Les possibilités de la culture organotypique en milieu liquide dans l'étude des problèmes parasitaires

II. - Etude comparée de l'évolution de *Schistosoma mansoni*
dans des explants de diverses espèces de Planorbes,
maintenus en culture organotypique.
Essais d'analyse de la spécificité parasitaire.

Par J. BENEX

INTRODUCTION

Dans un précédent travail nous avons rapporté qu'une méthode de culture organotypique en milieu liquide nous a permis de maintenir en survie *in vitro* pendant une durée au moins égale à trois semaines des tentacules de Planorbes séparés de leurs attaches (Bénex, 1966).

Dans le but de préciser certains aspects de la spécificité hôte-parasite, nous avons alors envisagé l'infestation *in vitro* de tels explants par des miracidiums de *Schistosoma mansoni*.

HISTORIQUE.

En effet, si de nombreux auteurs ont étudié la spécificité hôte-parasite, ils ne sont pas encore arrivés à des conclusions formelles quant au déterminisme du choix, de l'implantation et de la pénétration du parasite dans son hôte.

En ce qui concerne plus spécialement les Mollusques et les formes larvaires des Schistosomes, les opinions sont très partagées. Le problème le plus controversé fut celui

de l'existence d'une « attraction miracidienne ». Parmi les principaux partisans de l'attraction, citons : Leiper et Atkinson, Lutz, Faust, Brumpt, Vogel et Wright.

D'un autre côté se rangent les expérimentateurs qui font une très grande place au hasard, tels : Abdel-Malek, Barbosa, Chernin et Dunavan.

Enfin l'étude des processus de développements réussis ou avortés fait également apparaître des divergences d'opinion (Vogel, Cram, Newton, Maldonado et Acostamatenzo, Cowper, Olivier et Mao, Brookes, Sudd, Barbosa).

Il ressort cependant de toutes ces études que si les miracidiums sont parfois capables d'attaquer et d'ébaucher une pénétration chez un hôte « anormal », il existe par contre une spécificité stricte très étroite, géographique même, qui préside à l'évolution de la larve infestante chez son hôte.

Devant ces faits, nous nous sommes proposés d'appliquer la culture organotypique d'explants de Mollusques à l'étude de ces problèmes.

MATERIEL ET METHODES

Les miracidiums utilisés proviennent de l'éclosion d'œufs de Schistosomes de *S. mansoni* de trois souches différentes, « Caraïbes », « Brésil » et « Porto-Rico ». Ils sont recueillis à partir des foies ou du contenu intestinal de Hamsters, après une période d'infestation de six semaines à deux mois, par des cercaires de la souche correspondante : cercaires au nombre de 300 à 400 par animal.

L'éclosion est obtenue en eau de fontaine, sous lumière artificielle, dans un flacon de Mac Müllen muni d'un cache opaque, après lavage des œufs en eau physiologique froide.

La concentration des larves est réalisée grâce à la tubulure latérale et à la direction du faisceau lumineux.

Les miracidiums étudiés sont prélevés dès leur éclosion et dans une limite de temps ne dépassant pas une demi-heure, après la mise en place du flacon. Le prélèvement se fait à l'aide d'une pipette Pasteur effilée.

Technique d'infestation des explants par les miracidiums.

Lorsque l'on veut réaliser l'infestation d'un explant, celui-ci est prélevé de l'enceinte où se poursuit la survie, et porté dans une boîte de Pétri contenant 5 ml de milieu. Un nombre connu de miracidiums fraîchement éclos est introduit à la pipette Pasteur dans la boîte de Pétri et les phénomènes d'attraction et de pénétration suivis à la loupe binoculaire à travers le couvercle. Une fois la pénétration effectuée, l'explant est repris à la pipette Pasteur et reporté dans une nouvelle enceinte de survie.

Etude histologique des explants. Choix d'un fixateur.

Le premier problème qui se soit posé à nous pour l'étude histologique des explants est le choix d'un fixateur approprié. En effet, les tissus de Mollusques ne réagissent pas d'une façon analogue aux tissus des Vertébrés.

Pour l'étude purement histologique, nous avons expérimenté un nombre important de fixateurs usuels. Outre la compatibilité avec les tissus des Planorbes, le fixateur choisi doit convenir aux méthodes de colorations sélectionnées par ailleurs.

Les fixateurs à base de liquide de Bouin : Bouin simple ou Bouin-Hollande, nous ont donné d'assez bons résultats. Les fixateurs à base de formol-pyrogallol ou hydroxy-benzène, par contre, ne nous ont apporté aucun avantage. Aussi nous sommes-nous bornés à utiliser les plus simples : le formol à 10 % isotonique au milieu intérieur des Planorbes ou le Bouin-Hollande au sulfate de cuivre.

Méthodes de coloration.

De nombreuses colorations trichromes : trichrome de Masson, hémalum trichrome, hématoxyline-vert lumière, etc..., furent essayées et adaptées aux tissus des Mollusques, en vue d'obtenir de meilleurs résultats. Toutefois les deux colorations trichromes auxquelles nous nous sommes arrêtés sont, sinon les plus belles du point de vue coloris, du moins les plus fidèles dans la différenciation des tissus. Ce sont la méthode à l'hémalum-éosine-safran et la double hématoxyline phosphomolybdique au dioxane décrite par J.-André Thomas.

La durée des divers temps de coloration a été légèrement diminuée de façon à adapter ces méthodes aux tissus des Planorbes.

Méthodes spéciales pour l'étude du système nerveux. Les imprégnations métalliques.

Parmi les nombreuses techniques d'imprégnations métalliques, beaucoup nous ont conduit à l'insuccès. Il avait déjà été signalé la difficulté d'obtenir de belles préparations du système nerveux des Mollusques par des imprégnations à l'argent (Pan, 1959) ; cependant, abandonnant les méthodes de Cajal, Rio Hortega, Wilder, décevantes sur notre matériel, nous avons sélectionné deux méthodes :

1° La méthode de Bielschowsky, avec la modification de Kernohan pour l'imprégnation de neurofibrilles *. Cette méthode utilise pour l'imprégnation le liquide de Bielschowsky obtenu en redissolvant par l'ammoniaque de l'oxyde d'argent précipité par du nitrate de soude.

2° La méthode de Laidlaw au carbonate d'argent lithiné pour colorer la réticuline **.

Avant toute imprégnation, les coupes étaient passées à la celloïdine et traitées par un oxydant (acide périodique) qui détruit l'affinité du cytoplasme et des noyaux pour l'argent.

* Langeron (M.), *Précis de microscopie*, 1949, Masson Edit., p. 668.

** Masson, *Diagnostics procedure and reagent*, 1963, Harris Colman Edit., N. Y.

Techniques d'histochemie. Mise en évidence des polysaccharides.

Nous avons utilisé le réactif de Schiff (P.A.S.) et le procédé de Mac Manus ***.

Cette coloration caractérise les aldéhydes. L'acide périodique attaque les polysaccharides et libère les fonctions aldéhydiques qui font apparaître une coloration rose-violet lorsqu'ils sont en contact avec de la fuschine décolorée par l'anhydride sulfureux.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. Etude du comportement des miracidiums dans le milieu de survie

La condition primordiale à une infestation réussie des explants par des miracidiums de Schistosomes était que la vitalité des larves ne soit en rien touchée par les composants du milieu de survie.

Dans des expériences préliminaires, nous nous sommes donc assurés de la conservation de cette vitalité lors du transfert de miracidiums fraîchement éclos dans le milieu complet de survie. Leur comportement et leur longévité furent comparés à ceux constatés dans les conditions naturelles optimales. Celles-ci, déterminées en 1963 pour nos souches entretenues au laboratoire, ont montré que pour un pH de 7,5 à 8,5 et une température entre 22° et 28° C, la durée de vie des miracidiums était de 9 heures.

Les résultats obtenus dans notre milieu de survie peuvent se résumer ainsi :

Température du milieu	Durée de survie
30°	2 heures
20°	8 heures
15°	10 heures
10°	12 heures

La zone de mobilité et de vitalité maximales (mouvements rapides, mais pas trop accélérés, bonnes réponses à des excitations) ; se situent à des températures oscillant entre le 18° et 20°. D'autre part, la concentration ionique de notre milieu est parfaitement compatible avec les taux tolérés par le miracidium (moins de 4 ‰) de ClNa.

*** Lison (L.), *Histochemie et cystochimie animales, principes et méthodes*, 1960, Gauthier-Villars Edit., Paris, p. 740.

II. Essais d'infestation des explants

Nous avons réalisé trois séries d'expériences portant sur des individus de souches différentes :

- 1° Infestation réalisée sur des explants provenant d'une souche hautement réceptive.
- 2° Infestation d'explants prélevés sur des Mollusques d'une souche hétérologue.
- 3° Infestation d'explants issus de Mollusques totalement réfractaires.

Ces essais furent effectués dans chaque série à des périodes successives de la survie et tous les résultats obtenus avec des explants furent comparés à ceux observés chez le Planorbe entier de même souche, étudié au même stade d'évolution du parasite.

A) Etude dynamique.

Devant un explant fraîchement sectionné, le comportement des miracidiums est très semblable à celui observé envers un Planorbe vivant.

« L'attraction miracidienne » est comparable et paraît être de même nature.

Les miracidiums semblent d'abord ignorer l'explant, puis au bout d'un temps variable, ils se rapprochent, forment des cercles, attaquent, repartent, puis reviennent définitivement pour se fixer. Le temps de latence avant l'attaque peut durer une demi-heure.

Pénétration du miracidium.

Une fois fixé par le térébratorium, le miracidium grâce à deux mécanismes conjoints, l'un physique, constitué par les fortes contractions de tout son corps, l'autre chimique, grâce à l'enzyme protéolytique contenu dans les glandes céphaliques de pénétration, s'introduit activement à l'intérieur de l'explant.

Dès son introduction complète, il subit un « pelling », la membrane ciliaire et le térébratorium sont rejetés, ils sont résorbés et disparaissent en moins de trois heures. A ce stade, les cellules germinatives se multiplient et en l'espace de vingt-quatre heures donnent des sporocystes-mères généralement de forme ronde.

B) Etude histologique de l'évolution des miracidiums dans un explant prélevé sur un Planorbe réceptif de la même origine géographique.

Le miracidium évolue d'une façon identique dans l'explant ou dans le Mollusque entier jusqu'au stade sporocyste-fille.

Le début du stade « sporocyste-mère » est difficile à déterminer avec précision. Le miracidium, dès qu'il a pénétré dans les tissus du Mollusque, commence sa multiplication germinative. Toutefois, on situe ordinairement le début du stade sporocyste dès la vingt-quatrième heure.

Les sporocystes-mères se présentent comme des sacs à parois très minces difficilement visibles, de forme ronde ou ovale, complètement remplis de cellules contenant un protoplasme granuleux et un réseau de granules réfringents d'une taille supérieure.

La figure 1 illustre ce phénomène dans les tissus du Mollusque *in vivo*. La figure 2 montre les stades correspondants dans le tentacule en explant.

Cependant, vers le quatrième jour après l'infestation, une certaine différenciation dans les cellules germinatives en pleine prolifération devient visible.

On voit apparaître les « masses germinatives » formées par la division des cellules germinatives originales. A ce stade, le contenu des sporocystes-mères se compose de nombreuses cellules germinales, parmi lesquelles se détachent quelques petits embryons de sporocystes-filles de taille plus petite, composés de deux à huit cellules. Au fur et à mesure du développement des sporocystes-mères, le nombre des embryons augmente, tandis que le nombre des cellules germinales isolées diminue. Le nombre de ces masses germinatives ou embryons peut atteindre trois cents par sporocyste-mère.

Vers la deuxième semaine, les sporocystes-filles sont déjà bien évolués et se présentent sous la forme de sacs allongés à parois minces, emplis de cellules germinales.

Dans le Mollusque in vivo.

C'est à cette époque que chez le Mollusque, les sporocystes-filles doués de mouvements propres commencent à quitter les sporocystes-mères et migrent vers l'hépatopancréas et la glande hermaphrodite, où ils se fixent irréversiblement avant de continuer leur évolution (fig. 3).

Les cellules germinales se différencient en petits embryons, ébauches de cercaires, puis, dans un temps plus ou moins long (le temps de maturation n'est pas absolu), le corps de la cercaire se dessine par elongation et constriction de la partie médiane, puis la queue se différencie et les autres structures suivent jusqu'à maturation complète et la sortie des cercaires par effraction à l'extérieur du corps du Mollusque (cinq à six semaines).

Dans l'explant.

Dans le tentacule en explant, à la même époque (deuxième semaine après l'infestation), l'évolution des sporocystes se poursuit *in situ* mais sans migrations (fig. 4).

Les sporocystes-mères évoluent en sporocystes-filles par multiplications germinatives. On retrouve les sacs allongés à parois minces où débute la différenciation des futurs embryons. Cette évolution se poursuit jusqu'au stade III, puis s'arrête à ce stade. Nous n'avons jamais pu obtenir d'embryons complètement différenciés, et encore moins de cercaires. L'évolution, normale jusqu'alors, est soudain bloquée définitivement.

C) Etude histologique de l'évolution des miracidiums de *S. mansoni* dans des explants ou des tissus d'un Mollusque d'une autre provenance géographique.

Pour nos propres expériences, dans le cas d'un Planorbe du Brésil ou d'un explant prélevé sur ce dernier, soumis expérimentalement à la pénétration d'un miracidium de

S. mansoni provenant de Pointe-à-Pitre, le processus de pénétration se produit d'une façon normale semblable à celle qui aurait lieu chez un Mollusque de même souche géographique ; des phénomènes différents ne s'établissent qu'ensuite.

Dans le Mollusque.

Dès que le miracidium a pénétré et essayé de poursuivre son développement, une très forte réaction cellulaire se produit dans les tissus de l'hôte autour du parasite.

A partir du troisième jour, une véritable lésion constituée par le parasite apparaît, d'environ 55 microns de diamètre, de forme ronde, avec un cytoplasme obscur et des

FIG. 1. — Début du stade sporocystes-mères dans les tissus d'un Mollusque réceptif. — FIG. 2. — Même stade dans les tissus d'un explant de 8 jours, prélevé chez un Mollusque réceptif. — FIG. 3. — Sporocystes-filles dans les tissus d'un Mollusque réceptif. — FIG. 4. — Sporocystes-filles dans un explant réceptif de 15 jours. — FIG. 5. — Dégénérescence d'un sporocyste-mère dans les tissus d'un Mollusque non réceptif. Formation de la coque fibreuse. — FIG. 6. — Sporocystes en dégradation dans un explant non réceptif

noyaux nécrotiques. Les tissus autour des miracidiums sont constitués de cellules disposées en rond et bien délimitées provenant de tissus normaux. Ces cellules ressemblent à des fibroblastes (11 sur 2 à 4 microns) : irrégulières, fusiformes, avec un cytoplasme basophile et un noyau allongé, elles forment un mur de 4 à 5 μ d'épaisseur (fig. 5).

Les cellules germinatives du miracidium avortent alors et meurent, laissant un amas cellulaire indéfini qui est envahi par des fibroblastes et les fibres du collagène et est, par la suite, résorbé par les tissus de l'hôte. Extérieurement, ceci donne naissance à une sorte de petite tumeur qui disparaît ensuite.

Ces infiltrats peuvent être décelés de quarante-huit heures au quatrième jour de l'infestation. Les figures obtenues par nous-mêmes sont très semblables à celles déjà décrites par divers auteurs.

Dans l'explant.

Le miracidium ayant pénétré tente de poursuivre son développement et la formation de sporocystes-mères s'ébauche.

Cependant, très vite (douze heures), ceux-ci avortent, la multiplication germinative est arrêtée ; les masses germinales dégénèrent bien que la dédifférenciation structurale de l'explant ne soit pas encore amorcée et que les fibres musculaires gardent leur orientation.

Au bout de deux jours, on ne retrouve plus qu'un amas cellulaire en pleine anarchie (fig. 6).

A la différence de ce qui se passe dans le Mollusque, il n'y a pas de formation de « coque » fibreuse. Les réactions cellulaires des tissus de l'hôte paraissent absentes. Il y a simple refus et destruction du parasite sans que les mécanismes réactionnels des tissus environnants entrent en jeu.

Les barrières tissulaires dues à des réactions antigéniques ou de défense par l'intermédiaire du système histiocyttaire semblent donc absentes dans l'explant.

D) Comportement des miracidiums vis-à-vis d'un explant ou d'un Planorbe entier réfractaire à l'infestation (*Pl. corneus*).

Aucune infestation n'a jamais été possible ni de *Planorbis corneus* jeunes ou adultes, ni d'explants fraîchement sectionnés sur des individus de cette espèce, par les miracidiums issus de notre souche de Pointe-à-Pitre. Quel que soit l'âge du sujet testé, aucune « attraction miracidienne », aucune tentative de pénétration n'a jamais été observée.

E) Rôle de l'âge de l'explant dans l'attraction et la pénétration du miracidium.

Les résultats rapportés aux paragraphes précédents sont relatifs à des explants fraîchement sectionnés. Il nous a paru intéressant de rechercher l'influence de l'âge de l'explant et par-là même de la dédifférenciation plus ou moins avancée, sur le comportement du miracidium.

Le problème était le suivant : la différenciation structurale est-elle le support de la spécificité, et, par-là même, la dédifférenciation entraîne-t-elle la disparition de cette spécificité ? C'est-à-dire le miracidium va-t-il être capable de pénétrer un explant prélevé sur un Planorbe de n'importe quelle origine, à partir du moment où la dédifférenciation est amorcée ou même complète ?

a) Cas d'un Mollusque réceptif.

Jusqu'au quatrième jour de survie, les phénomènes d'attraction et de pénétration sont les mêmes que pour un explant fraîchement sectionné. Entre le quatrième et le huitième jour, l'attraction semble avoir disparu totalement ; la pénétration se fait par hasard et plus difficilement ; certaines infestations avortent. A partir du dixième jour de survie, la pénétration est exceptionnelle ; après le douzième jour, elle ne survient jamais.

Les possibilités de pénétration semblent donc bien dues au maintien d'une certaine différenciation structurale. Au fur et à mesure que s'installe la dédifférenciation, la pénétration du miracidium dans l'explant devient de plus en plus aléatoire, et, lorsque la dédifférenciation structurale du tentacule en survie est complète, la pénétration ne peut plus avoir lieu.

La perte de structures organisées ne conduit donc pas à la déspécification, ainsi que nous en avons émis l'hypothèse. Il paraît au contraire nécessaire au parasite de rencontrer certains tissus, ou certaines substances dans ces tissus et excrétées par eux, pour pouvoir pénétrer son hôte et poursuivre son développement.

b) Cas d'un Mollusque semi-réceptif.

La perte de la possibilité de pénétration se produit encore plus rapidement que dans le cas précédent. Au-delà du cinquième jour de survie, aucune pénétration n'est plus observée.

c) Cas d'un Mollusque réfractaire.

Un phénomène inattendu s'est produit au regard des explants prélevés chez des *Planorbis corneus*.

Rappelons que chez l'individu entier toute pénétration a toujours été impossible, quelles que soient les conditions d'expérimentations.

Dans des tentacules en survie depuis moins de quatre jours, aucune pénétration ne s'est jamais produite. Mais chez des tentacules en survie depuis quatre, cinq, six jours, nous avons pu assister à des tentatives de pénétration par les miracidiums issus de la souche de Pointe-à-Pitre. Ceux-ci attaquent l'explant, s'implantent à la surface et vident le contenu de leurs glandes céphaliques à l'intérieur des tissus du tentacule. Cependant, dans aucun cas, ces essais de pénétration ne sont couronnés de succès. Le miracidium abandonne sa proie, tourne en rond et meurt.

Après huit jours de survie, on n'assiste plus à aucune tentative de pénétration.

A la lumière de ces faits, nous avons tenté d'aborder le problème de la spécificité du choix d'un Mollusque par des miracidiums.

III. Recherches des causes possibles du choix d'un mollusque par les miracidiums

1° Nous avons, en premier lieu, entrepris toute une série d'expérimentations sur des substances pouvant avoir un rôle attractif sur les miracidiums. Nous avons mis en survie dans une seule enceinte un tentacule sectionné d'un *Planorbis corneus* et cinq tentacules sectionnés sur des *Australorbis glabratus* souche de Pointe-à-Pitre, avec seulement 3 ml de milieu.

Au bout de deux, trois, quatre jours de survie, des essais d'infestation de l'explant provenant de *P. corneus* ont été tentés. Tous les résultats ont été négatifs.

Il faut remarquer que si des substances spécifiques provenant des explants réceptifs avaient diffusé dans le milieu de survie, les changements de milieux obligatoires (surtout au début de la survie), pour le maintien de celles-ci, les auraient éliminés. Ces substances, si elles existent, n'ont donc pas eu la possibilité de se fixer sur les explants non réceptifs.

2° D'autre part, et dans la même idée, des essais de greffes ou de fusions par la surface de section d'un tentacule réceptif et d'un non réceptif ont été tentés, mais ceux-ci n'ont pas aboutis, au contraire de ce qu'il a pu être décrit chez les tubes ambulacraires d'Echinides, par Schultz en 1916, ou par André Thomas dans ses cultures organotypiques.

En ce qui concerne nos tentacules, dans un premier cas, dès que la section est faite, il y a coaptation des lèvres de la plaie et l'épithélium de surface ne permet plus de soudure ; ou dans l'autre cas, si l'on pratique la section de façon à avoir une plaie d'une large surface, la coaptation des bords se fait plus lentement, il y a perte de substances (type II de cicatrisation), mais les mouvements très vifs dont chaque tentacule est doué à ce moment, laissent peu de place à une rencontre et à un contact suffisamment long pour l'obtention d'une greffe.

3° Dans une autre série d'expérimentations, le mucus sécrété par des Mollusques réceptifs a été recueilli et des tentacules prélevés sur des Mollusques non réceptifs baignés dans ce mucus durant trente minutes à une heure, puis immédiatement mis en contact avec des miracidiums. Dans ce cas, une certaine « attraction » a pu être constatée entre l'explant et le miracidium. La larve se dirige d'une façon préférentielle vers le tentacule, tourne autour, mais aucune tentative de pénétration n'est amorcée.

4° Des expériences analogues ont été conduites en substituant au mucus des extraits de Planorbis réceptifs dans lesquels l'explant était baigné de trente minutes à une heure.

Des extraits de différentes parties de Mollusque ont été préparés par broyage en solution physiologique appropriée et centrifugation. Puis les explants non réceptifs étaient plongés dans ces solutions pendant quarante-cinq minutes et ensuite mis en présence de miracidiums. Ont ainsi été testés vis-à-vis de leur pouvoir

d'attraction : des extraits de tête et manteau ; des extraits de glande hermaphrodite ; des extraits d'hépatopancréas ; des extraits de tractus digestif ; du sang.

Aucune tentative de pénétration n'a jamais été observée, mais une certaine attraction a pu être notée dans certains cas.

Les résultats obtenus peuvent être schématisés dans le tableau suivant :

EXTRAITS DE MOLLUSQUES RÉCEPTIFS	ATTRACTION CONTACT	PÉNÉTRATION
Tête et manteau	+++	0
Tractus digestif	0	0
Hépatopancréas	±	0
Glande hermaphrodite	0	0
Sang	0	0
Mucus	+	0

5° Dans une dernière série d'expérimentations, nous nous sommes proposés d'étudier le rôle possible de certaines substances adjuvantes sur les phénomènes d'attraction et de pénétration.

La théorie selon laquelle les miracidiums seraient attirés par les Planorbes, grâce à des substances chimiques, a en effet été soutenue par de nombreux auteurs, et tout récemment des expériences d'attractifs chimiques incorporés à de la gélose ont été reprises avec des résultats positifs par Mac-Innis en 1963.

Nous résumerons les résultats obtenus avec de très nombreuses substances utilisées au cours de nos essais comme suit :

a) Aucune différence dans les réponses n'a pu être décelée quant à l'influence du facteur temps de contact entre l'explant et les solutions étudiées.

b) Les substances ayant donné les résultats positifs ont été groupées dans le tableau ci-dessous :

SUBSTANCES ADDITIONNÉES AU MILIEU	ATTRACTION	ESSAIS DE PÉNÉTRATION	PÉNÉTRATION
Acide propionique	++	±	0
Acide aspartique	++	±	0
Acide sialique	++	±	0
Acide glutamique	+	±	0
Glucose	±	0	0

Avec toutes les autres substances, les résultats ont été négatifs.

Devant les résultats de ces expériences, l'hypothèse de la présence de substances diffusibles dans le milieu et responsables de l'attraction miracidienne dans les tissus de revêtement des Mollusques s'est précisée.

Une telle hypothèse de la présence de substances spécifiques de nature inconnue dans le mucus avait déjà été faite par Wright en 1959, pour certains Mollusques voisins des Planorbes (Lymnées). Cet auteur cherchait alors à préciser la taxonomie du genre *Lymnea* par l'étude des différences obtenues dans l'analyse chromatographique du mucus de diverses espèces.

Cependant, peu d'analyses biochimiques des substances mucoïdes de Mollusques ont été entreprises. Hammarsten dès 1885, puis Lévène en 1925 avaient signalé la présence de deux types différents de carbohydrates liés aux protéines chez *Helix*. Les uns obtenus à partir du mucus et du pied, les autres provenant du corps de Mollusques. L'hydrolyse de ces composés n'aboutit pas aux mêmes substances. Elle donne pour les premiers : acide sulfurique, chitosamine et un acide gras volatil ; pour les seconds, constitué par ce que les auteurs appellent la « gomme animale », principalement des polygalactoses.

Des auteurs japonais, Masamune et coll. en 1947 et 1950 dans leur étude générale sur la biochimie des carbohydrates, démontrent la présence d'acide mucoïtinsulfurique, dans le mucus des *Helix* et obtiennent par hydrolyse acide des composés différents s'ils s'adressent à la mucine du pied où à la mucine du mucus. Dans le mucus ils mettent en évidence de la glucosamine et du galactose et dans la mucine du pied de la glucosamine, du mannose et de l'acide galacturonique.

Aucune analyse de ce genre n'a été faite pour les Planorbes. Les difficultés techniques de l'obtention du mucus en quantité suffisante sont peut-être à la base de cette lacune. Les auteurs qui ont étudié la spécificité des Planorbes par des méthodes chromatographiques, l'ont fait sur l'hémolymph ou des extraits totaux des tissus (Target, Dusanic), les résultats de telles chromatographies ne peuvent éclaircir notre problème. En effet, dans notre hypothèse, les substances responsables de l'attraction miracidienne doivent être contenues, soit dans le mucus, soit dans les produits de sécrétions de l'épithélium de revêtement.

On peut envisager en effet, par analogie avec ce qui se passe chez *Helix* que les mucoprotéines du mucus, des sécrétions de l'épithélium et des tissus internes des Planorbes, sont de compositions différentes.

Nous devons donc mettre en évidence une sécrétion éventuelle de l'épithélium de surface et en étudier le pouvoir attractif.

IV. Recherches relatives à des substances sécrétées par l'épithélium

1° Mise en évidence des substances sécrétées par l'épithélium de surface des tentacules.

Pour confirmer l'existence de sécrétions de l'épithélium de surface et mettre en évidence les substances ainsi sécrétées, nous avons eu recours à des colorations histo-chimiques. En particulier, nous avons utilisé la coloration P.A.S. Schiff procédé Mac Manus.

Des tentacules fraîchement sectionnés ou mis en survie depuis des temps variables, sont fixés, coupés et colorés par cette méthode.

Pour des tentacules fraîchement sectionnés ou en survie depuis deux ou trois jours, il s'est révélé le long de l'épithélium une bande rose caractéristique des polysaccharides. Mais dans des tentacules ainsi colorés au P.A.S., les fibres musculaires sont également colorées en rose-violet.

Afin de différencier les sécrétions de l'épithélium et de ne conserver pour la poursuite de nos expériences que ces dernières, nous faisons agir sur nos explants avant coloration une diastase (maltase à 2 %). L'action de cette dernière fait disparaître la coloration due au glycogène et seule la bande rose bordant l'épithélium est conservée.

Le mucus qui recouvre le corps de nos explants est éliminé par un lavage avant fixation et inclusion ; la sécrétion des glandes à mucus est également stoppée lors de la fixation.

D'autre part, une coloration au P.A.S. est faite sur des tentacules infestés maintenus en survie. Dans ce cas, la coloration fait apparaître la présence d'une substance P.A.S. + (rose) dans les sporocystes. Cette substance n'est pas détruite par action de la diastase.

2° Devenir des substances sécrétées au cours de la survie de l'explant.

a) Des colorations au P.A.S. après fixation et coupes, ont été pratiquées sur des tentacules en survie depuis des temps variés.

2, 8, 10, 15, 21 jours.

Dans un tentacule en survie depuis un jour, si l'on ne pratique pas un lavage préalable à la fixation, le mucus demeure à la surface de l'explant et colore celui-ci en rose-violet sous l'action du P.A.S.

Dans un tentacule en survie depuis deux jours, le mucus superficiel a déjà disparu et la coloration au P.A.S. ne fait apparaître que la bande rose de sécrétion le long de l'épithélium.

Dans un tentacule en survie depuis une semaine, les sécrétions du mucus ont totalement disparues, la bande rose bordant l'épithélium s'atténue, la coloration au P.A.S. est plus faible.

Il y a donc une sécrétion de l'épithélium de surface, indépendante de la sécrétion du mucus, qui pourrait expliquer l'attraction élective de certaines parties du corps du Planorbe.

Dans un tentacule en survie depuis quinze jours, la sécrétion épithéliale a pratiquement disparu et dans l'explant en survie depuis trois semaines ou l'organisation en sphère est bien établie, il n'y a plus trace du tout de sécrétion épithéliale.

Cependant la survie en milieu liquide renouvelé ne nous permet pas de contrôler la sécrétion dans le milieu externe. Nous ne pouvons que mettre en évidence la disparition progressive des substances à P.A.S. + du bord externe de l'épithélium du tentacule en survie.

b) Afin de vérifier la présence de cette sécrétion dans le milieu environnant, nous avons tenté des survies de nos explants sur support solide. Mais ce support ne devait contenir aucune substance capable de donner une réaction + à la coloration P.A.S.

Ainsi donc, nous avons préparé de la gélose à 1 % dans la solution physiologique isotonique au milieu intérieur des Planorbes. Cette gélose était stérilisée à l'autoclave, puis répartie dans des salières. Des tentacules fraîchement sectionnés étaient disposés à la surface de la gélose solidifiée dans chaque salière et celle-ci couverte d'un verre de montre luté à la paraffine.

Les tentacules soumis à de telles conditions expérimentales ne survivent que quelques jours, trois ou quatre maximum, mais ce court laps de temps suffit pour permettre aux substances étudiées de diffuser dans la gélose.

Au bout de deux jours, le verre de montre est ôté, l'explant retiré et les blocs de gélose colorés par la technique du P.A.S. La vitalité du tentacule après cette survie sur gélose est vérifiée en le replaçant dans le milieu nutritif liquide, où l'on constate la persistance de mouvements musculaires, mais les battements ciliaires sont diminués du fait du séjour sur la gélose.

Une remarque technique s'impose ici. Les plaques de gélose traitées par l'acide périodique, puis lavées soigneusement, étaient colorées par le réactif de Schiff, puis par l'acide sulfureux. La lecture de la coloration (0 - + - + + - + + +) s'effectuait alors à ce stade et immédiatement, sans lavage, la fuschine ayant tendance à se recolorer ultérieurement. Toute lame non évaluée dans les quinze minutes, qui suivaient le troisième bain d'acide sulfureux était considérée comme non valable. Des essais de dessèchement de la gélose avant coloration se sont révélés impropres.

Suivant cette technique une série de colorations par le P.A.S. ont ainsi été faites :

1) Blocs de gélose à 1 % dans une solution minérale équilibrée seule ; blocs de gélose à 1 % dans la solution nutritive complète sur lesquels un tentacule avait été mis en survie deux jours, comparaison avec blocs de gélose qui n'avaient pas reçu d'explants.

2) Blocs de gélose à 1 % sur lesquels des Planorbes vivants avaient été placés une demi-heure et avaient pu déposer leur mucus et le produit de leur sécrétion, blocs de gélose témoins.

3) Blocs de gélose sur lesquels on avait placé pendant une heure des extraits tissulaires de Planorbes fraîchement préparés (extraits totaux de Planorbes moins l'hétopancréas, la glande hermaphrodite et le tractus digestif).

Les colorations par le P.A.S. de tous ces blocs de gélose ont donné des résultats positifs : les témoins gélose pure ayant tous été négatifs dans les conditions expérimentales données ci-dessus. Seuls les blocs de gélose contenant le milieu nutritif total ont donné des réactions douteuses. Dans la suite de l'expérimentation, la gélose a toujours été préparée avec la solution minérale équilibrée seule.

Chaque plaque de gélose ayant reçu des sécrétions, soit de Planorbes entiers, soit d'explants, était fortement colorée en rouge. L'intensité de coloration variant selon le temps de contact entre la gélose et les tissus.

Les substances donnant une coloration P.A.S. + diffusent donc dans le milieu.

Ainsi donc des substances à caractère de mucodysaccharides diffusent dans le milieu externe à partir du tentacule en survie.

Le problème s'est alors posé du rôle de ces sécrétions dans l'attraction miracidienne.

V. Recherches relatives au rôle des substances en cause dans la spécificité de l'attraction miracidienne

A) Essais expérimentaux d'attraction miracidienne.

1) Sur des séries de paires de tentacules mises en survie le même jour et appartenant au même individu, nous avons pratiqué à intervalles réguliers et simultanément : chez l'un une coloration P.A.S. après fixation et coupe, chez l'autre un test d'attraction miracidienne.

Les expériences ont révélé que :

a) La perte du pouvoir d'attraction était corrélative de la disparition de la sécrétion de la substance P.A.S. + par l'épithélium de l'explant.

b) La présence ou l'absence de mucus superficiel ne paraît pas avoir d'effet sur les tentatives de pénétration dans les explants.

c) Chez des tentacules en survie appartenant à une souche non susceptible à *Schistosoma mansoni* (*P. corneus*), c'est au moment où la sécrétion de cette substance décroît que les rares tentatives de pénétration des miracidiums ont été notées.

2) Dans une autre série d'expériences, des blocs de gélose ayant reçu les sécrétions des Planorbes ou des explants (cf. chapitre précédent) ont été mis en présence de miracidiums pour tester leur pouvoir d'attraction.

Des blocs de gélose témoins ont été testés parallèlement ; ceux-ci étaient constitués par de la gélose dissoute dans des solutions diverses. Les résultats obtenus peuvent être résumés dans le tableau ci-après.

	ATTRACTION	CONTACT	PÉNÉTRATION
Gélose en eau distillée	0	0	0
Gélose + solution φ seule ...	0	0	0
Gélose + solution φ + gluconate	0	0	0
Gélose + solution φ + sol. nutritive complète	0	0	0
Gélose + acide propionique .	+++	+++	$\pm$
Gélose + acide galacturonique	+	$\pm$	0
Gélose + sécrétions planorbes entiers	+++	+++	$\pm$
Gélose + sécrétions de l'explant	+++	++	0
Gélose + extrait tissulaire ...	++	++	0
Gélose + glucosamine + galactose	0	0	0

Conclusions des expériences préliminaires.

Des résultats de ces expériences, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

a) Nous savons déjà grâce à la coloration P.A.S. que ces substances, à caractères chimiques encore non définis, sont des corps capables de libérer des aldéhydes.

b) Ces substances mises en évidence par la coloration P.A.S. sont localisées dans l'épithélium de revêtement et leur disparition au cours de la survie est corrélative de la perte du pouvoir d'attraction et par-là d'infestation.

c) La substance responsable du pouvoir d'attraction d'un explant ou même d'un Mollusque entier vivant peut être retirée par lavage des tissus dans une solution d'alcool éthylique diluée ; si les tissus n'ont pas été lésés, cette perte n'est pas irréversible et le pouvoir d'attraction peut réapparaître au bout de quelques heures.

d) Certaines substances chimiques peuvent donner lieu à une attraction, mais les constituants du milieu de survie n'interviennent pas dans ces phénomènes.

e) L'attraction la plus spectaculaire est toujours observée avec des extraits musculaires de Planorbes.

Devant ces résultats s'est renforcée notre conviction du rôle de substances à caractères mucopolysaccharidiques ou glycoprotéiques sécrétées par l'épithélium de revêtement des Mollusques dans l'attraction miracidienne.

Les tentatives d'extraction de cette substance s'étant révélées infructueuses, nous avons abordé le problème par la proposition inverse.

Si le traitement par une diastase, détruisant spécifiquement les substances sécrétées, faisait du même coup perdre aux explants leur pouvoir attractif, il serait probable que les substances responsables de cette action fussent des mucopolysaccharides sécrétées par l'épithélium.

Pour cette série d'expérimentations, nous avons utilisé une mucopolysaccharidase, la thiomucase. Cette enzyme, voisine mais différente de l'hyaluronidase, a le pouvoir de dépolymériser l'acide chondroïdine sulfurique et par-là d'éliminer les mucopolysaccharides des tissus (Castaing, 1959). Son action sur les explants ou les tissus de Mollusques doit donc, si les mucopolysaccharides sont responsables de l'attraction miracidienne, faire disparaître le pouvoir attractif.

B) Action de la thiomucase

Avant toute expérimentation sur les explants, des essais préliminaires furent effectués, tout d'abord chez des Planorbes entiers vivants pour déterminer la toxicité éventuelle de l'enzyme.

Puis l'action de l'enzyme a été ensuite testée vis-à-vis des tentacules explantés.

La dose de thiomucase à utiliser sans dommage pour les tissus internes des explants a été fixée à 1,25 U/ml pendant 10 à 12 minutes. Après une telle action, la coloration au P.A.S. Schiff ne fait plus apparaître aucune coloration rose. Mais si un tel explant est reporté dans le milieu nutritif de survie, la sécrétion réapparaît progressivement entre une demi-heure et deux heures ; au bout de quatre heures elle semble complète.

Nous avons alors vérifié le rôle de ces sécrétions dans l'attraction miracidienne.

Des paires de tentacules prélevées chez le même individu ont été mises en survie pendant un jour et demi afin d'éliminer le mucus superficiel, puis un tentacule seulement a été traité par la thiomucase ; les deux ont alors été mis en présence de miracidiums. La disparition de ces substances mucopolysaccharidiques tant au cours de la survie que par le traitement enzymatique s'est révélée corrélative de la perte du pouvoir d'attraction. Mais cette disparition est réversible, la reprise des sécrétions après traitement ménagé par l'enzyme entraîne le retour du pouvoir attractif.

	ATTRACTION	CONTACT	PÉNÉTRATION
Tentacule sain	+++	+++	+++
Tentacule traité par l'enzyme .	0	0	0
Tentacule traité et remis en survie 24 heures	++	+	0
Planorbe sain	+++	+++	+++
Planorbe traité par l'enzyme .	0	0	0
Gélose ayant reçu les sécrétions des tentacules	++	++	0
Même gélose traitée par l'enzyme	±	0	0

DISCUSSION

De nombreux auteurs ont signalé la particularité du choix des miracidiums issus de l'œuf de Schistosomes envers certains Mollusques vecteurs. Ils ont noté les limites très étroites des possibilités de développement des embryons dans les tissus du Mollusque-hôte d'une part, et d'autre part, les pénétrations abortives de ces mêmes embryons dans des tissus de divers Mollusques souvent fort éloignés de leurs hôtes spécifiques. Ceci sans arriver à des conclusions formelles, quant au déterminisme du choix et de la résistance partielle ou complète de certains Mollusques.

Le premier, Lortet, en 1905, avant même que les modes d'évolution et de transmission des Schistosomes fussent connus, avait effectué des expériences d'infestations comparatives. de nombreuses espèces de Lymnées et de Planorbes, en versant des œufs et des embryons de Schistosomes dans un aquarium peuplé de Mollusques d'espèces variées. Cependant, étant donné l'époque des recherches, aucune explication n'était donnée par l'auteur sur ses résultats négatifs.

En ce qui concerne uniquement *S. mansoni*, nous relevons les travaux de Lutz en 1916-17 au Brésil, où il signale que les Physes et les Planorbes seuls sont susceptibles de s'infester par les Schistosomes avec cependant la possibilité d'une évolution complète chez une seule espèce de Planorbes : *P. olivaceus*. Chez les autres Planorbes, en particulier, *P. ferrugineus* et *P. terragophilus*, l'attraction miracidienne se produit bien, mais l'évolution ne se poursuit pas.

A la même époque, Iturbe et Gonzalès au Venezuela ont reconnu que la seule espèce chez laquelle l'évolution complète se produisait était : *P. guadalupensis*, tandis que chez *P. cultratus* on n'observait qu'une simple pénétration sans évolution ultérieure et que chez *Physa rivalis* l'attraction miracidienne ne se produisait même pas.

Plus tard, nous trouvons les travaux de Faust et Hoffmann en 1934, de E. Brumpt en 1936, puis en 1941 ceux de Vogel et la même année ceux de Cram et coll. (surtout Files qui le premier signale l'incomptabilité entre les souches du Brésil et de Porto-Rico), ainsi que ceux de Stunkard en 1946, de Cowper en 1947, de Lagrange et Scheecmans en 1950. Tous notent la résistance, partielle ou totale, de certaines espèces de Mollusques hôtes-vecteurs présomptifs, à l'infestation par des miracidiums de *S. mansoni*. A cette époque, l'opinion la plus répandue est que la sélection du Mollusque par le miracidium se fait grâce à un chimiotactisme spécifique dû à une substance libérée par le Mollusque.

Puis cette théorie est peu à peu abandonnée et le choix du Mollusque par l'embryon devient pour les auteurs purement occasionnel ; le déterminisme de la pénétration serait livré au hasard. C'est l'opinion d'Abdel-Malek en 1950 travaillant sur une souche de *Biomphalaria boissyi* très susceptible à l'infection par une souche de *S. mansoni* provenant d'Egypte, mais réfractaire à une souche de *S. mansoni* provenant de Porto-Rico.

Larue en 1951 croit cependant au stimulus chimique à courte distance, mais conclut que le choix est plus ou moins un phénomène de chance. Pour Stirewalt en 1951, tout est surtout question de hasard.

Enfin en 1952 Newton entreprend la première étude histologique comparative après infestation par la même souche de Schistosomes, des tissus de deux souches de Mollusques. L'une hautement réceptive provenant de Porto-Rico ; l'autre en provenance du Brésil ne permettant qu'une évolution abortive vis-à-vis de la souche de Schistosomes considérée. La souche de Porto-Rico s'accommode des parasites sans réaction apparente ; la souche du Brésil au contraire, présente dans ses tissus une infiltration cellulaire importante avec destruction des larves infestantes en moins de quarante heures.

Dans une seconde étude en 1953, cet auteur affirme que la susceptibilité d'*A. glabratus* à l'infection par *S. mansonii* est due à un caractère génétique héréditaire. Mais la même année Mac Quay infirme cette affirmation, car d'après ses expériences la susceptibilité ne se transmettrait pas selon les lois de Mendel ; la sensibilité augmentant dans les générations issues de croisement entre parents non susceptibles et susceptibles.

À la même époque Kuntz étudiant la sensibilité de Planorbes provenant de Porto-Rico, du Venezuela et d'Égypte, à une même souche de *S. mansonii*, confirme les travaux de Files et Newton quant à la résistance selon la provenance géographique.

En 1953 Brooks publie une étude comparative de l'évolution de *S. mansonii* dans *Tropicorbis havanensis* et *Australorbis glabratus*. Si le développement se poursuit sans réaction chez *A. glabratus*, chez un grand nombre de sujets de *Tropicorbis havanensis*, par contre, il note une réaction tissulaire importante et la résorption rapide de la larve après pénétration (trois heures à quinze jours). Il attribue le fait d'un « bon » développement à des caractères intrinsèques propres aux miracidiums.

En 1954 Barbosa et Coelho, puis en 1955 Schwetz, Baumann et Fort, rapportent encore des variations dans la susceptibilité de certains Mollusques aux miracidiums de *S. mansonii*.

Puis, en 1958, Kloetzel reprend la théorie de l'attraction miracidienne due à des émissions de substances chimiques déterminant le choix des miracidiums de *S. mansonii* pour *A. glabratus*.

Si bien qu'en 1959, Wright peut rapporter encore comme actuelle, la phrase écrite en 1934 par Wesenburg-Lund : « Si nous essayons d'avoir quelques connaissances à partir de la littérature, sur le devenir des miracidiums, dans leurs relations avec les différentes espèces de Mollusques, il est très difficile d'avoir une idée claire des faits réels. »

C'est alors que nous envisageons nos propres recherches, au moment même où paraît le travail de Sudds sur le devenir des miracidiums de certaines espèces de Bilharzies en présence d'hôtes normaux et anormaux. Ce travail concerne surtout deux Schistosomes d'oiseaux, mais une courte mention est faite de l'évolution abortive de *S. mansonii* chez des hôtes non spécifiques ; l'auteur penche pour une immunité secondaire basée sur des facteurs génétiques, avec, au préalable, un choix du Mollusque par les miracidiums dû au seul hasard.

En 1963, Paraense et Correa reprennent la thèse du rôle des facteurs génétiques dans la susceptibilité d'*A. glabratus* à *S. mansonii* en étudiant la susceptibilité d'hybrides de populations sensibles et réfractaires. Et en 1965, Kagan confirme expérimentalement la possibilité de transmission génétique de la sensibilité de certains Mollusques aux miracidiums de *S. mansonii*.

D'un autre côté, en 1963 et 1965, Mac Innis démontre le pouvoir d'attraction miracidienne de certaines substances chimiques, en particulier, celui des acides aromatiques à chaînes courtes.

Devant ces faits confirmés par les résultats de nos propres travaux, nous avons émis l'hypothèse de substances présentes dans les tissus du Mollusque et de l'explant, probablement dans l'épithélium, capables d'« attirer » et de permettre la pénétration du miracidium ou, au contraire, incompatibles avec les propres composants du miracidium.

C'est cette substance déposée par les Mollusques à la surface des graviers, ou encore contenue dans les coquilles de Planorbes vides qui serait responsable de l'attraction observée par Abdel-Malek et non le hasard seul qui guiderait les miracidiums, ainsi que le concluait l'auteur.

De même, c'est le dépôt par les Mollusques de cette substance sur les parois de verre de la boîte de Pétri et son imprégnation dans le papier filtre, qui attirerait les larves dans les expériences de Kloetzel. Dans le cadre d'hôtes non spécifiques, on peut penser qu'une certaine quantité de ces substances où des corps chimiquement voisins, seraient responsables des phénomènes d'attraction constatés. Le contenu des glandes céphaliques de pénétration suffirait pour permettre l'introduction des miracidiums dans les tissus de l'hôte. Puis, les phénomènes de refus proprement tissulaires entreraient alors en jeu. Le lavage du Planorbe, qui fait disparaître le pouvoir attractif, serait en faveur d'une substance présente à la surface du corps du Mollusque, substance qui pourrait faire partie intrinsèque des tissus, ou être sécrétée.

Dans nos propres expériences, la disparition progressive de ces substances des tissus de l'explant réceptif lui ferait perdre ses possibilités d'infestation : au contraire, chez un explant réfractaire, la diminution du taux de ces mêmes substances dans les premiers jours suivant la mise en survie permettrait les tentatives de pénétration, sans qu'aucun stimulus n'intervienne alors ; le seul hasard conditionnant la rencontre. Dans l'un et l'autre cas, la différenciation structurale interviendrait ensuite pour ôter toute possibilité de pénétration au miracidium.

Ainsi donc la pénétration des tissus d'un Mollusque par une larve de Schistosome paraît être un phénomène complexe lié à la présence d'une organisation tissulaire intacte, où la spécificité doit avoir des causes multiples.

Expérimentalement, dans un tentacule en survie, l'attraction persiste tant que la sécrétion de substances spécifiques par l'épithélium est en quantité suffisante. Ensuite, la pénétration et le développement ultérieur du parasite sont possibles dans des conditions analogues à celles observées dans la nature, tant que la dégénérescence des tissus n'est pas trop prononcée ; c'est-à-dire tant que des substances nutritives peuvent être fournies par l'organisme parasité. La diminution des substances de réserve dans les tissus de l'explant serait alors responsable, tout au moins partiellement, de l'arrêt de l'évolution du parasite au stade sporocyste III, ce dernier ne trouvant plus les matières utiles à son développement.

D'autre part, il faut remarquer que, normalement, pour poursuivre leur évolution, les sporocystes à ce stade migrent de leur lieu de pénétration vers l'hépatopancréas où ils se fixent définitivement pour atteindre le stade cercaire. On peut donc supposer que cette glande ou la glande hermaphrodite voisine apportent des substances nécessaires à

la transformation des derniers stades évolutifs du parasite. Cependant des essais d'adjonction de tels extraits glandulaires dans notre milieu de survie ont conduit à la mort quasi immédiate des explants.

Dans le cas de tentacules non réceptifs, l'évolution abortive est tout à fait comparable à ce que l'on observe dans les tissus des Mollusques vivants. Les figures obtenues dans l'explant sont en tout point superposables à celles publiées par les auteurs ayant étudié ce problème dans les Mollusques (Newton), (Files), ou par nous-mêmes, dans des témoins comparatifs.

D'après les résultats ainsi obtenus, on peut donc envisager un schéma général pour le choix du Mollusque par les miracidiums où la spécificité parasitaire interviendrait à différents niveaux.

Il est sans doute nécessaire de faire intervenir des phénomènes et des facteurs différents agissant successivement dans le temps.

En premier lieu, doivent jouer le phototropisme positif et le géotropisme négatif dont sont doués les miracidiums. Ces deux facteurs amenant les larves une fois écloses dans la zone de surface de l'eau où se rassemblent la plupart des Mollusques hôtes-vecteurs possibles.

Puis doit intervenir le mécanisme dont Neuhaus a fait l'hypothèse pour les miracidiums de *Fasciola hepatica*. Les larves seraient entraînées par les courants créés par les battements de cils de l'épithélium du Mollusque et lorsque celles-ci seraient à une distance suffisamment réduite, le mécanisme de l'attraction pourrait jouer.

Ce pouvoir attractif serait lié à une sécrétion de l'épithélium de revêtement et à la libération dans le milieu environnant de substances à caractères de mucopolysaccharides ou de glucoprotéines.

Ces substances seraient capables d'être décelées par le miracidium à une courte distance. La quantité de ces substances présentes dans l'environnement immédiat du Mollusque lors du contact miracidium-Planorbe pourrait expliquer les différents résultats observés par les auteurs en contradiction ; de faibles quantités pourraient même exister chez certaines espèces réfractaires à la pénétration ultérieure, entraînant une certaine attraction (résultats de Sudds en 1953 et Barbosa en 1965).

Toutefois, le rassemblement dans une enceinte réduite (boîte de Pétri), de nombreux Mollusques conduirait à l'accumulation de ces substances et ferait disparaître ce pouvoir attractif par épuisement du stimulus (Wright, 1959).

En outre la diffusion de ces substances dans le milieu liquide environnant doit se faire par gradients, ce qui est en rapport avec la direction des mouvements des miracidiums vers les Mollusques. Les larves n'atteignent jamais un Mollusque directement en ligne droite ; toute une série de mouvements ondulatoires avec approche, puis éloignement successifs, prélude au contact direct. Si l'on en croit les travaux de Laing effectués chez les Insectes en 1937, une approche directe en ligne droite par un animal d'un objet quelconque est le résultat d'un stimulus optique tandis que des mouvements ondulatoires et circulaires traduiraient un stimulus sensoriel.

Une fois les miracidiums arrivés au contact direct des tissus du Mollusque, le

phénomène de pénétration active débute. Outre l'action purement mécanique de l'effraction due aux contractions violentes de la larve, un deuxième système : compatibilité et incompatibilité doit entrer en jeu. Ce système doit être régi par des enzymes, ou substances voisines appartenant aussi bien à l'hôte qu'au parasite, avec complexe, enzyme-substrat. Ce sont ces possibilités qui pourraient être transmises génétiquement par le croisement d'une souche réceptive et d'une souche non réceptive de la même espèce (Kagan, 1965).

1° Dans le cas où la pénétration et l'évolution s'effectuent normalement, et sans réaction, on peut concevoir l'absence de toute substance antagoniste, seul alors suffit le contenu des glandes céphaliques de pénétration du miracidium pour la digestion de tissus de l'hôte, couplé aux mouvements musculaires actifs.

La poursuite du développement du parasite s'effectuerait grâce à ses propres substances de réserve et grâce aux substances nutritives présentes dans les tissus de l'hôte parfaitement assimilables par le parasite. Une preuve en est la diminution du taux des polysaccharides dans les tissus des Mollusques infectés.

Ainsi lorsqu'on détermine par la réaction colorée P.A.S. Schiff la teneur en polysaccharides des individus infectés par les Schistosomes, on peut noter que, dans les spécimens infestés, les conditions sont à peu près les mêmes que pour les individus sains, mais la quantité totale de polysaccharides est moindre ; la couleur générale des muscles est plus pâle, même sans action d'une diastase ; il y a donc diminution du glycogène. Les tubules de la glande digestive ont également perdu la majorité de leur glycogène, et il y a une grosse réduction de la quantité des polysaccharides contenus dans la glande hermaphrodite, par contre le galactogène de la glande de l'albumine ne semble pas touché (Von Brand et Files).

2° Lorsque la pénétration s'effectue, mais que l'évolution est stoppée, il semble qu'interviennent des réactions immunitaires de l'hôte pouvant se développer sur un double plan : refus tissulaire et formation d'anticorps. Des substances à caractère d'anticorps peut-être des anti-enzymes, entreraient alors en jeu bloquant le développement du parasite. Tous les stades du « refus » pourraient donc exister depuis l'impossibilité complète de pénétration jusqu'à la pénétration et le début du développement. Ce dernier peut être aussi stoppé à différents niveaux et dans les cas extrêmes le parasite est assimilé par les tissus de l'hôte à un corps étranger, digéré et détruit : ainsi que nous l'avons mis en évidence dans nos coupes de Planorbes entiers et d'explants.

Le fait que l'incompatibilité se manifeste parallèlement dans l'explant et dans l'individu entier met au premier plan des facteurs tissulaires responsables de l'incompatibilité entre le miracidium et son hôte et permet de les considérer comme les plus importants ; les défenses profondes de l'organisme par modification de la composition de l'hémolymphe (par ex.), étant secondaires et non essentielles.

Cette théorie s'appuie sur les résultats d'une série de recherches effectuées, tant par nous-mêmes que par divers auteurs, qui mettent en évidence la présence au sein des

Mollusques de facteurs pouvant être responsables de l'immunité tissulaire et hormonale des différentes espèces, ou tout au moins des différences biologiques pouvant expliquer les divers rapports miracidiums-hôtes.

Ces études peuvent être classées en quatre groupes :

- 1° Analyse chromatographique du milieu interne des différentes espèces de Mollusques.
- 2° Etudes électrophorétiques et immuno-électrophorétiques des constituants de l'hémolymphe et des tissus des Mollusques aux divers stades de leur développement.
- 3° Existence de facteurs immobilisant les miracidiums dans les tissus de certaines espèces de Mollusques.
- 4° Possibilité de la transmission génétique dans les générations successives de Mollusques, de la spécificité vis-à-vis des larves de Schistosomes.

1° *L'analyse chromatographique de l'hémolymphe de Planorbes.*

Les expérimentateurs ont recherché des différences dans la composition en acides aminés de l'hémolymphe et des tissus des diverses espèces de Mollusques dans le but de trouver, dans la répartition de ceux-ci, un support aux différences de susceptibilité envers les Schistosomes.

Des travaux originaux de Targett en 1962, il résulte que la composition en acides aminés des tissus des Mollusques est différente selon l'espèce considérée.

L'analyse chromatographique des hémoglobines a montré la présence de dix-sept acides aminés dans la plupart des espèces, mais avec des différences quantitatives. En ce qui concerne plus particulièrement *A. glabratus*, douze acides aminés libres ont été trouvés dans le sang en quantité variable, mais toujours faible.

La phénylalanine et la tyrosine sont très rarement trouvées chez *A. glabratus*, mais existent chez *P. corneus*. Par contre, *A. glabratus* est le seul chez lequel ait été détectée la présence de méthionine qui n'est pas retrouvée chez les autres Mollusques, *P. corneus* ou *Lymnaea stagnalis*. Chez des spécimens d'*A. glabratus*, infestés par *S. mansoni*, la concentration de tous les acides aminés se trouve réduite et la méthionine n'est plus détectée parmi les amino-acides libres.

Des analyses chromatographiques similaires exécutées sur des extraits de cercaires de *S. mansoni* montrent la présence dans les larves des dix-sept acides aminés y compris la méthionine. Ce qui pourrait laisser à penser que la méthionine est un élément indispensable au développement des derniers stades des sporocystes-filles.

Cependant le rôle de la méthionine ou de tout autre acide aminé ne semble pas essentiel dans l'attraction, la pénétration et le développement du parasite. En effet lors de nos propres expériences d'attraction par des substances chimiques, aucun acide aminé, et en particulier la méthionine, n'a jamais donné de résultats positifs.

D'autre part, l'adjonction dans notre milieu nutritif de survie d'extraits de levure et d'hydrolysats de caséine, riches en acides aminés (3 % de méthionine dans les deux substances), offre aux explants la possibilité de s'enrichir en méthionine (ou en tout autre acide aminé), par inhibition tissulaire et les tentacules ainsi traités n'ont jamais montré de dispositions plus favorables à la pénétration des miracidiums et au développement total des sporocystes.

Si maintenant nous reprenons les travaux de Donald Dusanic et Robert Lewert qui, en 1963, analysent les changements apportés dans la composition en protéines et en acides aminés libres de l'hémolymph de *A. glabratus* après exposition aux cercaires de *S. mansoni*, il en ressort que, quarante-cinq minutes après l'infestation, il y a augmentation du taux de lysine, proline et glycine, avec apparition pour une durée de vingt-quatre heures dans l'hémolymph de deux acides aminés présents chez le sujet sain uniquement dans les extraits de glandes digestives et d'ovotestis. Mais ces auteurs n'ont fait aucune constatation, quant à la présence ou l'absence de la méthionine.

Si de telles manifestations étaient seules en cause dans le développement spécifique du parasite, les résultats obtenus dans nos explants, qui, eux, ne participent pas à ces modifications d'ordre général de l'individu, devraient différer de ceux obtenus dans le Mollusque entier. Or, en ce qui concerne l'acceptation ou le refus pur et simple, nous n'avons pu observer aucune disparité, seules les réactions secondaires de défense tissulaire (formation de coque fibreuse) ne se produisent pas dans les explants.

2° *L'étude électrophorétique de l'hémoglobine de différentes espèces de Mollusques* a montré un schéma constant pour chaque espèce ; mais des différences selon l'âge des sujets ont été observées (Wright and Ross 1959, Targett 1961).

Etant donné qu'il est connu que les jeunes Mollusques sont plus sensibles à l'infestation par les Schistosomes que les adultes, on peut envisager que les différences apparaissant dans les tracés électrophorétiques traduisent ces degrés de susceptibilité. Ces faits sont en faveur de la formation de substances voisines des anticorps au cours de la vie des Mollusques et de leur action lors des tentatives d'infestation.

En 1962, Tran van Ky, Rosé et Laude réalisent l'analyse immuno-électrophorétique de la structure antigénique de quatre espèces de Mollusques. Pour ce faire, ils préparent des sérums de Lapins anti-Mollusques par immunisation des animaux à l'aide d'extraits totaux de Mollusques lyophilisés, et procèdent ensuite à l'analyse immuno-électrophorétique en plaque de gélose. Par cette méthode, ces auteurs révèlent la présence de neuf fractions communes entre *A. glabratus* vecteur de Schistosomes et *P. corneus* réfractaire, mais également l'existence de six fractions spécifiques.

Des résultats similaires sont obtenus avec les autres espèces étudiées (*Lymnea palustris*, *L. stagnalis* et *L. limosa*) ce qui leur permet de proposer l'analyse immuno-électrophorétique comme moyen d'analyse taxonomique des espèces voisines, cette méthode révélant des fractions qui constituent l'originalité de chaque espèce.

Leur expérimentation peut se résumer dans le tableau ci-après (p. 517).

Ce qui correspond à des différences réelles dans la structure des protéines antigéniques et explique l'impossibilité de développement des miracidium dans les explants provenant de Mollusques non susceptibles par incompatibilité tissulaire profonde. Nos explants qui ne peuvent participer qu'à cette sorte de défense corroborent ces résultats.

3° *La présence de substances immobilisantes des miracidium dans les extraits de Mollusques.*

Nous avons mis en évidence (1959) la présence de substances immobilisantes pour les miracidium de *S. mansoni* dans les tissus des Mollusques réfractaires à l'infestation.

ANTIGÈNES ANALYSÉS	NOMBRE DE FRACTIONS RELFVÉES	FRACTIONS COMMUNES AUX ANTIGÈNES				
		<i>A. glabratus</i>	<i>P. corneus</i>	<i>L. palustris</i>	<i>L. stagnalis</i>	<i>L. limosa</i>
<i>A. glabratus</i>	15	15	9	4	4	4
<i>P. corneus</i>	15	9	15	4	4	3
<i>L. palustris</i>	15	5	4	15	11	8
<i>L. stagnalis</i>	16	4	4	11	16	8

Les extraits de Planorbes au 1/10^e furent préparés à partir de deux espèces et de quatre souches.

Planorbis corneus provenant de la région parisienne,

Australorbis glabratus, souche de Pointe-à-Pitre, souche du Brésil, souche des Caraïbes (Porto-Rico).

Les miracidiums testés provenaient de l'éclosion des œufs issus du contenu intestinal ou des foies de Souris et de Hamster infestés expérimentalement avec des cercaires provenant d'une souche de *S. mansoni* des Caraïbes.

Les résultats obtenus peuvent être résumés ainsi :

P. corneus :

L'immobilisation de tous les individus est obtenue dans un laps de temps variant entre un quart d'heure et une demi-heure.

A. glabratus :

Souche Brésil : L'immobilisation des miracidiums est obtenue entre une demi-heure et trois quarts d'heure, un individu survit quelquefois, mais sa mobilité est très diminuée.

Souche Pointe-à-Pitre : Tous les miracidiums restent vivants après une heure ; la mobilité de quelques individus semble parfois légèrement atteinte.

Souches Caraïbes : Tous les miracidiums demeurent très mobiles et vivants durant plusieurs heures.

Il est à remarquer que la pénétration ne se réalise qu'avec des individus donnant peu ou pas du tout de réactions d'immobilisation. Dans les cas correspondant à une immobilisation forte (*P. corneus*), nous n'observons aucune pénétration.

Ces faits semblent favorables à l'hypothèse selon laquelle nous nous trouverions simplement en face d'une réaction d'incompatibilité dont l'immobilisation ne serait

que l'un des aspects. Selon les individus, on peut envisager que l'on est en présence soit d'une inhibition de la sécrétion des glandes céphaliques de pénétration ou d'une neutralisation de celle-ci, soit d'un véritable blocage des réactions vitales d'un miracidium conduisant celui-ci à l'immobilisation ou même des deux actions réunies. Il est, cependant, difficile d'imaginer que la mobilité soit seule en cause car même dans les cas où l'immobilisation se manifeste avec intensité, il faut un certain temps de latence avant que cette action puisse se manifester.

Les incompatibilités entre Planorbes et miracidiums semblent donc entrer dans le cadre des réactions immunitaires, ou enzyme-substrat.

Le fait que l'incompatibilité se manifeste parallèlement dans l'explant et dans l'individu entier met, en évidence, des facteurs tissulaires importants et permet de les considérer comme primordiaux.

Les réactions de défense interne de l'individu par remaniements profonds (composition de l'hémolymphe, ou réactions tissulaires secondaires par formation de coque fibreuse) inexistantes dans l'explant, nous ferons reporter ce facteur au deuxième plan.

4° La transmission génétique de potentialité de résistance ou de susceptibilité à l'infestation à l'intérieur d'une espèce de Mollusques.

C'est Walter L. Newton qui le premier s'est attaché à démontrer la transmission génétique des facteurs conditionnant la susceptibilité des Mollusques vis-à-vis des miracidiums de Schistosomes.

Il a effectué des croisements entre des individus de deux souches d'*Australorbis glabratus* susceptibles toutes deux à l'infestation par des miracidiums de *S. mansoni*, mais incompatibles entre elles (souches du Brésil et de Porto-Rico). Afin de s'assurer de l'effectivité des croisements, une variété de mutants à coloration rouge a été sélectionnée pour ces expériences.

Cet auteur arrive ainsi à démontrer que le caractère de susceptibilité aux miracidiums est un caractère héréditaire. Ainsi, dans une population F_3 issue de parents F_2 non susceptibles, on trouve des individus fortement susceptibles possédant les caractéristiques génétiques d'un grand-parent F_1 susceptible. Ces résultats ont été confirmés en 1965 par Kagan qui rapporte la possibilité de déceler une certaine aptitude à l'infestation chez de jeunes Mollusques issus de croisements entre parents susceptibles et non-susceptibles. Ce facteur génétique est tout à fait compatible avec les manifestations que nous avons observées à la fois chez l'individu entier et dans les explants et nous semble confirmer les affirmations de Mac Quay.

Ainsi, le schéma proposé rend compte des résultats expérimentaux des divers auteurs qui souvent s'opposaient quant à leur théorie respective sur les relations miracidium-Planorbe et pour lesquels la culture organotypique en milieu liquide peut amener quelques suggestions intéressantes.

Des facteurs mécaniques, physiologiques et immunologiques entrent en jeu, tour à tour, dans le développement de l'infestation des Mollusques par les miracidiums.

1° Facteurs mécaniques d'approche.

2° Facteurs physiologiques de la sécrétion de substances à caractères de mucopolysaccharides, spécifiques et attractives.

3° Facteurs à la fois mécaniques et physiologiques de la pénétration active de la larve : mouvements musculaires + sécrétion de la glande céphalique + comptabilité enzyme-substrat.

4° Facteurs physiologiques. Présence des substances nutritives nécessaires au bon développement du parasite dans un hôte : polysaccharides, acides aminés.

5° Facteurs immunologiques conditionnant l'acceptation ou le refus des sporocystes en formation, avec des degrés dans l'immunité suivant l'âge et l'espèce.

Avec, dans le cas de refus, l'intervention des deux phénomènes suivants :

1° Incompatibilité tissulaire ou génétique, primordial.

2° Défense de l'organisme, secondaire et non essentiel.

CONCLUSIONS

La culture organotypique en milieu liquide, décrite par J.-André Thomas en 1947 et proposée par cet auteur comme moyen d'analyse morphogénétique peut, après adaptation, permettre l'étude sous un angle nouveau de certains problèmes de biologie parasitaire.

Dans ce travail, après quelques modifications exigées par les besoins propres de l'expérimentation, elle a permis l'analyse d'un problème précis de parasitologie : L'étude des mécanismes qui président à l'infestation et à l'évolution réussie ou abortive de miracidiums de *Schistosoma mansoni* dans des Planorbes de diverses espèces ou de provenances géographiques différentes.

De tels explants en survie nous ont également permis de mettre en évidence, par des méthodes histo-chimiques, des substances à caractère de mucopolysaccharides sécrétées par l'épithélium de surface et responsables des phénomènes d'attraction miracidienne. La disparition de ces substances au cours de la survie, ou leur destruction par une mucopolysaccharidase est corrélative de la perte du pouvoir d'attraction miracidienne.

Un schéma général des phénomènes entrant en jeu dans le déroulement de l'infestation d'un Mollusque par un miracidium est proposé, tenant compte des résultats expérimentaux des partisans des différentes thèses sur ce sujet souvent controversé. Nous décelons ainsi quelques facteurs susceptibles d'influencer la spécificité parasitaire.

Cette méthode appliquée à d'autres organes appartenant soit à l'hôte définitif, soit à l'hôte intermédiaire doit pouvoir aider à la poursuite de l'analyse des différents aspects de la spécificité parasitaire, ou à l'étude de problème de biologie parasitaire difficilement abordable par l'expérimentation *in vivo*.

De tels travaux sont actuellement en cours et permettent d'espérer une utilisation féconde de cette technique de culture organotypique.

Bibliographie

1. ABDEL-MALEX (E. T.), 1950. — Susceptibility of the snail *Biomphalaria boissyi* to infection with certain strains of *Schistosoma mansoni*. *Amer. J. Trop. Méd.* 30, 887.
2. — et TUDROS (E.). — *Morphology. Bionomics and host parasite relation of Planorbidae*. Dissertation, 259 p. Université de Michigan.
3. BARBOSA (F. S.), 1960. — Alguns aspectos das relações hospedeiro-parasito entre as fases larvárias do trematodeo *Schistosoma mansoni* e o molusco *Australorbis glabratus*. *Bol. Fund. Gonçalo. Moniz*, 15, 1-14.
4. — et COELHO (M. V.), 1954. — Qualidades de vetor dos hospedeiros de *S. mansoni* no nordeste do Brasil. 1) Suceptibilidade de *A. glabratus* e *Tropicorbis centimetralis* a infestação por *S. mansoni*. *Publicações Avulsas*. Inst. Aggeu. Magalhães, 3, 5.
5. —, —, 1955. — Comportamento das formas larvárias de *S. mansoni* em *A. glabratus* sujeitos a estivação. *Publicações. Avulsas*. Inst. Aggeu. Magalhães, 3, 51.
6. — et CARNEIRO (E.), 1965. — Penetration of *Schistosoma mansoni* miracidia in abnormal hosts. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao-Paulo*, 7, 99-102.
7. BÉNEX (J.), 1961. — La survie d'explants de Planorbes *Australorbis glabratus* en milieu synthétique, antiseptique et nutritif. *C.R. Acad. Sci.*, 253, 734-36.
8. —, 1964. — Sur la différenciation des tentacules de Planorbes en survie: rôle de la présence d'éléments nerveux sur le retard de cette différenciation. *C.R. Acad. Sci.*, 258, 2193-96.
9. —, 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.
10. — et LAMY (L.), 1959. — Immobilisation des miracidiums de *Schistosoma mansoni* par des extraits de Planorbes. *Bull. Soc. Path. exot.*, 52, 188.
11. BROOKS (C. P.), 1953. — A comparative study of *Schistosoma mansoni* in *Tropicorbis havanensis* and *Australorbis glabratus*. *J. Parasit.*, 39, 159.
12. VON BRAND (T.) et FILES (V. S.), 1947. — Chemical and histological observations on the influence of *Schistosoma mansoni*, infection on *A. glabratus*. *J. Parasit.*, 33, 476.
13. BRUMPT (E.), 1936. — *Schistosoma bovis* et *Schistosoma mansoni*, ne sont pas transmis par *Planorbis (Indoplanorbis) exustus*. Observations biologiques concernant ce Planorbe (autofécondation, érosion de la coquille, élevage, etc...). *Ann. Parasit.*, 5, 464.
14. —, 1941. — Observations biologiques diverses concernant *Planorbis (Australorbis) glabratus* hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. *Ann. Parasit.*, 18, 9.
15. CASTAIGNE (A.), 1959. — Un facteur de diffusion différent des Hyaluronidases. Etude pharmacologique. *Anesth. et Analg.*, 16, 567.
16. CHERNIN (E.), 1957. — A method of securing bacteriologically sterile snails *Australorbis glabratus*. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 96, 204.

17. CHERNIN (E.), 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.
18. —, 1959. — Notes of the effects of various antibiotics on *Australorbis glabratus*. J. Parasit., 45, 268.
19. —, 1963. — Observations on hearts explanted *in vitro* from the snail *Australorbis glabratus*. J. Parasit., 49, 353.
20. —, 1964. — Maintenance *in vitro* of larval *S. mansoni* in tissues from the snail *A. glabratus*. J. Parasit., 50, 531-45.
21. — et DUNAVAN (C. A.), 1962. — The influence of host-parasite dispersion upon the capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia to infect *Australorbis glabratus*. Am. J. Trop. Méd., 11, 455-71.
22. — et SCHORK (A. R.), 1959. — Growth in axenic culture of the snail *Australorbis glabratus*. Amer. J. Hyg., 69, 146.
23. — et —, 1960. — Effects of Streptomycin on the hatching of *Australorbis glabratus* eggs. Exp. Parasit., 9, 9.
24. CORT (W. W.), 1918. — Adaptability of Schistosome larvae to new hosts. J. Parasit., 4, 171.
25. —, AMEEL (V. I.) et VON DER WOUDE (A.), 1951. — Early developmental stages of Strigeid mother-sporocysts. Proc. Helminth. Soc. Wash., 18, 5.
26. — et OLIVIER (L.), 1941. — Early developmental stages of strigéid Trematodes in the first intermediate host. J. Parasit., 27, 493.
27. COWPER (S. G.), 1947. — Observations on the life cycle of *S. mansoni* in the laboratory with a discussion on the snail vectors of *S. mansoni* and *S. haematobium*. Ann. Trop. Med. Parasit., 41, 173.
28. CRAM (E. B.) et FILES (V. S.), 1946. — Laboratory studies on the snail host of *S. mansoni*. Amer. J. Trop. Med., 26, 715.
29. —, — et JONES (M. F.), 1947. — Experimental Molluscan infections with *S. mansoni* and *S. haematobium*. Nat. Inst. Hlth. Bull., 189, 81.
30. —, JONES (M. F.) et WRIGHT (W. H.), 1944. — Unsuccessful attempts to infect eleven species and subspecies of domestic Planorbidae with *S. mansoni*. Proc. Helminth. Soc. Wash., 11, 6466.
31. —, — et —, 1945. — A potential intermediate host of *S. mansoni*. Science, 101, 302.
32. DUSANIC (D. D.) et LEWERT (R. M.), 1963. — Alteration of proteins and free amino acids of *A. glabratus*, hemolymph after exposure to *S. mansoni* miracidia. J. inf. Dis., 112, 243.
33. FAUST (E. C.), 1924. — The reactions of the miracidia of *Schistosoma japonicum* and *S. haematobium* in the presence of their intermediate hosts. J. Parasit., 10, 199.
34. — et HOFFMAN (W. A.), 1934. — Life history of Manson's blood Fluke (*S. mansoni*). I. Extramammalian phase of the cycle. Proc. Soc. exp. Biol., 31, 474.
35. — et HOFFMAN (W. A.), 1935. — Studies on *Schistosomiasis mansoni* in Porto Rico III. Biological studies. I. The extramammalian phases of the life cycle. Porto Rico. J. Pub. Health. and Trop. med., 10, 1,

36. FILES (V. S.), 1951. — A study of the vector parasite relationship in *S. mansoni*. *Parasitology*, 41, 264.
37. — et CRAM (E. R.), 1949. — A study of the comparative susceptibility of snails vectors to strain of *S. mansoni*. *J. Parasit.*, 35, 555.
38. GORDON (B. M.), DAVEY (T. H.) et PEASTON (H.), 1934. — The transmission of human bilharziosis in Sierra-Leone, with on account of the life cycle of the Schistosomes concerned *S. mansoni* and *S. haematobium*. *Ann. Trop. Med. and Parasit.*, 28, 323.
39. HAMMARSTEN (O.), 1885. — Studien über Mucin und mucinähnliche substanzen. *Arch. ges. Physiol.*, 36, 373.
40. ITURBE (J.), 1917. — El huesped intermediario del *S. mansoni* in Venezuela. *Gaceta. Med. de Caracas*, 24, 515.
41. — et GONZALES (E.), 1917. — The intermediate host of *Schistosoma mansoni* in Venezuela. Laboratory of D^r J. Iturbe. Special édit. *Nat. Ac. of Med.*
42. 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.
43. KLOETZEL (K.), 1958. — Observações sobre o tropismo do miracídio de *Schistosoma mansoni* pelo molusco *Australorbis glabratus*. *Rev. bras. Biol.*, 18, 223.
44. KUNTZ (R. E.), 1952. — Exposure of Planorbis snail from the Western hemisphere to miracidia of the Egyptian strain of *S. mansoni*. *Proc. Helminth. Soc. Wash.*, 19, 9.
45. —, 1955. — Biology of the Schistosomes complexes. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 4, 383.
46. LAGRANGE (E.) et SCHEECQMANS (G.), 1950. — Sur l'épidémiologie de la Bilharziose expérimentale à *S. mansoni*. *C.R. Soc. Biol.*, 144, 1703.
47. LAING (J.), 1937. — Host finding by insect parasites. I. Observations on the finding of hosts by *Alysia manducator*, *Mormoniella vitripennis* and *Trichogramma evanescens*. *J. Anim. Ecol.*, 6, 298.
48. LARUE (G. R.), 1951. — Host-parasite relations among the digenetic Trematode. *J. Parasit.*, 37, 333.
49. LEIPER (R. T.), 1915. — Rept. Bilharzia Miss in Egypt. *J.R. Army Med. corps.*
50. — and ATKINSON (E. L.), 1915. — Observations on the spread of Asiatic Schistosomiasis. *Brit. M.J.*, 1, 201-3.
51. LELAND (S. E. Jr.), 1961. — The *in vitro* cultivation of the parasitic stages of *Cooperia punctata*, *Cooperia onchophora*; *Ostertagia ostertagi* and *Ostertagia circumcincta*. A preliminary report. *J. Parasit.*, 47, 21.
52. LEVÈNE (P. A.), 1925. — The mucoproteins of the snails *Helix aspersa* and *Helix pomatia*. *J. Biol. Chem.*, 65, 683.
53. LORTET, 1915. — 1^o Congrès égyptien de Médecine C.R.I. Chirurgie 1905 in Leiper Rept. Bilharzia Miss. in Egypt. *J.R. Army Med. corps.*, juillet.
54. LUTZ (A.), 1917. — Observações sobre a evolução do *S. mansoni*. *Brasil Medico* (1916), 30, 31.
55. —, 1919. — O *Schistosoma mansoni* a e Schistosome segundo observações feitas no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 11, 121-55.

56. MAC INNIS (A. J.), 1963. — I. Response of *S. mansoni* miracidia to chemical attractants. II. Evidence for chemical attraction of *S. mansoni* miracidia. *J. Parasit.*, 49, 38th annual meeting of the Am. Soc. of Parasit. Chicago, 1963, 14, 15.
57. —, 1965. — Responses of *S. mansoni* miracidia to chemical attractants. *J. Parasit.*, 51, 731-46.
58. MAC QUAY (R. M.), 1953. — Studies on variability in the susceptibility of a North American snail *Tropicorbis havanensis* to infection with the Puerto Rican strain of *S. mansoni*. *Trans. roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 47, 56.
59. MALDONADO (J. F.) et ACOSTAMATIENZO (J.), 1947. — The development of *S. mansoni* in the snail intermediate host *Australorbis glabratus* Puerto Rico. *J. Public Health Trop. Med.*, 22, 331.
60. MASAMUNE (H.), YASUOKA (T.), TAKAHASI (M.) et ASAGI (Y.), 1947. — Biochemical studies on carbohydrates. Does Mucoitin exist in the animal body as combined with sulfuric acid. Tohoku. *J. exp. Med.*, 49, 177.
61. — et YOSIZAWA (Z.), 1950. — Biochemical studies on carbohydrates C XXX. III. Paper partition chromatograms of sugar components in glycidamine and glycoproteins. Tohoku *J. exp. Med.*, 53, 155.
62. NEUHAUS (W.), 1941. — Beitrage zur Frage der Wirtsfindung des Miracidiums von *Fasciola hepatica*. *Z. Vergl. physiol.*, 28, 563.
63. —, 1953. — Uber den chemischen Sinn der Miracidium von *Fasciola hepatica*. *Z. Parasitenk.*, 15, 476.
64. NEWTON (W. L.), 1952. — The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *S. mansoni*. *J. Parasit.*, 38, 362.
65. —, 1953. — The inheritance of susceptibility infection with *S. mansoni* in *Australorbis glabratus*. *Exp. Parasit.*, 2, 242.
66. OLIVIER (L.) et MAO (C. P.), 1949. — The early larval stages of *S. mansoni* in the snail host *Australorbis glabratus*. *J. Parasit.*, 35, 267.
67. STIREWALT (M. A.), 1951. — The frequency of bisexual infection of *Schistosoma mansoni* in snails of the species *Australorbis glabratus*. *J. Parasit.*, 37, 42.
68. STUNKARD (H. W.), 1946. — Possible snails hosts of human schistosomes in the United States. *J. Parasit.*, 32, 539.
69. SUDDS (R. H. Jr.), 1960. — Observations of Sh. miracidial behaviour in the presence of normal and abnormal hosts and subsequent tissue studies of the hosts. *J. Elisa. Mitchell. Soc.*, 76, 121.
70. TARGETT (G. A. T.), 1962. — The amino-acid composition of blood from snail hosts of schistosomiasis. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 56, 61.
71. —, 1962. — A study of the amino-acids present in *Lymnea stagnalis*, *Planorbarius corneus* and *Australorbis glabratus* before et after infection with *Schistosoma mansoni*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 56, 210.
72. —, 1962. — Absorption spectra of blood proteins from intermediate and non intermediate hosts of Schistosomes. *J. Helminth.*, 36, 201.
73. THOMAS (J. A.), 1947. — La survie d'organites non stériles en milieu antiseptique et nutritif comme procédé d'analyse morphogénétique. *C.R. Acad. Sci.*, 225, 148.

74. TRAN VAN KY (P.), ROSE (F.) et LAUDE (F.), 1962. — L'étude immunoélectrophorétique de la structure antigénique des Mollusques, est-elle susceptible de résoudre certaines difficultés de leur taxonomie ? *C.R. Acad. Sci.*, 255, 366.
75. VOGEL (H.), 1941. — Infektions versuche an verschiedenen Bilharzia. Zwischenwitten mit einem einzelnen Mirazidium von *Bilharzia mansoni* und *B. japonica*. *Zentr. Bakt. Abt.*, 148, 29.
76. WRIGHT (C. A.), 1956. — Some factors affecting the susceptibility of snails to infection with miracidia of *Schistosoma*. *Bull. Soc. Path. exot.*, 49, 1211.
77. —, 1959. — The application of paper chromatography to a taxonomic study in the molluscan genus *Lymnea*. *J. Linn. Soc.*, 44, 222.
78. —, 1959. — Host location by Trematode miracidia. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 53, 288.
79. — et ROSS (G. C.), 1959 et 1963. — Electrophoresis of snail blood. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 53, 308 et *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 57, 47.

(Laboratoire de Parasitologie de l'Institut Pasteur de Paris

28, rue du D^r-Roux, Paris-15^e

et laboratoire de Biologie cellulaire de la Faculté des Sciences de Paris

9, quai Saint-Bernard, Paris-5^e)