**DONNEES HISTOLOGIQUES ET HISTOCHIMIQUES
SUR LE TRANSFERT DE DEUX METAUX (Fe⁺⁺⁺, Cu⁺⁺)
CHEZ LYMNAEA (GALBA) TRUNCATULA MULLER
[Mollusques Gastéropodes Pulmonés]**

par D. RONDELAUD¹, C. CHAISEMARTIN² et D. BARTHE¹

Les voies de transfert du fer et du cuivre sont étudiées chez *Lymnaea truncatula* par histochimie, histopathologie et dosages quantitatifs sur les masses molles globales de ces animaux. Le fer pénètre par les régions péritentaculaires et le tube digestif ; il est excrété par les « cellules à cytoplasme dense » des acini de la glande digestive et par les ovocytes de la glande génitale. Les régions péritentaculaires sont seules responsables de la pénétration du cuivre ; ce dernier est véhiculé par les amibocytes et excrété au niveau des granules formés par les « cellules digestives » de la glande digestive.

**Some histological and histochemical observations
on the transfer of two metals (Fe⁺⁺⁺, Cu⁺⁺)
in *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller.**

The transfer processes of iron and copper in *Lymnaea truncatula* by histochemical tests, histopathology and quantitative proportions of these metals in the total soft tissues of these molluscs. Iron penetrates into peritentacular areas and the alimentary canal ; this metal is excreted by « dense cytoplasm cells » of the digestive gland and by ovules of the genital gland. Peritentacular areas are solely responsible for copper penetration ; this metal is carried by « amibocytes » and excreted in granules elaborated by « digestive cells » of the digestive gland.

INTRODUCTION

La destruction des Mollusques vecteurs de la fasciolose est encore réalisées, à l'heure actuelle, en majeure partie par voie chimique. Parmi les molluscicides préconisés, le cuivre — proposé par CHANDLER en 1920 — est largement employé. Les seuils de toxicité de ce métal sont bien définis pour de nombreuses espèces alors qu'il se révèle indispensable au développement normal de ces mêmes organismes.

1. Laboratoire d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique, Faculté de Médecine, 87032 Limoges Cedex.

2. Laboratoire de Biologie Animale, Faculté des Sciences, 123, rue Albert-Thomas, 87060 Limoges Cedex.

Ses mécanismes d'action sont encore mal connus chez les Mollusques en milieu aquatique. D'après SPRONK et coll. (1973), les régions pédieuses de l'animal interviendraient dans la fixation du métal.

En Limousin, le fer entre en proportion importante dans la teneur minérale de l'eau de certaines rigoles. Ce métal a surtout été utilisé comme anti-carenciel mais HENEINE et coll. (1969) le considèrent comme pouvant agir, à la limite, en tant que molluscicide. Son action métabolique dans la Limnée reste peu précisée.

Le présent travail répond donc à un double but :

- déterminer les voies de transfert de ces deux métaux (sous forme de chlorures) du milieu de vie à la Limnée,
- localiser ces éléments dans l'organisme et établir leur cinétique.

Les essais ont porté sur des Limnées tronquées infestées ou non par *Fasciola hepatica*. Cette étude est réalisée à l'aide de tests histochimiques, de données fournies par l'histopathologie et de la détermination par dosages de la teneur en métal des masses molles globales des Mollusques expérimentés.

MATERIEL ET METHODES

a) MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.

Deux populations de Limnées tronquées ont été retenues :

- la première vit dans une eau oligoferrique (Feytiat, Haute-Vienne : 0,12 mg/l de fer total).
- l'habitat de la 2ème population est assez riche en fer (St-Yrieix-la-Perche, Haute-Vienne : 0,27 mg/l de fer total).

Nous n'avons pas pu trouver de population vivant naturellement dans une eau contenant du cuivre.

Les Mollusques de taille comprise entre 4 et 4,5 mm sont soumis à des concentrations en ions atteignant un niveau de toxicité qui permette la détermination de la concentration léthale (C.L. 50) en 48 ou 96 heures selon l'origine de la population. Les concentrations testées sont de 10 ppm (10 mg/l) pour le fer (FeCl_3) et de 1 ppm (1 mg/l) pour le cuivre (CuCl_2).

Les expériences ont lieu dans des cristallisoirs en verre contenant 500 ml de solution et 20 à 25 Mollusques en circuit semi-ouvert avec renouvellement tous les 2 jours. La température d'expérience est de 16°C et les essais ont lieu en salle semi-éclairée naturellement. Des lots témoins ont été constitués.

Les effets des toxiques sont étudiés :

— sur des Mollusques sains ou infestés soumis à l'action d'un toxique pendant un temps maximum de 48 heures (période de charge) avec prélèvement des animaux expérimentés et témoins toutes les 6 heures pour étude histologique ou dosages.

— sur des Mollusques en charge remis en eau normale, ce qui permet une étude de la décharge (ou désorption) du toxique. Les animaux non-infestés ont été mis en désorption au bout de 18 et 48 heures de charge pour le fer, de 12 heures pour le cuivre. Les prélèvements ont alors lieu au bout de 6, 12 et 24 heures après la mise des Limnées en décharge.

— sur quelques animaux soumis à l'action du toxique pendant de plus longues périodes (4, 7 et 14 jours).

b) TECHNIQUES HISTOLOGIQUES.

Les individus sont fixés au Bouin aqueux ou au Baker. La coloration histologique générale est l'hématoxyline de Harris — mélange de Halmi. Les tests histochimiques utilisés sont :

— pour le fer : méthode de Perls et méthode de Gabe (Martoja et Martoja 1967).

— pour le cuivre : méthode de l'acide rubéanhydrique et technique à la p-diméthylaminobenzylidène-rhodanine (GABE 1968).

c) TECHNIQUE DE DOSAGE.

Les animaux prélevés sont congelés. Après déshydratation (105° C pendant 96 heures), les masses molles sont broyées et calcinées 520° C pendant 24 heures). Les cendres sont reprises par HCl N et diluées jusqu'à l'obtention de solutions à 0,5 HCl N. La détermination des teneurs en cuivre ou en fer est réalisée par spectrophotométrie (PERKIN-ELMER 303). Les résultats sont exprimés en nanogrammes (ppb) par milligramme de masses molles globales (poids humide).

d) REMARQUE.

Des lots d'individus parasités sont obtenus par infestation expérimentale et élevés selon les conditions standard du laboratoire à 16° C. (RONDELAUD 1974 b et c). Les Mollusques sont utilisés :

— en phase C : présence de nombreuses rédies à « gastrulas » à l'intérieur du Mollusque,

— en phase E : présence de cercaires libres dans le Mollusque (RONDELAUD 1974 a).

PHOTO I. — 1 : Granules de stockage (fer) dans les « cellules à cytoplasme dense » de la glande digestive : Limnée témoin mésoferrique (Perls $\times$ 195).
 2 : Le réceptacle séminal : Limnée témoin mésoferrique (Perls $\times$ 48).
 3 : Granules ferriques dans le cytoplasme des cellules bordantes des sinus d'un tentacule oculaire : Limnée témoin mésoferrique (Perls $\times$ 48).
 4 : Un diverticule d'acinus de la glande digestive : Limnée témoin mésoferrique (hématoxyline de Harris - Halmi $\times$ 195).
 5 : Granules ferriques dans le pharynx d'une rédie de *Fasciola hepatica* (Perls $\times$ 72).
 6 : Lacunes de dégénérescence au niveau de la sole pédieuse : Limnée exposée à 10 ppm de fer pendant 48 heures (hématoxyline de Harris - Halmi $\times$ 195).

- PHOTO II. — 7 : Hyperplasie au niveau de la sole pédieuse : Limnée exposée à 10 ppm de fer pendant 48 heures (hématoxyline de Harris - Halmi $\times$ 195).
- 8 : Hyperplasie au niveau de la glande digestive : Limnée exposée 10 ppm de fer pendant 48 heures (hématoxyline de Harris - Halmi $\times$ 150).
- 9 : Hyperplasie au niveau de la sole pédieuse : Limnée exposée à 1 ppm de cuivre pendant 7 jours (hématoxyline de Harris - Halmi $\times$ 195).
- 10 : Granules de cuivre dans les amibocytes au niveau de la glande digestive : Limnée exposée à 1 ppm de cuivre pendant 24 heures (Acide rubéanhydrique - Halmi $\times$ 487).
- 11 : Hyperplasie au niveau de la glande digestive : Limnée exposée à 1 ppm de cuivre pendant 14 jours (hématoxyline de Harris - Halmi $\times$ 195).
- 12 : Le passage du cuivre dans les granules orangeophiles formés par les cellules digestives : Limnée exposée à 1 ppm de cuivre pendant 48 heures (Acide rubéanhydrique - Halmi $\times$ 195).

RESULTATS

1. — Les Limnées soumises au fer.

1.1. ETUDE HISTOCHIMIQUE DES TÉMOINS.

— *Non infestés.*

En milieu oligoferrique, l'accumulation de fer dans les tissus apparaît sous forme de granules de stockage de 3 microns de diamètre au niveau de certaines cellules des acini de la glande digestive que nous nommons en raison de leur aspect : « cellules à cytoplasme dense » (« calcium cells » de SOUTHGATE 1969 ou « basiphil cells » de MOORE et HALTON 1973) ; la plupart de ces granules se retrouve dans la partie basale de ces cellules (photo 1). Le fer fait partie de la trame cytoplasmique intra-ovocytaire au niveau de la glande génitale : les ovogonies montrent une réaction plus intense (à la coloration de PERLS) que les ovocytes. Il se rencontre aussi sous forme de grains intra-cellulaires de taille variable au niveau des cellules épithéliales de l'intestin lorsque ce dernier contient des débris végétaux.

Chez les Mollusques provenant de l'habitat mésoferrique, nous avons retrouvé les caractéristiques précédemment citées. De plus le métal se retrouve sous forme de granulations de 0,50 micron de diamètre dans les tissus ou organes suivants : cellules épidermiques des régions périventriculaires et cellules bordantes des sinus de ces régions, parois du myocarde, plus rarement dans les vaisseaux autour des organes viscéraux, cellules du canal hermaphrodite et entre les spermatozoïdes, réceptacle séminal (photographies 2 et 3). Il faut noter que ces animaux présentent une augmentation nette du nombre de « cellules à cytoplasme dense » qui forment des diverticules appendus aux acini de la glande digestive (photo 4).

— *Infestés.*

Les modifications de structure de la glande digestive sous l'effet du parasitisme ont déjà été signalés (SOUTHGATE 1969, MOORE et HALTON 1973). Nous avons retrouvé la même distribution du fer que chez les témoins non-infestés. La taille des granules de stockage dans les « cellules à cytoplasme dense » est plus faible (1 à 1,5 micron de diamètre). Le pharynx des rédies contient de petits granules ferriques, mais le reste des tissus de la rédie et les cercaires en sont totalement dépourvus (photo 5).

1.2. — HISTOCHIMIE ET HISTOPATHOLOGIE DES MOLLUSQUES EXPÉRIMENTÉS.

a) *Animaux non-infestés.*

— Chez les individus en charge.

L'épithélium des régions péritentaculaires est touché dès que les Mollusques sont exposés au toxique : on constate de la pycnose et des lacunes de dégénérescence intercellulaire. Au bout de 48 heures d'exposition, l'épithélium montre des zones de dégénérescence : il disparaît par endroits, laissant à nu le chorion sous-jacent. Le tégument de la sole pédieuse ne montre que plus tardivement de la pycnose et des phénomènes de remaniement (pseudo-stratification épithéliale, multiplication des noyaux du chorion sous-jacent); ce remaniement touche aussi les régions péritentaculaires mais de façon plus discrète (photos 6 et 7).

FIG. 1. — L'évolution des nombres N de granules (fer et cuivre) au niveau de la glande digestive des Limnées expérimentées.

A : Les nombres de granules de stockage (fer) observés dans 200 « cellules à cytoplasme dense » (en moyenne). NI : non-infestées; I : infestées au stade C.

B : Les nombres d'amibocytes AM présentant des granules noirâtres et des granules orangéophiles GO (cuivre) observés pour une valeur moyenne de 200 « cellules à cytoplasme dense » (Limnées oligoferriques non-infestées).

La figure 1 A montre la diminution progressive et la disparition, à partir de 18 heures de charge, des granules de stockage dans les « cellules à cytoplasme dense ». Tous les types cellulaires des acini de la glande digestive présentent de façon hétérogène des zones de nécrose cellulaire. L'hyperplasie y apparaît dès 24 heures d'exposition au toxique (photo 8) ; elle s'installe après la nécrose et touche tous les types cellulaires des acini digestifs et de la paroi de l'intestin.

A partir de 48 heures, nous notons (*fig. 1 A*) la réapparition des granules de stockage dans les « cellules à cytoplasme dense », signe indiquant une reprise d'activité de ces cellules. Ces données indiquent donc que les « cellules à cytoplasme dense » interviennent dans l'excrétion du fer au niveau de la glande digestive. Ces cellules forment des diverticules appendus à la paroi des acini de cette glande.

Les autres organes montrent quelquefois des granules ferriques (rein), souvent des pycnoses (poumon).

— Chez les animaux en désorption.

Les granules de stockage persistent en nombre réduit dans les « cellules à cytoplasme dense ». 56 heures après le début de l'exposition au fer, le Mollusque montre une vacuolisation cellulaire au niveau des cellules des acini digestifs, du rein, du poumon et de la paroi digestive.

Quelques Limnées montrent la présence d'aliments dans leur tube digestif ce qui indique que ces Mollusques ont pu se réalimenter (animaux placés en désorption au bout de 18 heures d'expérience).

b) *Animaux infestés.*

Les résultats obtenus sont voisins de ceux obtenus avec les Limnées non-infestées. Nous avons remarqué que les granules de stockage disparaissent au bout de 12 heures d'expérience (*fig. 1 A*). L'hyperplasie des « cellules à cytoplasme dense » n'est pas nette à l'inverse de celle des autres types cellulaires. La vacuolisation cellulaire observée au niveau des acini digestifs apparaît dès 36 heures d'exposition.

A partir de 24 heures d'exposition, gastrulas et cercaires présentent des signes de pycnose.

1.3. ANALYSE QUANTITATIVE.

La figure 2 regroupe les données fournies par l'analyse spectrophotométrique.

Les Mollusques non-infestés accumulent progressivement le fer, ceci jusqu'à la valeur maximale de charge (à partir de 24 heures d'exposition). Nous ne constatons pas de différence de plateau entre individus parasités ou non. Ces données suggèrent que l'absorption du fer répondrait essentiellement à un mécanisme physique.

Pour les 2 groupes d'animaux mis en décharge, la chute du taux ferrique est identique.

FIG. 2. — L'accumulation des deux métaux à l'intérieur des Limnées expérimentées (A : fer ; B : cuivre).

Traits continus : Limnées en charge (● : non-infestées ; ■ : infestées au stade C) ;

Traits pointillés : Limnées non infestées (●) mises en décharge à partir de x heures de charge (D x).

1.4. — DONNÉES ÉTHOLOGIQUES COMPLÉMENTAIRES.

Durant l'hiver, les Limnées vivent en milieu immergé. Les Mollusques non-infestés ont été récoltés dans la nature durant cette saison et l'exposition à des conditions constantes a pour conséquence l'émersion progressive de ces animaux, en général à partir du 7ème jour.

Les Limnées témoins ou soumises à de faibles concentrations (0,1 ppm) ont un comportement identique à celui décrit précédemment. Pour des concentrations de 1 ppm, les animaux présentent une réaction de fuite avec émersion dans les 4 à 8 heures qui suivent le début de l'expérience. Pour des concentrations de 10 ppm, les déplacements sont limités (5 à 10 minutes), puis il se produit une rétraction du pied avec sécrétion du mucus et rejet d'une partie des fèces (généralement depuis l'estomac).

La mort de l'animal est signée par le relâchement du pied et l'immobilité du Mollusque lors d'une stimulation (piqûre, etc.).

2. — Les Limnées soumises au cuivre.

2.1. — ETUDE HISTOCHIMIQUE DES TÉMOINS.

— *Non-infestés.*

Le pigment hémocyannique est une cuproprotéine et les tests histochimiques révèlent la présence de granulations noirâtres de 0,25 micron de diamètre dans tous les sinus et vaisseaux.

L'examen des sujets n'a pas montré la présence de granules dans la glande digestive ou dans les cellules de l'intestin même lorsque ce dernier contient des végétaux.

— *Infestés.*

En plus des caractéristiques précédentes, seuls les pharynx des rédies contiennent des granules.

2.2. — HISTOCHIMIE ET HISTOPATHOLOGIE DES MOLLUSQUES EXPÉRIMENTÉS.

— *Non-infestés.*

Chez les animaux soumis au toxique, les régions péritentaculaires sont aussi touchées en premier et présentent une évolution identique à celle décrite pour le fer. Notons de plus la dilatation des vaisseaux de ces régions avec destruction des cellules bordantes ; ces données confirment celles citées chez *Busycon canaliculatum* par BETZER et YEVICH (1975). L'hyperplasie secondaire frappe l'épithélium pédieux de même que celui de ses glandes (photo 9).

Le cuivre s'accumule autour des acini de la glande digestive sous forme de granules dans le cytoplasme des amibocytes ; certains granules atteignent 3 microns de diamètre (photo 10). L'épithélium des acini présente aussi une nécrose de ses divers éléments cellulaires, accompagnée d'une hyperplasie réactionnelle reconnaissable à l'aspect ovoïde et régulier des noyaux des cellules digestives (photo 11). A partir de la 18ème heure, nous retrouvons le passage des granules orangeophiles formés par les cellules digestives et leur élimination dans la lumière des acini (photo 12 et fig. 1 B).

Les phénomènes cités précédemment frappent aussi les cellules intestinales, les parties les plus distales des conduits génitaux.

Chez les Mollusques mis en décharge à partir de 12 heures d'expérience, on observe des pycnoses frappant de façon irrégulière les cellules de la glande digestive mais il n'existe pas d'hyperplasie parallèle. La vacuolisation cellulaire apparaît à partir de 54 heures d'expérience.

— *Animaux infestés.*

Ces Mollusques soumis au toxique présentent les mêmes caractéristiques que précédemment. La vacuolisation cellulaire apparaît

dès 24 heures d'expérience (au lieu de 48 heures chez les animaux non-infestés).

2.3. — DOSAGES QUANTITATIFS.

Les données provenant de l'analyse spectrophotométrique sont rassemblées dans la figure II B.

Chez les Mollusques non-infestés en charge, les concentrations de cuivre intra-organique s'élèvent brusquement entre 18 et 24 heures de séjour dans le bain. Les animaux infestés présentent une charge nettement plus rapide en cuivre.

2.4. — DONNÉES ÉTHOLOGIQUES COMPLÉMENTAIRES.

Les réactions des animaux en présence de cuivre rappellent celles décrites précédemment. Avec 0,1 ppm de cuivre, 50 % des Mollusques se rencontrent en zone émergée au bout de 12 heures d'expérience et la totalité au bout de 24 heures.

Les Limnées, en présence de 1 ppm de cuivre, présentent une rétraction immédiate du pied avec sécrétion abondante de mucus et rejet de fèces.

INTERPRETATION ET DISCUSSION

Les toxiques ont des voies de pénétration différentes selon leurs caractéristiques physico-chimiques. L'utilisation de tests histochimiques, d'après HENEINE et coll. (1969), est insuffisante pour permettre une étude de la cinétique d'un métal. Nos résultats permettent cependant de préciser certains points :

— Pour le fer.

● Chez la Limnée placée dans son habitat naturel, il existe 2 voies de pénétration du fer à l'intérieur de l'organisme. La 1ère voie utilise les régions péritentaculaires ; l'existence de cette voie est justifiée par la présence de granulations ferriques dans ces régions chez les témoins mésoferriques. La 2ème voie concerne un passage à travers les cellules intestinales lorsque l'animal se nourrit.

● Chez la Limnée soumise au toxique, seule intervient la 1ère voie, puisque les animaux rejettent leurs fèces et ne se nourrissent plus. De plus les régions péritentaculaires sont les premières touchées lors de l'exposition de l'animal au toxique.

— Pour le cuivre, la seule voie de transfert du milieu à la Limnée est représentée par les régions péritentaculaires. Nous n'avons pas retrouvé de granulations dans les cellules digestives de tous les témoins contenant pourtant des végétaux dans l'intestin.

Les données recueillies à l'aide des tests histochimiques et de l'histopathologie permettent de déduire que chez la Limnée témoin ou expérimentée :

— Pour le fer, ce métal provenant de l'une ou l'autre voie de passage est véhiculé dans les vaisseaux : ceci s'appuie sur l'existence de granulations ferriques dans l'hémolymph chez les témoins mésoferriques et les Mollusques expérimentés. Ces granulations ferriques — indépendantes des amibocytes — sont concentrées dans le cytoplasme des « cellules à cytoplasme dense » sous forme de granules de stockage, puis excrétées vers l'extérieur. Une partie de ce fer est aussi excrétée par les œufs de l'animal, ce qui confirme les données de JOHNSON et coll. (1962) et de HENEINE et coll. (1969).

— Pour le cuivre, cet élément est pris en charge par les amibocytes et éliminé dans les granules formés par les cellules digestives : ceci s'appuie sur les résultats regroupés dans la figure I B. Nous n'avons pas noté la présence de ce métal au niveau des ovocytes du Mollusque.

Les données quantitatives recueillies par l'analyse chimique montrent que le fer pénétrerait dans l'organisme par un mécanisme physique d'absorption. Les résultats recueillis avec les Mollusques non-infestés soumis au cuivre permettent d'émettre l'hypothèse que les individus présenteraient une résistance au toxique durant 18 heures, puis l'animal se chargerait dès la fin de cette période ; les perturbations provoquées par le parasitisme chez les Mollusques entraîneraient une perte de cette résistance, d'où une charge nettement plus rapide.

Les effets pathologiques de ces 2 ions varient selon les auteurs. Mais dans les 2 cas, l'organisme du Mollusque réagit :

— Pour une nécrose cellulaire frappant de façon hétérogène les régions péritentaculaires, la sole pédieuse, la glande digestive.

— Par une hyperplasie parallèle à cette nécrose : elle est nette chez les sujets soumis au toxique pendant 4 à 14 jours et touche aussi bien le pied que la glande digestive.

Ces résultats indiquent que l'hyperplasie est un phénomène réactionnel normal et suggèrent que la Limnée soumise ainsi à une légère augmentation de la concentration d'un élément peut s'adapter.

La vacuolisation cellulaire observée dans certains tissus est à mettre en relation avec la mort de l'animal. Les résultats montrent que dans le cas des 2 métaux, les Limnées infestées présentent une sensibilité plus grande au toxique que les non-infestées, ce qui confirme les données de PAULINI et PELLEGRINO (1957) chez *Australorbis glabratus*.

TRAVAUX CITÉS

- BETZER (S. B.) et YEVICH (P. P.). 1975. — Copper toxicity in *Busycon canaliculatum*. *Biol. Bull.*, 148 : 16-25.
- GABE (M.). 1968. — *Techniques histologiques*. Masson et Cie éd., Paris, 113 p.
- HENEINE (I. F.), GAZZINELLI (G.) et TAFURI (W. L.). 1969. — Iron metabolism in the snail *Biomphalaria glabrata*: uptake, storage and transfer. *Comp. Biochem. Physiol.*, 28 : 391-399.
- JOHNSON (C. R.), ANGEL (C. R.) et ERICKSON (D. G.). 1962. — The uptake, distribution and excretion of four radionuclides in *Australorbis glabratus* (Planorbidae). *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 11 : 855-860.
- MARTOJA (R.) et MARTOJA (M.). 1967. — *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Masson et Cie éd., Paris, 345 p.
- MOORE (M. N.) et HALTON (D. W.). 1973. — Histochemical changes in the digestive gland of *Lymnaea truncatula* infected with *Fasciola hepatica*. *Z. Parasitenk.*, 43 : 1-16.
- PAULINI (E.) et PELLEGRINO (J.). 1957. — Influence of infection with *Schistosoma mansoni* on the susceptibility of *Australorbis glabratus* to copper sulphate. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 51 : 283-284.
- RONDELAUD (D.). 1974 a. — L'évolution des rédies de *Fasciola hepatica* L. chez *Galba truncatula* Müller en Limousin. *Revue Méd. vét.*, 125 : 237-250.
- RONDELAUD (D.). 1974 b. — Recherches sur l'influence de quelques facteurs physiques sur les migrations quotidiennes de *Galba truncatula* Müller. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, 49 : 417-425.
- RONDELAUD (D.). 1974 c. — Le cycle journalier d'activité de *Galba truncatula* Müller et sa relation avec le parasitisme. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, 49 : 427-434.
- SOUTHGATE (V. R.). 1969. — Studies on the biology and host-parasite relationships of some larval Digenea. Thèse Doctorat, Cambridge, 231 p.
- SPRONK (N.), TILDERS (F.) et VAN HOEK (R. J.). 1973. — Copper in *Lymnaea stagnalis* III Uptake from fresh water and the role of the shell. *Comp. Biochem. Physiol.*, 45 A : 257-272.