes donc contentés, dans notre milieu nutritif, de glucose, d'hydrolysate de caséine, de cystéine, de glyco-colle, d'extrait de levure, d'acide ascorbique et d'extrait musculaire total de Planorbes.

TABLEAU V

*Action des divers facteurs nutritifs
Vitalité de l'explant après cinq jours de survie*

Concentration % →	1	5	10	20	25	30	40
Adjuvants ↓							
Extraits totaux de Planorbes	±	0	0	0	0	0	0
Extraits musculaires seuls	+	++	+++	++	+	0	0
Sang	+	+	+++	++	+	±	0
Liquide de la cavité interne	0	±	++	+	+	+	0
Sang + liquide de la cavité interne .	+	+	+++	++	+	+	0
Carnithine	0	0	0	0	0	0	
A.T.P.	1/1.000	1/10.000	1/20.000	1/50.000	1/100.000		
	0	0	0	0	0		

Enfin, nous trouvant en milieu septique, nous avons dû, pour protéger la vie de nos explants et limiter la croissance bactérienne, faire appel à certains antibiotiques. Sous le double aspect de la stérilité relative du milieu et de la tolérance des Mollusques aux antibiotiques, nous avons procédé à de nombreux essais résumés dans les tableaux suivants.

Antibiotiques	Doses par ml	Survie	Résultats
Pénicilline	200 U.O.	+	0
	500 U.O.	+	0
Streptomycine	100 µg	0	0
	50 µg	0	0
Chloromycétine	5 µg	+	0
Tétracycline	150 µg	+	+
Terramycine	5 µg	+	+
Colimycine	50 µg	+	++
Bacitracine	1.000 U	0	+
	100 U	±	±
Mycostatine	10 µg	0	+
Sulfamides			
Sultirène	100 µg	±	+
Thiazomide	100 µg	±	±
Rufol	100 µg	0	±
Adiazine	100 µg	0	±
Furadoïne	100 µg	++	+

Nous avons pu ainsi vérifier la très grande toxicité de certains antibiotiques (Weinbac et Nolan) et en particulier de la streptomycine (Chernin, 1957-1959) et de la mycostatine envers nos explants qui moururent en quelques heures après immersion dans le milieu additionné de ces antibiotiques.

Cette première approximation nous ayant permis d'éliminer un certain nombre d'antibiotiques toxiques, nous avons opéré une nouvelle sélection en cherchant parmi les divers antibiotiques ceux dont l'action sur les colonies microbiennes était la meilleure.

Cette même expérience fut répétée au stade des sulfamides avec :

Sulfaméthoxypyridazine (sultirène)	7522 R.P.
P.-amino-phényl-sulfamide-thiazol (thiazomide)	2090 R.P.
P.-amino-phényl-sulfamido-méthyl-diodiazole (Rufol)	
P.-amino-phényl-sulfamido-pyrimidine (adiazine)	2616 R.P.

Finalement, les activités sélectionnées par groupe nous ont donné :

tétracycline — colimycine — bacitracine

Des solutions de ces trois antibiotiques, pures ou mixtes, furent expérimentées pour la survie d'un tentacule maintenu dans 5 ml de solution saline équilibrée. Des doses de 25 à 100 $\mu\text{g/ml}$ furent ainsi essayées ; on notait quotidiennement les modalités de la survie, la vitalité de l'explant, l'importance des proliférations microbiennes. Les résultats furent consignés dix jours de suite.

Ce fut le mélange colimycine, tétracycline, dans des proportions 2/1, qui se révéla à action optimum.

Des essais de ce mélange sur une mise en survie d'explant donne les résultats suivants, comparés à ceux des solutions d'antibiotiques purs :

	Survie	Mobilité	Développement flore bactérienne
Tétracycline : 100 $\mu\text{g/ml}$	+	$\pm$	0
Colimycine : 100 $\mu\text{g/ml}$	+	+	$\pm$
Colimycine + tétracycline : 80 $\mu\text{g/ml}$ 50 $\mu\text{g/ml}$	+	+	0

C'est pourquoi finalement un mélange de colimycine et de tétracycline à des doses de 80 $\mu\text{g/ml}$ et 50 $\mu\text{g/ml}$ est retenu comme antibactérien dans la solution de survie.

FIG. 1. — Evolution du pH dans les solutions

— solution mère,
 ---- solution physiologique diluée,
 -.-.- solution physiologique complète avec gluconate et bicarbonate,
 xxxxxxxx solution nutritive complète.

L'évolution des pH des diverses solutions a été suivie régulièrement. Les résultats sont traduits dans les courbes rapportées à la fig. 1.

Si le pH de la solution-mère s'est révélé très stable : 6,96 à 7,02 sur 30 jours, celui de la solution complète l'est moins : 7,07 à 7,67. Aussi la conservation se fait-elle en solutions-mères stock diluées au moment de l'emploi, et la solution finale est ajustée à pH 7,6 avant l'utilisation.

ETUDE DYNAMIQUE ET MORPHOLOGIQUE DU TENTACULE EN SURVIE

Dans la solution définie au chapitre précédent, les tentacules explantés survivent en moyenne quatre semaines.

Mais si la survie des explants se poursuit d'une façon satisfaisante pendant ce temps, la dédifférenciation structurale de ceux-ci n'a pu être évitée, malgré l'apport d'éléments nutritifs assimilables par voie transtégumentaire.

Cette dédifférenciation structurale conduit à la formation de ces sphères indifférenciées, qui représentent l'état d'équilibre le plus simple et ont déjà été décrites dans les cultures organo-typiques des expérimentateurs précédents.

Dans notre expérimentation, le tentacule une fois sectionné se présente sous la forme d'un petit organite autonome ; sa surface est recouverte d'une file continue de cils vibratiles grâce auxquels il nage rapidement (fig. 1, 2, 3).

Deux types de cicatrisation peuvent intervenir : si la section est nette, elle s'opère en quelques heures par coaptation des lèvres de la plaie, si la section est plus large la formation d'un bouchon muqueux intervient ; mais il y a toujours épidermisation et l'épithélium se reconstitue au niveau de la section et demeurera intact avec sa garniture ciliée jusqu'à la mort de l'explant.

L'évolution de la survie se poursuit durant les premiers jours sans modifications histologiques (fig. 4, 5, 6).

Entre le dixième et le quinzième jour de survie s'amorce le phénomène de dédifférenciation structurale lié à la dégénérescence interne. C'est au niveau du tissu conjonctif que ce phénomène de dédifférenciation est le plus accusé. Celui-ci devient de moins en moins dense, les muscles perdent leur orientation, les structures internes deviennent très lacunaires, les fibres nerveuses dégèrent, les éléments nerveux commencent à disparaître, les nerfs semblent se résorber (fig. 7). L'explant change de forme tandis que la dédifférenciation s'accomplit ; il diminue de volume, devient ovoïde puis sphérique (fig. 8 et 9).

A la fin de la troisième semaine de survie, l'explant se présente sous la forme d'une sphère ciliée (fig. 10) ou dans une structure très lacunaire, le tissu conjonctif tend à former un réseau qui remplit presque totalement la cavité de la sphère, cependant que la masse centrale est formée de cellules libres séparées par des zones claires semblant dépourvues de cellules.

Nous rejoindrons donc l'hypothèse émise par J.-André Thomas en 1941 que la cause principale de la dédifférenciation structurale au cours de la survie est l'épuise-

PLANCHE I

FIG. 1. — Tentacule *in toto* après séparation du mollusque ($\times 60$)

FIG. 2. — Détails de l'extrémité d'un tentacule en survie (deux jours) ($\times 135$)

FIG. 3. — Détails de l'aspect des téguments d'un tentacule au début de la survie (quatre jours) ($\times 260$)

FIG. 4. — Coupe histologique d'un tentacule après cinq jours de survie (hématoxyline phosphomolybdique au dioxane) ($\times 72$)

FIG. 5. — Coupe histologique d'un tentacule en survie depuis huit jours (hématoxyline phosphomolybdique au dioxane) ($\times 135$)

FIG. 6. — Détails de l'organisation tissulaire d'un tentacule en survie depuis six jours (hématoxyline phosphomolybdique au dioxane) ($\times 260$)

PLANCHE II. — *Coupes histologiques*

FIG. 7. — Dédifférenciation structurale d'un tentacule en survie depuis 12 jours ($\times 135$)

FIG. 8. — Tentacule en survie depuis 20 jours. Organisation en ovoïde ($\times 135$)

FIG. 9. — Tentacule en survie depuis quatre semaines. Organisation en sphère ($\times 135$)

FIG. 10. — Tentacule en survie depuis 21 jours. On note la persistance de l'épithélium cilié ($\times 260$)

FIG. 11. — Tentacule pourvu de son œil au 12^e jour de survie. Organisation tissulaire conservée ($\times 135$)

FIG. 12. — Tentacule dépourvu de son œil au 12^e jour de survie. Dédifférenciation structurale amorcée ($\times 135$)

Coloration double hématoxyline phosphomolybdique au dioxane

ment graduel de substances de réserves indispensables au maintien des structures internes ; et à la suite de l'hypothèse émise par cet auteur sur le rôle essentiel du système nerveux dans le maintien de la différenciation, il nous a paru indiqué d'étudier le rôle des éléments nerveux sur le processus de la régression structurale de nos explants.

Il n'a pas été reconnu de ganglions périphériques à la base des tentacules de Planorbes, mais, par contre, il a été décrit dans le repli en forme de feuille qui relie ce dernier au corps du Mollusque, un massif de cellules ganglionnaires et, au voisinage, la présence de l'œil innervé par un large tronc nerveux distinct de celui qui innerve le tentacule.

Nous avons donc comparé l'évolution des tentacules sectionnés pourvus ou dépourvus de ces deux structures.

La présence d'éléments nerveux importants comme ces cellules ganglionnaires et l'œil semble en relation avec la conservation de la forme de l'explant et la persistance des contractions musculaires.

En présence de ces deux structures, la forme allongée de l'explant persiste douze à quinze jours, contre neuf jours en leur absence.

Dans un tentacule en survie depuis douze jours et pourvu de son œil (fig. 11), la forme et la structure interne sont conservées, on note la persistance de l'orientation des fibres musculaires, la présence du tissu conjonctif dense et le maintien de l'organisation tissulaire. Dans un tel explant les contractions musculaires sont nombreuses et celui-ci réagit vivement à chaque excitation.

Chez un tentacule en survie pendant la même durée (douze jours) et dépourvu d'éléments nerveux importants, la dégénérescence a déjà débuté, la forme extérieure a changé, l'organisation en sphère apparaît, les fibres musculaires ont perdu leur orientation, le tissu conjonctif est moins dense. Ici, la perte des mouvements musculaires spontanés est presque totale (fig. 12).

Parallèlement de la dégénérescence des éléments nerveux, l'organisation en ovoïde puis en sphère s'établit. La dégénérescence de l'œil est parallèle à celle du système nerveux et semble commander l'organisation des tissus environnants.

Nous ne sommes pas à même dans ce travail de préciser le rôle exact du système nerveux dans le maintien de la différenciation structurale. Toutefois, les résultats expérimentaux semblent confirmer le rôle joué par des éléments nerveux importants dans le maintien de la différenciation tissulaire.

DISCUSSION

A) La méthode de survie, le milieu, les conditions de survie

Les résultats expérimentaux rapportés dans ce travail font apparaître que pour son maintien en survie *in vitro* chaque objet a ses problèmes propres quant aux conditions optimums de survie et à la composition idéale du milieu. De ce fait, il est toujours nécessaire d'adapter la méthode de base choisie pour le maintien en culture.

TABLEAU VI

Auteurs	Hedon et Fleig modifié par Hill et Bohuslav	Ecole de Wolff Tyrode, Holtfreter, Gey			J. A. Thomas	Fraser
Années	1903-1933	1910	1931	1945	1941	1946
Matériel	Explant <i>Helix</i>	Cultures organo-typiques sur support gélose-organes d'Invertébrés (1961)			Survies organo- typiques en milieu liquide ; organes d'Invertébrés	Etudes embryolo- giques Limnés
NaCl	7,4	8	3,50	8,00	5,35 ms. variable	2,00
KCl	0,42	0,20	0,05	0,38	—	—
CaCl ₂	0,48	0,20	—	0,27	—	0,3
Gluconate de Ca	—	—	—	—	0,50	—
MgCl ₂	—	0,10	—	0,21	—	0,3
MgSO ₄	—	—	—	—	0,15	—
NaHCO ₃	0,10	1,00	0,20	0,25	—	2,0
Na ₂ HPO ₄ . . .	—	—	—	0,15	0,90	—
KH ₂ PO ₄ . . .	q.s. pr pH	—	—	0,025	0,10	0,1
NaH ₂ PO ₄ . .	—	0,05	—	—	—	—
Glucose	2,00	1,00	—	2,00	—	—
pH	6,8	instable	—	7,4	7,4	↓ 7,8 du CaCO ₃

Chernin	Vago	Michelson	Ripplinger	Bénex	Cherrin	Flandre et Vago
1957	1958	1959	1961	1961	1963	1963
Elevage aseptique Planorbes	Cultures de tissus de Gastéro- podes	Elevage aseptique Mollusques Prosobran- ches	Cœur d' <i>Helix</i> hémolymphé hiver	Survies — Explant <i>A. glabratus</i>	Cultures après trypinisation Cœur <i>A. glabratus</i>	Cultures de tissus <i>Helix</i>
2,00	6,5	1,53	4,27	3,25	2,80	0,072
0,10	0,14	0,15	0,30	0,25	0,15	0,004
0,10	0,12	0,20	1,10	—	0,53 à 0,75	0,003
—	—	—	—	2,40	—	—
—	—	0,10	—	—	—	—
0,2	—	—	—	0,08	0,45	0,002
facultatif 1 à 2 ml d'une sol. à 1,4 %	0,20	—	—	0,20	0,05	0,055
0,05	—	0,09	—	0,10	0,07	—
—	—	—	—	0,02	—	—
—	0,01	—	—	—	—	0,002
0,5	1,00	—	—	1,00	1,00 + tréhalose 1,00	0,50
7,2/7,4	7,6/7,9	—	—	7,6	7,5	7,6

En ce qui concerne le présent travail, notre problème se posait sous la forme du maintien en survie d'explants de Planorbes pendant un temps suffisamment long pour permettre une étude parasitologique ultérieure ; nous avons donc adopté les principes de base de la méthode de culture organo-typique de J.-André Thomas et, tout en lui conservant sa simplicité, nous avons été amené à lui adjoindre certains détails techniques des procédés actuels de la culture des tissus pour répondre aux besoins de nos explants.

En ce qui concerne le milieu de survie, les solutions proposées par les auteurs au moment de la mise en route de ce travail nous ont paru peu compatibles avec les exigences des tissus de nos Mollusques.

En effet, spécialement chez les Invertébrés, les milieux internes et les biotopes varient beaucoup d'une espèce à l'autre ; de plus, nous avons affaire à des Mollusques aquatiques non marins et le milieu de survie constitué par l'eau de mer ne pouvait pas être utilisé.

Le milieu de survie optimum doit être celui qui se rapproche le plus du milieu interne de l'objet biologique étudié. C'est pourquoi nous avons établi la composition de notre solution saline d'après l'analyse de la teneur en ions de l'hémolymphe des Planorbes.

Nous avons résumé la composition des différentes solutions salines (exprimée en g %) proposées par les auteurs pour la survie de tissus de Mollusques dans le tableau VI.

Nous y avons ajouté, pour comparaison, les solutions proposées par Chernin et par Flandre et Vago en 1963, bien que ces dernières aient été publiées deux ans après la mise au point de notre propre milieu de survie.

De l'étude de ce tableau, il ressort que jusqu'en 1961 aucune de ces solutions n'était calculée à partir de la composition ionique du milieu interne des espèces de Mollusques utilisés. Les solutions de Hedon, Fleig, Tyrode, Gey, sont des solutions salines équilibrées pour les tissus de Vertébrés. Même si elles sont légèrement modifiées lors de certaines expérimentations, elles ne s'appuient sur aucune correspondance ionique précise avec le milieu interne des objets explantés. En général, elles se révèlent trop concentrées en ions pour les tissus de nos Planorbes.

Cette remarque s'applique également à la solution proposée en 1958 par Vago pour des cultures de tissus de Gastéropodes.

La solution d'Holfreter est déjà meilleure, mais ne peut convenir indifféremment à tous les Invertébrés et manque de certains ions primordiaux.

J.-André Thomas, en 1941, le premier, propose une solution dont la composition peut varier selon les organismes considérés, mais ne l'applique pas à des tissus de Mollusques dulcaquicoles.

Fraser, en 1946, propose bien une solution qu'il dit « similaire au milieu interne des Limnées », mais sans précisions, et, pour son utilisation dans nos propres expériences, il n'est pas prouvé que la composition du milieu interne de Planorbes soit la même que celle des Limnées. Enfin, cette solution est, de par sa composition, très instable, car très peu tamponnée.

Chernin, en 1957, lorsqu'il tente un élevage de Planorbes en milieu aseptique, se contente d'utiliser comme solution stérile celle proposée par Fraser et expérimentée par Carriker avec de très légères modifications.

Michelson, en 1959, reprend aussi ces solutions pour l'élevage en milieu stérile de Mollusques Prosobranches, sans chercher lui non plus à établir des bases analytiques.

La solution proposée par Ripplinger en 1961 et utilisée par la suite par Gomot et Guyard, en 1963, pour l'étude de la gonade juvénile d'*Helix aspersa*, est la seule à être basée sur la détermination de la teneur en ions de l'hémolymph de l'Escargot. Malheureusement, cette composition est très variable selon qu'on la détermine en période sèche ou humide, et cet auteur démontre que ces solutions utilisées sur des cœurs en survie peuvent être très bénéfiques ou très toxiques selon la saison. En outre, le milieu interne des Planorbes doit être, du fait de leur biotope, très différent de celui des *Helix*, et cette solution ne peut convenir aux explants mis en survie au cours de notre propre expérimentation.

En 1963, Chernin propose une nouvelle solution assez différente de sa première, pour la culture de cœur d'*A. glabratus* après trypsinisation. Cette fois, cet auteur prend pour base la teneur en ions de l'hémolymph de Planorbes. Les chiffres qu'il obtient lors de cette détermination diffèrent quelque peu de ceux obtenus par les auteurs précédents (Florkin, Magalhaes) à partir desquels nous avons réalisé notre milieu de survie. Il faut sans doute en conclure que, comme chez les autres Gastéropodes, la teneur en ions de l'hémolymph des Planorbes peut varier selon la concentration en électrolytes du milieu environnant. C'est pourquoi, avant de tenter la survie de nos explants, nous avons vérifié l'équivalence du Δ° de notre solution et celui du milieu intérieur des Planorbes utilisés pour prélever les explants.

Outre les variations dues à la composition différente de l'hémolymph de ses Planorbes, Chernin apporte le calcium de son milieu par adjonction de CaCl_2 . Pour notre part, nous avons préféré le gluconate qui nous a paru plus satisfaisant et plus assimilable. La meilleure utilisation du gluconate par rapport au chlorure avait déjà été signalée par J.-André Thomas et Isabelle Borderieux dans leur travail sur les Urodèles en 1948. D'autre part, l'utilisation du gluconate évite l'introduction de l'ion Cl dans notre milieu où il se trouvait déjà en excès selon les données de Florkin.

Enfin, la faible teneur en phosphore trouvée par Chernin dans l'hémolymph l'amène à additionner sa solution de très peu de phosphates, et comme, d'autre part, la quantité de bicarbonate qu'il introduit dans son milieu est également très faible, il nous paraît que sa solution doit être très peu tamponnée. Mais aucune mention n'est faite à ce sujet par l'auteur.

Outre son rôle dans le système tampon, nous avons été également amené à ajouter du bicarbonate dans notre solution en nous référant au travail de Duval en 1928 qui, se basant sur le Δ° cryoscopique du milieu interne de Planorbes, trouve que la concentration ionique attribuable aux carbonates peut atteindre 59 % dans l'hémolymph de ces Mollusques. Ce qui d'autre part nous permet de ne pas nous inquiéter de la transformation possible du bicarbonate en carbonate dans notre solution au cours de la survie, le pH de nos solutions se maintenant suffisamment stable.

Si on considère les chiffres fournis par Flandre et Vago en 1963 pour leur culture de tissus d'*Helix*, on est frappé par le taux très bas des constituants de la solution saline. Bien que les auteurs précisent que « sa composition répond aux données fournies par l'analyse qualitative et quantitative du sérum d'Escargot », ils ne donnent pas les bases exactes du calcul d'une telle solution. Cependant, ces taux peuvent s'expliquer du fait que ces auteurs utilisent comme milieu nutritif des extraits embryonnaires de Poulet et du plasma de Coq, qui, bien que dilués, doivent augmenter le Δ° de leur solution.

L'augmentation de la concentration ionique due à l'adjonction de substances nutritives dans le milieu de survie ne doit pas, en effet, être négligée. Principalement dans notre propre étude où, outre la survie des explants, celle de la larve infestante dans le milieu doit être envisagée. C'est pourquoi nous avons évité d'introduire dans notre milieu nutritif sérum ou extraits embryonnaires de Vertébrés, qui auraient empêché toute vie des miracidiums dans notre solution finale ; le rôle toxique du sérum de Vertébrés (Cheval et Mouton en particulier) sur les miracidiums ayant été démontré (Kagan, 1955).

La toxicité de tels composants envers les larves explique aisément que Chernin note, en 1963, dans son étude sur la culture de tissus de cœurs de Planorbes, que les miracidiums sont incapables d'éclore dans sa solution, ou meurent immédiatement lorsqu'ils y sont transférés après éclosion. Car, même si sa solution saline était équilibrée avec le milieu interne des Planorbes, cet auteur ajoute dans son milieu nutritif du sérum de Cheval, du liquide amniotique et de l'extrait embryonnaire de Bœuf, qui modifient considérablement le Δ° de la solution dont la concentration ionique doit alors être trop élevée pour les larves.

Chernin note également que sa solution, par contre, n'est pas toxique pour les cercaires. Ceci n'a rien d'étonnant, car les cercaires, étant dans le cycle des Bilharzies la forme infestante des Vertébrés, doivent supporter, de ce fait, des concentrations ioniques bien supérieures à celles tolérées par les miracidiums qui, eux, parasitent les tissus des Mollusques ; d'autre part, il ne semble pas se préoccuper des observations de Kagan sur l'utilisation de produits animaux hétérologues.

Ainsi, dans les conditions où nous nous sommes placés, les composants de notre solution se rapprochent le plus possible de la teneur du milieu interne de nos Planorbes, et les éléments nutritifs ne perturbent pas le Δ° d'une façon notable et sont de nature homologue.

En outre, le pH de notre solution tamponnée varie peu durant les expériences et les solutions stocks sont très stables (plus de six mois). Le calcium est fourni sous forme de sel organique, le gluconate soluble, qui apporte un anion très assimilable.

Les substances nutritives additionnées améliorent les résultats en qualité et en durée. La survie est prolongée de huit à dix jours en solution saline seule, à quatre semaines en milieu nutritif. La différenciation structurale s'établit plus lentement, la nutrition des fragments par voie transtégumentaire à partir de substances dissoutes dans l'eau doit donc être possible. Nos résultats confirment l'existence de ce mode de nutrition pour des fragments séparés de l'organisme et capables d'utiliser les substances

contenues dans le milieu nutritif ; hypothèse formulée par J.-André Thomas et Bordier dans leurs études sur les organes des Echinodermes et des Urodèles, mais déjà soupçonnée par Jolly en 1904 qui provoque des mues chez le Triton par simple « réalimentation » après une longue période de jeûne.

B) Les phénomènes relatifs à l'explant en survie, la dédifférenciation structurale

Malgré l'apport d'éléments nutritifs assimilables, les phénomènes de dédifférenciation structurale conduisant à la mort de l'explant n'ont jamais pu être évités. Cette dédifférenciation est constante et corrélative de la dégénérescence interne. Nous pouvons tenir encore pour valable ce qu'écrivait Claude Bernard : « La dégénérescence qui s'augmente sans cesse par sa propre influence sur la formation des " milieux intérieurs " de l'animal a été la cause de sa mort. »

Bien que chaque groupe zoologique ait ses propres possibilités de survie et de résistance à la dédifférenciation, il apparaît toujours que celle-ci est plus rapide et plus prononcée pour des fragments de petite taille et que son évolution tend à composer l'état d'équilibre le plus simple et conduit à la forme de moindre résistance : la sphère.

Ces formations arrondies qui marquent le terme de la régression structurale ont été décrites avant nous par maints auteurs. Dès 1909, Carlgreen les mentionne dans le résultat de ses survies de tentacules d'Actinies, ainsi que Schultz en 1916 pour les pieds ambulacraires d'Oursin, et Zweibaum en 1915 pour les branchies d'Anodontes. Plus tard, elles sont également l'aboutissement général de toutes les cultures organo-typiques de J.-André Thomas et de son école.

La vitesse d'établissement de cette dédifférenciation et le temps de survie possible de chaque organisme sont variables et constituent, comme le disait Paul Bert, sa « vitalité propre » correspondant aux propres exigences métaboliques et énergétiques de l'organe et de l'espèce considérée.

Mais il apparaît que, parmi l'ensemble des facteurs déterminants que les expériences permettent d'envisager, la présence d'éléments nerveux joue un rôle important sur la persistance de la différenciation structurale des explants. En l'absence d'éléments nerveux importants, la dédifférenciation s'établit plus rapidement et plus profondément.

CONCLUSIONS

Une méthode de culture organo-typique en milieu liquide, dérivant de celle proposée en 1947 par J.-André Thomas, a permis le maintien en survie, pendant une durée au moins égale à trois semaines, de tentacules de Planorbes sectionnés maintenus dans un milieu régulièrement renouvelé comprenant trois solutions : une solution saline équilibrée, une solution nutritive et des antibactériens.

Bien que le milieu de survie soit équilibré et ajusté en ce qui concerne ses composants nutritifs, et bien que le maintien dans l'explant d'éléments nerveux importants augmente la durée de la survie et retarde la dégénérescence, la différenciation structurale est de règle. Cependant, la persistance des phénomènes physiologiques est suffisante pour que l'on puisse envisager des infestations de tels explants par des miracidiums de *Schistosoma mansoni*, en vue d'une étude ultérieure de certains aspects de la spécificité parasitaire.

Les conditions expérimentales de la méthode utilisée devraient faciliter ce travail ; l'étude de ces phénomènes chez des Mollusques entiers se heurtant à des problèmes complexes que la technique des explants permet d'éliminer en partie. Ceci fera l'objet d'une prochaine étude dans cette revue.

Résumé

Dans ce travail, nous avons entrepris la réalisation et l'étude de la survie de tentacules de Planorbes, hôtes intermédiaires vecteurs des Schistosomes.

Dans une première partie, un rappel historique de l'évolution des idées et des recherches sur les phénomènes de survie ainsi que des diverses méthodes utilisées pour ces études, nous a permis de situer notre propre expérimentation dans ce très vaste domaine.

Dans la partie expérimentale, nous avons appliqué la méthode de culture organotypique en milieu liquide renouvelé, proposée par J.-André Thomas en 1941 pour les organes de Vertébrés inférieurs, aux problèmes propres de notre expérimentation et aux besoins spéciaux de nos explants.

C'est ainsi que nous avons été amené à aborder le problème de désinfection préalable des Mollusques avant la section de l'explant.

Puis notre étude s'est portée sur la mise au point des trois solutions devant composer le milieu de survie :

— La solution physiologique dont la composition doit se rapprocher le plus possible du milieu interne des *Australorbis*, ne pas dépasser les limites de toxicité fixées pour les Planorbes entiers, être équilibrée, tamponnée, ajustée à un pH compatible avec la survie des explants et stérilisée.

Cette solution a été établie sur la base de l'analyse de l'hémolymph des Planorbes.

— La solution nutritive qui est indispensable à la prolongation de la survie et doit apporter les éléments essentiels à la nutrition des explants sans modifier par trop la balance ionique du milieu final.

— Les antibactériens qui furent choisis pour les compatibilités avec l'intégrité tissulaire et le maintien de la survie du tentacule ; les tissus des Planorbes s'étant montrés très sensibles aux antibiotiques utilisés habituellement en culture de tissus.

Cette solution de survie dont le pH s'est révélé stable et le Δ° cryoscopique très voisin de celui du milieu interne des Planorbes a permis le maintien en survie de tentacules de Planorbes appartenant à deux espèces et trois souches différentes, pendant une durée au moins égale à trois semaines.

Malgré la possibilité de nutrition par voie transtégumentaire, la dédifférenciation structurale liée à la dégénérescence interne des tissus a toujours été de règle et a été la cause de la mort de l'explant, qui tend au cours de la survie à prendre l'état d'équilibre le plus faible, c'est-à-dire la sphère.

Parmi l'ensemble des facteurs déterminants que les expériences permettent d'envisager, il est indéniable que le système nerveux joue un rôle non négligeable dans le maintien de la différenciation tissulaire. En l'absence d'éléments nerveux importants, la dédifférenciation au sein de l'explant est toujours plus rapide et plus prononcée.

Bibliographie

- BALTZER (F.), 1917. — Echiuriden. I. *Echiurus abyssalis* Fauna. Flor. Golfes Neapel. Monogr., 34, 227.
- BENEX (J.), 1964. — La survie d'explants de Planorbes *Australorbis glabratus* en milieu synthétique, antiseptique et nutritif. *C.R. Acad. Sci.*, 253, 734-36.
- , 1964. — Sur la dédifférenciation des tentacules de Planorbes en survie : rôle de la présence d'éléments nerveux sur le retard de cette dédifférenciation. *C.R. Acad. Sc.* 258, 2193-96.
- , 1965. — Recherches sur l'infection expérimentale de tentacules de Planorbes en survie, par des miracidiums de *Schistosoma mansoni*. Application à l'analyse de la spécificité parasitaire. Thèse, Fac. Sciences, Paris, 145 p.
- et DESCHIENS (R.), 1963. — Incidence des facteurs externes sur la longévité et la vitalité des miracidiums de *Schistosoma mansoni*. *Bull. Soc. Path. exotique*, t. 56, n° 3, 987.
- BERT (P.), 1866. — Recherches expérimentales pour servir à l'histoire de la vitalité propre des tissus animaux. Thèse, Fac. Sciences, Paris, 95 p. Voir aussi : *C.R. Acad. Sc.* (1865), 61, 587.
- BEVELANDER (G.) et MARTIN (J.), 1949. — Culture of mantle tissue of marine Molluscs. *Anat. Rec.*, 105, 614.
- BINET (L.), JULLIEN (A.), RIPPLINGER (J.) et CARDOT (J.), 1955. — Sur une substance de choix la glucosamine, pour assurer une survie de longue durée du cœur isolé d'*Helix pomatia*. *C.R. Acad. Sc.*, 241, 1294.
- BOHUSLAV (P.), 1933. — Die Gewebezüchtung der postembryonalen Verdauungsstraktus der *Glandula salivalis* und der *Receptaculum seminis* bei Mollusken aus der Familie *Melicidae*. *Arch. f. exp. Zellforsch.*, 13, 673.
- , 1933. — Die explantation des reinem postembryonalen Herzbiudegewebes aus *Helix pomatia*. *Arch. f. exp. Zellforsch.*, 14, 139.
- BUSCHBAUM (R.), 1936. — Cultures of some marine Invertebrate tissues. *Anat. Rec.*, 37, 67 suppl. 1.
- CARLGREEN (O.), 1909. — Studien über Regeneration U. Regulationserscheinungen. II. Ergänzende Untersuchungen au Actinarien. *Svensk. Vet. Akad. Handl.*, 42, 1.
- CARRIKER (M. R.), 1946. — Observation on the functioning of the alimentary system of the snail *Limnea stagnalis appressa* say. *Biol. Bull.*, 91, 111.

- CHEMNIN (E.), 1957. — A methode of securing bacteriologically sterile snails *Australorbis glabratus*. *Proc. Soc. exp. Biol.*, a) 96, 204.
- , 1957. — Studies on the biological control of Schistosome bearing snails. VII Streptomycin-induced inhibition of growth and reproduction in the schistosome-bearing snail, *Australorbis glabratus*. *Amer. J. Hyg.*, b) 66, 321.
- , 1959. — Notes of the effects of various antibiotics on *Australorbis glabratus*. *J. Parasit.*, 45, 268.
- , 1963. — Observations on hearts explanted *in vitro* from the snail *Australorbis glabratus*. *J. Parasit.* 49, 353.
- et SCHORK (A. R.), 1959. — Growth in axenic culture of the snail *Australorbis glabratus*. *Amer. J. Hyg.*, 69, 146.
- et SCHORK (A. R.), 1960. — Effects of Streptomycin on the hatching of *Australorbis glabratus* eggs. *Exp. Parasit.*, 9, 9.
- DESCHIENS (R.), 1954. — Incidence de la minéralisation de l'eau sur les Mollusques vecteurs de Bilharziose, conséquences pratiques. *Bull. Soc. Path. exot.*, 47, 915
- DOBROWOLSKAIA (N.), 1916. — Zur frage über die Gewebskulturen bei Fishen und wirbellosen. *Arch. Biol. Wiss.*, 20, 16.
- DUVAL (M.), 1928. — The molecular concentration of the blood of some fresh water Molluscs. Role of carbonates. *Ann. physiol. physiochim. biol.*, 4, 27.
- FLANDRE (O.) et VAGO (C.), 1963. — Culture de tissus de Gastéropodes en coagulum plasmatique. *Ann. Epiphyt.*, 14, n° 2, 161.
- FLORKIN (M.), 1943. — Sur la composition inorganique du milieu intérieur des Invertébrés dulcicoles ou terrestres. *Bull. Soc. roy. Sc. Liège*, 5, 301.
- FRASER (L. A.), 1946. — The embryology of the reproductive tract of *Limnea stagnalis* appressa say. *Trans. Amer. Micr. Soc.*, 65, 279.
- FRIEDL (F. E.), 1958. — Studies on the *in vitro* survival of larval stages of the Trematode *Fascioloides magna*, with analyses of the hemolymph and tissue culture of a snail host *Limnea stagnalis*. *Doctoral dissertation, University of Minesota*.
- GATENBY (J. B.), 1931. — Outgrowths from pieces of *Helix aspersa* the commun snail. *Nature*, 2, 1002.
- , 1932. — Absence of mitosis in tissue culture and regeneration in *Helix aspersa*. *Nature*, 130, 628.
- , 1933. — A technique for studing and movement in explants from *Helix aspersa*. *Arch. f. exp. Zellforsch.*, 13, 665.
- et DUTHIE (E. S.), 1932. — On the behaviour of small pieces of the pulmonary cavity wall of *Helix aspersa* kept in blood. *J. roy. micr. Soc.*, LII.
- et HILL (J. C.), 1934. — Improved technique for non aseptic tissue culture of *Helix aspersa* with notes on Molluscan cytology. *Quart. j. micr. Sc.*, 76, 331.
- et MAC DOUGALD (T. J.), 1934. — On the behaviour of explants of *Helix aspersa* in aseptic and non aseptic tissue culture. *Quart. J. micr. Sc.*, 77, 129.
- GOMOT (G.) et GUYARD (A.), 1964. — Evolution en culture *in vitro* de la glande hermaphrodite de jeunes escargots de l'espèce *Helix aspersa*. *C.R. Acad. Sc.*, 258, 2902.

- GUYARD (A.) et GOMOT (L.), 1964. — Survie et différenciation de la gonade juvénile d'*Helix aspersa* en culture organo-typique. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 89, n° 1, 48.
- HILL (J. C.) et GATENBY (S. B.), 1934. — On the behaviour of small pieces of mantle cavity wall of *Helix aspersa* kept in blood and various artificial media. *Arch. exper. Zellforsch.*, 15, 195.
- JANDA (V.) et BOHUSLAV (P.), 1934. — Sur l'explantation du tissu de la paroi intestinale, et des amœbocytes de *Lumbricus terrestris* L. et des cellules d'épithélium intestinal d'*Anodonta cygnea* L. *Publ. Fac. Sci. Univ. Charles-Prague*, 133, 1.
- JOLLY (J.), 1903. — Sur la durée de la vie et de la multiplication des cellules animales en dehors de l'organisme. *C.R. Soc. Biol.*, 55, 1266.
- JULLIEN (A.), CARDOT (J.) et RERAT (D.), 1954. — Sur les durées de survie du cœur isolé d'*Helix pomatia*, conservé à basse température dans les milieux salins de composition variable. *C.R. Soc. Biol.*, 148, 694.
- , RIPPLINGER (J.), CARDOT (J.) et RERAT (D.), 1955. — Sur les temps de survie du cœur isolé d'*Helix pomatia* en basse température, et en présence de substances chimiques variées. *C.R. Soc. Biol.*, 149, 726.
- KAGAN (I. G.), 1955. — Studies on the serology of Schistosomiasis. I) The *in vitro* activity of cercariae and miracidia in serum of experimental natural and immunized hosts. *Exp. Parasit.*, 4, 361.
- KÖNIČEK (J.), 1933. — Über die kultivation des Lungenbentel und Herzgewebes bei *Helix pomatia*. *Arch. exper. Zellforsch.*, 13, 709.
- KRONTOWSKY (A.) et RUMIANZEW (A.), 1922. — Zur Technik der Gewebeskulturen von Regenwürmern *in vitro*. *Pflügers. Arch.*, 195, 291.
- et SCHUSTOWA, 1914-15. — Zur technik der kulturenzubereitung der Axolotelgewebe. *Zusammenfassung bei*.
- MAGALHAES NETO (B.) et MORAES (J. G.), 1957. — A composição do meio interno de *Australorbis glabratus*. I. Calcio, Fosforo inorganico e cloretos. *Ann. Soc. Biol. Pernambuco*, 15, 69.
- et MORAES (J. G.), 1959. — A composição do meio interno de *Australorbis glabratus*. II) Magnésio, sodio e potássio. *Ann. Soc. Biol. Pernambuco*, 16, 79.
- MICHELSON (E. M.), 1959. — A technique for securing and maintaining bacteriologically sterile prosobranch snails. *Tr. Am. Micr. Soc.*, 78, 256.
- RIPPLINGER (J.) et JOLY (M.), 1961. — Rôle des constituants de l'hémolymph sur l'activité du cœur d'*Helix pomatia*. *C.R. Soc. Biol.*, 155, 825.
- RUMJANZEN (A.), 1917. — Observation on the regeneration of the anterior end in the *Lumbricoidea*. *Rev. Zool. Russe*, 1.
- SCHULTZ (E.), 1916. — Nouvelles expériences sur la survie des fragments tissulaires. *C.R. Soc. Biol.*, 79, 207.
- SENGEL (P.), 1961. — Survie en culture *in vitro* de divers organes d'Invertébrés marins adultes. *C.R. Acad. Sci.*, 252, 3666.
- , 1961. — Explantation *in vitro* de quelques organes d'Invertébrés marins adultes. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 86, 301.
- , 1964. — Utilisation de la culture organo-typique pour l'étude de la morphogénèse et de l'endocrinologie chez les Invertébrés. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, n° 1, 10.

- STREIFF (M.) et PEYRE (A.), 1963. — Survie en culture *in vitro* d'organes de *Calyptrea sinensis* (Mollusque prosobranch). *C.R. Acad. Sc.*, 256, 292.
- THOMAS (J. A.), 1932. — Recherches cytologiques et expérimentales sur les vésicules énigmatiques et les urnes du Siponcle. *Arch. Zoo. exp. et gén.*, 73, 22.
- , 1932. — La culture des vésicules énigmatiques et des urnes du Siponcle. *C.R. Soc. Biol.*, 110, 451.
- , 1941 a. — La survie d'organites des Stéllérides *in vitro* *C.R. Acad. Sc.*, 213, 85.
- , 1941 b. — La différenciation des organites d'Echinodermes en survie *in vitro*. *C.R. Acad. Sc.*, 213, 252.
- , 1947. — La survie d'organites non stériles en milieu antiseptique et nutritif comme procédé d'analyse morphogénétique. *C.R. Acad. Sc.* 225, 148.
- , 1963. — Survie et conservation biologique. *Exposés annuels de Biol. cell.*, Masson Edit., Paris.
- , et BORDERIOUX (I.), 1947. — La survie expérimentale d'organites d'Urodèles en milieu synthétique, antiseptique et nutritif. *C.R. Acad. Sc.*, 225, 963.
- et BORDERIOUX (I.), 1948. — Recherches sur la survie expérimentale d'organites chez les Urodèles en milieu synthétique, antiseptique et nutritif. *Arch. Anat. Micros.*, 37, 263.
- TUZET (O.), 1932. — Survie des trompes de Bonellie séparées du corps. *Bull. Soc. Zool.*, 57, 401.
- VAGO (C.), 1958. — Cultures de tissus prolongées à observation directe. *Microscopie*, 13, 520.
- et CHASTANG (S.), 1958. — Obtention de lignées cellulaires en culture de tissus d'Invertébrés. *Experimentia*, 14, 110.
- VULPIAN (A.), 1858. — Notes sur les phénomènes qui se passent dans la queue des très jeunes embryons de Grenouilles, lorsqu'on l'a détachée du corps. *C.R. Soc. Biol.*, 5 (2^e série), 81.
- , 1859. — Notes sur les phénomènes de développement qui se manifestent dans la queue de très jeunes embryons de Grenouilles après qu'on l'a séparée du corps par une section transversale. *C.R. Acad. Sc.*, 48, 807.
- WEINBACH (E. C.) et NOLAN (M. O.), 1956. — The effect of pentachlorophenol on the metabolism of the snail *Australorbis glabratus*. *Exp. Parasit.*, 5, 276.
- WOLFF (Et.) et HAFEN (K.), 1952. — Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Texas, Report, Biol. Med.*, 10, 463.
- ZWEIBAUM (J.), 1925. — Analyse histophysiologique de l'épithélium vibratile en état de survie *in vitro*. *C.R. Soc. Biol.*, 93, 785.

(Service de Parasitologie et Laboratoire de Biologie cellulaire de l'Institut Pasteur
25, rue du D^r-Roux, Paris, 15^e)