

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE FRANCAISE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

## THESE de DOCTORAT en COTUTELLE

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE  
AGRONOMIQUE (El-Harrach, Alger)

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES  
ETUDES (Paris, France)



En vue de l'obtention du



### **Diplôme de Docteur de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (Algérie)** Spécialité : Sciences Agronomiques

**et du**

**Doctorat de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes**  
Mention Systèmes intégrés, environnement et biodiversité

**Thème**

**Reproduction et dynamique du crapaud de Maurétanie, *Bufo mauritanicus*  
(Schlegel, 1841) dans la zone humide de Beni-Bélaïd (Jijel, Algérie).**

**Soutenue publiquement le**

**par Mr Omar Kisserli**

**Devant le jury :**

Président :	Mme Doumandji-Mitiche B.	Professeur
Directeurs de thèse :	Mr Doumandji S.E. Mr Exbrayat J.M.	Professeur Professeur
Rapporteurs :	Mr Djirar N. Mr Morel G.	Maître de Conférences Directeur de Recherches
Examineur :	Mme Prolonge-Chevalier C.	Maître de Conférences

**Année universitaire 2009 / 2010**

## **Remerciements**

*Je tiens à exprimer tout d'abord ma profonde gratitude à Monsieur le professeur Salaheddine Doumandji qui est à l'origine de ma vocation et qui, après m'avoir initié à la recherche a bien voulu diriger et encourager les recherches qui font l'objet de cette thèse. Pour l'intérêt, les éclaircissements apportés et les encouragements qu'il m'a accordé durant ces années de thèse.*

*Je voudrais exprimer toute ma respectueuse reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean-Marie Exbrayat de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de biologie générale de l'Université Catholique de Lyon, laboratoire EPHÉ de Reproduction et Développement Comparés qu'il dirige. Il a accepté non seulement d'assumer avec beaucoup de responsabilité la charge d'encadrer cette thèse mais aussi de suivre tous les stades de sa réalisation avec attention. Pour ses conseils scientifiques, ses compétences en biologie de la reproduction et surtout pour son soutien et sa confiance, je lui suis redevable de tout ce qu'il m'a appris pendant ces années de thèse.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Madame Doumandji-Mitiche Bahia de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*Je remercie très vivement Messieurs Djirar Nacer maître de conférence à l'université de Sétif et Morel Gérard directeur de recherches au CNRS qui me font l'honneur de juger la qualité de ce travail, en acceptant d'être rapporteurs et de faire partie du jury.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Madame Prolonge-Chevalier C, de l'intérêt qu'elle a porté à mon travail en acceptant de faire partie du jury.*

*Un grand merci à l'ensemble des membres du laboratoire de biologie générale, permanents et thésards, pour la bonne ambiance qui fait de ce laboratoire un lieu où l'on travaille avec plaisir.*

*Je souhaite remercier en particulier Madame Marie-Thérèse Laurent qui m'a aidé avec gentillesse et humour pour tout ce qui concerne l'élaboration de ce travail, et qui a tout fait pour que je puisse bénéficier des meilleures conditions. Je lui exprime toute ma reconnaissance.*

*J'adresse mes vifs remerciements à Hammouche Sadjia maître de conférence à l'USTHB qui a pris le temps et la peine de m'aider à extraire les hypophyses du crapaud de Maurétanie.*

*Egalement, je ne saurai oublier Monsieur Roger Prodon Directeur des Etudes à l'EPHE de Montpellier pour ses conseils et son orientation. Qu'il trouve ici tout mon profond respect.*

*La Famille Bouhila de Beni-Belaïd que je remercie très chaleureusement pour leur accompagnement et leur aide dans le prélevement de l'espèce durant toutes les années de terrains. Je leur exprime toute ma reconnaissance.*

*Merci enfin, à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à mener à bien ce travail.*

*À la mémoire de mes parents,*

*À ma femme,  
mes frères et sœurs,  
et tous ceux que j'aime*

## *Sommaire*

# *Sommaire*

<b>Liste des figures</b>	08
<b>Liste des tableaux</b>	11
<b>Abréviations</b>	12
<b>Introduction</b>	13
<b>Chapitre I : présentation de la région d'étude</b>	18
<b>I.1. Aperçu sur les zones humides</b>	19
<b>I.2. Coordonnées géographiques et localisation générale du site</b>	19
<b>I.3. Etude du milieu</b>	20
I.3.1. Caractéristiques physiques du milieu	20
I.3.1.1. Relief et géologie	20
I.3.1.2. Pédologie	21
I.3.1.3. Hydrologie	21
I.3.2. Caractéristiques climatiques	21
I.3.2.1. Données climatiques de la région d'étude	22
I.3.2.1.1. Température	22
I.3.2.1.2. Pluviométrie	23
I.3.3. Synthèse des données climatiques	23
I.3.3.1. Diagramme ombrothermique de Gaussen	23
I.3.3.2. Climagramme d'Emberger	25
<b>I.4. Caractéristiques écologiques</b>	27

I.4.1. Données bibliographiques sur la flore	27
I.4.2. Données bibliographiques sur la faune	28
<b>I.5. Originalité du site</b>	28
<b>Chapitre II : Biologie de la reproduction des Amphibiens Anoures</b>	30
<b>II.1. Quelques généralités sur les Amphibiens</b>	31
<b>II.2. Appareil génital mâle des Anoures</b>	32
<b>II.3. Cycle de reproduction des mâles</b>	33
II.3.1. Cinétique de la spermatogenèse et cycles spermatogénétiques	34
II.3.2. Cycles à spermatogenèse discontinue	37
II.3.3. Cycles à spermatogenèse continue	38
II.3.4. Cycles à spermatogenèse potentiellement continue	38
<b>II.4. Cycle de reproduction des femelles</b>	39
II.4.1. Appareil génital femelle	39
II.4.2. Cycle ovarien	40
II.4.3. Développement et maturation des gonades femelles	44
II.4.4. Atrésie folliculaire	47
<b>II.5. Régulation hormonale de la reproduction chez les Amphibiens</b>	48
<b>II.6. Les organes de reproduction des Amphibiens</b>	54
<b>Chapitre III : Matériel et méthodes</b>	56
<b>III.1. Matériel biologique</b>	57
<b>III.2. Méthodes utilisées</b>	57
III.2.1. Caractéristiques biométriques liées au sexe	57

III.2.1.1. Données biométriques concernant les mâles	57
III.2.1.2. Données biométriques concernant les femelles	58
III.2.1.3. Dimorphisme sexuel	58
III.2.2. Méthodes histologiques	58
III.2.2.1. Microscopie photonique	58
III.2.2.1.1. Fixation, inclusion et coupes	58
III.2.2.1.2. Colorations classiques	59
III.2.2.1.3. Colorations histochimiques	61
III.2.2.2. Techniques morphométriques	64
III.2.2.2.1. Techniques propres aux femelles	64
III.2.2.2.2. Techniques propres aux mâles	65
III.2.2.2.3. Etude quantitative par numération ponctuelle	66
III.2.3. Méthodes immunohistochimiques	68
III.2.4. Méthodes statistiques	70
III.2.4.1. Analyse de la variance appliquée aux différents paramètres propres aux gonades mâles	70
<b>Chapitre IV : Résultats et Discussions</b>	<b>71</b>
<b>IV.1. Etude Biométrique des paramètres sexuels</b>	<b>72</b>
IV.1.1. Données biométriques chez les mâles	72
IV.1.1.1. Structure histologique des testicules	74
IV.1.1.2. Etude quantitative des coupes de testicules mâles	75
IV.1.2. Données biométriques chez les femelles	78
IV.1.3. Caractéristiques biométriques liées au sexe au cours du cycle de reproduction	79

IV.1.4. Dimorphisme sexuel	82
<b>IV.2. Etude et variations saisonnières des organes sexuels de <i>Bufo mauritanicus</i> au cours du cycle annuel de reproduction</b>	83
<b>IV.3. Dynamique du cycle ovogénétique</b>	87
IV.3.1. Définition des stades folliculaires et ovocytaires	89
IV.3.1.1. Stades prévitellogéniques	89
IV.3.1.2. Stades vitellogéniques	90
IV.3.1.3. Variations biométriques de la taille des ovocytes et des noyaux au cours de l'évolution des follicules ovariens	93
IV.3.1.4. Les follicules atrétiques	94
IV.3.2. Variations du nombre de stades folliculaires au cours du cycle annuel de reproduction	95
<b>IV.4. Organes et aspects endocriniens du cycle sexuel</b>	95
<b>IV.5. Etude histochimique et immunohistochimique des fonctions hormonales des gonades</b>	97
IV.5.1 Caractéristiques histochimiques des gonades mâles et femelles	97
IV.5.2. Mise en évidence par immunohistochimie de la présence d'hormones	98
IV.5.2.1. Au niveau des gonades	98
IV.5.2.2. Au niveau de l'hypophyse	99
<b>IV.6. Comparaison du développement sexuel de <i>Bufo mauritanicus</i> avec d'autres Amphibiens</b>	101
IV.6.1. Structure testiculaire	101
IV.6.2. Données sur le cycle de reproduction des mâles	102
IV.6.3. Données sur le cycle de reproduction des femelles et étude quantitative des ovaires	104
<b>IV.7. Etude préliminaire de l'hypophyse</b>	107
<b>Conclusion générale</b>	109
<b>Références bibliographiques</b>	114
<b>Annexes</b>	134



Figure 1 : Situation géographique de la zone humide de Beni-Belaïd.	20
Figure 2 : Diagramme ombrothermique de la région d'étude sur une période de 10 ans (1995 –2004).	25
Figure 3 : Position de la zone humide de Béni-Bélaïd dans le climagramme d'Emberger.	26
Figure 4 : Représentation schématique de l'appareil uro-génital des mâles Anoures.	33
Figure 5 : Schéma général de la spermatogenèse.	34
Figure 6 : Coupe histologique du testicule de Crapaud adulte. Organisation en cystes des cellules germinales.	35
Figure 7 : Représentation schématique de l'arrangement des spermatocystes à la base du tube séminifère de <i>Bufo arenarum</i> . Les cellules folliculaires représentent les cellules de Sertoli de la terminologie actuelle.	36
Figure 8 : Représentation schématique de la structure générale du système reproducteur d'une femelle Anoure.	40
Figure 9 : Les différents stades prévitellogéniques au cours du cycle ovogénétique de <i>Xenopus laevis</i> .	41
Figure 10 : Représentation structurale de la région périphérique animale d'un ovocyte vitellogénique d'Amphibien.	43
Figure 11 : Différenciation des stades ovogénétiques et induction de la maturation de l'ovocyte chez le Xénope.	45
Figure 12 : Croissance de l'ovocyte, maturation ovocytaire et méiose.	46
Figure 13 : Représentation schématique de la régulation hormonale de la vitellogenèse et de la maturation de l'ovocyte.	50
Figure 14 : Section sagittale de la région hypophysaire de la grenouille, <i>Rana temporaria</i> .	52
Figure 15 : Dissection de <i>Bufo mauritanicus</i> femelle (face ventrale).	59
Figure 16 : Représentation après dissection de l'ovaire de <i>Bufo mauritanicus</i> .	65
Figure 17 : Représentation après dissection des gonades mâles de <i>Bufo mauritanicus</i> .	65
Figure 18 : Principe de la technique d'immunohistochimie par amplification.	69
Figure 19 : Variations moyennes du poids et de la longueur du corps en fonction des classes de longueurs répertoriées chez le mâle de <i>Bufo mauritanicus</i> Schlegel, 1841.	73
Figure 20 : Variations du poids et de la longueur du corps en fonction des classes de longueur répertoriées chez les individus mâles de <i>Bufo mauritanicus</i> Schlegel, 1841.	73
Figure 21 : Vue d'ensemble d'une coupe histologique du testicule gauche de <i>Bufo</i>	74

*mauritanicus*.

- Figure 22 : Coupe histologique du testicule de *Bufo mauritanicus*, Schlegel, 1841. 75
- Figure 23 : Variation de la surface moyenne testiculaire en fonction du cycle annuel. 75
- Figure 24 : Evolution du nombre moyen de spermatozoïdes en faisceaux en fonction des mois de l'année 2003-2004. 76
- Figure 25 : Evolution du nombre moyen des tubes séminifères en fonction des mois de l'année 2003-2004. 77
- Figure 26 : Variations moyennes du poids et de la longueur du corps en fonction des classes de longueur répertoriées chez la femelle de *Bufo mauritanicus* Schlegel, 1841. 78
- Figure 27 : Variations du poids et de la longueur du corps en fonction des classes de longueur répertoriées chez les individus femelles de *Bufo mauritanicus* Schlegel, 1841. 79
- Figure 28 : Variations mensuelles du poids du corps et du testicule de *Bufo mauritanicus* au cours du cycle annuel 2003-2004. 81
- Figure 29 : Variations mensuelles du poids du corps et de l'ovaire de *Bufo mauritanicus* au cours du cycle annuel 2003-2004. 82
- Figure 30 : Variations saisonnières du poids des testicules gauches de *Bufo mauritanicus* prélevés de la zone Beni-Belaïd (Jijel-Algérie) au cours du cycle annuel 2003-2004. 84
- Figure 31 : Variations saisonnières des ovaires gauches de *Bufo mauritanicus* prélevés de la zone Beni-Belaïd (Jijel-Algérie) au cours du cycle annuel 2003-2004. 84
- Figure 32 : Variations du poids moyen des gonades mâles et femelles de *Bufo mauritanicus* en fonction des périodes enregistrées dans le diagramme ombrothermique au cours du cycle annuel de reproduction 2003-2004. 86
- Figure 33 : Variations pondérales des caractères liés au sexe en fonction des périodes de l'année. 87
- Figure 34 : Dynamique de la folliculogénèse chez *Bufo mauritanicus*. 88
- Figure 35 : Vue d'ensemble de l'évolution ovogénétique et dynamique de la folliculogénèse chez *Bufo mauritanicus* au cours du développement sexuel. 92
- Figure 36 : Mise en évidence des mucopolysaccharides dans les ovaires de *Bufo mauritanicus*. 93
- Figure 37 : Evolution de la taille des différents stades ovogénétiques au cours du cycle annuel de reproduction de *Bufo mauritanicus*. 93
- Figure 38 : Vue d'ensemble des différents follicules atrétiques au cours du développement sexuel de *Bufo mauritanicus*. 94

Figure 39 : Evolution moyenne des différents stades ovogénétiques de <i>Bufo mauritanicus</i> au cours du cycle annuel de reproduction.	95
Figure 40 : Histologie de l'hypophyse de <i>Bufo mauritanicus</i> .	96
Figure 41 : Mise en évidence des lipides. Testicule de <i>Bufo mauritanicus</i> .	97
Figure 42 : Mise en évidence des lipides. Ovaire de <i>Bufo mauritanicus</i> .	97
Figure 43 : Localisation de l'hormone $17\beta$ -oestradiol au cours de la folliculogénèse chez <i>Bufo mauritanicus</i> .	98
Figure 44 : coloration immunohistochimique des gonades femelles de <i>Bufo mauritanicus</i> par omission d'Anticorps.	99
Figure 45 : Recherche de la FSH au niveau des parties médianes et latérales de l'adénohypophyse de <i>Bufo mauritanicus</i> (individu a).	100
Figure 46 : Recherche de la FSH au niveau des parties médianes et latérales de l'adénohypophyse de <i>Bufo mauritanicus</i> (individu b).	100
Figure 47 : Topographie et vue d'ensemble des différentes coupes histologiques de testicules de <i>Bufo mauritanicus</i> au cours du cycle annuel de reproduction 2003-2004.	103
Figure 48 : La folliculogénèse chez le crapaud <i>Bufo regularis</i> Reuss, 1834.	105

Tableau 1 : Les températures mensuelles moyennes enregistrées au niveau du port de Djendjen durant la période 2003-2004.	22
Tableau 2 : Répartition mensuelle et annuelle des pluies au niveau du port de Djendjen.	23
Tableau 3 : Moyenne des précipitations sur une période de dix ans (1995-2004).	24
Tableau 4 : Moyenne mensuelle des températures enregistrées sur une période de dix ans (1995-2004).	24
Tableau 5 : Les glandes endocrines, leurs organes cibles et leurs actions.	55
Tableau 6 : Variation moyenne du poids et de la longueur en fonction des classes de longueurs chez les individus mâles de <i>Bufo mauritanicus</i> .	72
Tableau 7 : Résultats de l'analyse de la variance (surface moyenne testiculaire en fonction du cycle annuel).	76
Tableau 8 : Résultats de l'analyse de la variance du facteur étudié en fonction du cycle annuel.	77
Tableau 9 : Résultats de l'analyse de la variance (nombre moyen des tubes séminifères en fonction des mois de l'année 2003-2004).	77
Tableau 10 : Variation du poids corporel moyen en fonction des différentes classes de longueurs.	78
Tableau 11 : Variations mensuelles des caractéristiques liées au sexe de <i>Bufo mauritanicus</i> mâle au cours du cycle annuel 2003-2004.	80
Tableau 12 : Variations mensuelles moyennes des caractéristiques liées au sexe de <i>Bufo mauritanicus</i> femelle au cours du cycle annuel 2003-2004.	81
Tableau 13 : Paramètres moyens utilisés pour les deux sexes de l'espèce <i>Bufo mauritanicus</i>	83
Tableau 14 : Variations saisonnières du poids des testicules et des ovaires gauches de <i>Bufo mauritanicus</i> .	84
Tableau 15 : Variations pondérales du poids moyen du corps et des gonades mâles et femelles gauches de <i>Bufo mauritanicus</i> en fonction des périodes de l'année 2003-2004.	85

## **Abréviations**

- ACE: Angiotensine- Converting Enzyme  
ACTH: Adrénocorticotropine  
ADN: Acide désoxyribonucléique  
ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire  
AEC: Amino - Ethyl – Carbazole  
Ag-Ac1: Antigène - Anticorps 1  
AMPC: Adénosine monophosphate cyclique  
ANG II: Angiotensin II  
ARN: Acide ribonucléique  
APS: Acide Périodique – Schiff  
bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor  
Da: Dalton  
EGF: Epidermal Growth Factor  
FSH: Follicule stimulating hormone  
GH: Hormone de croissance  
GnRH: Gonadotropin -releasing hormone  
GTH: Gonadotropin Hormone  
GVBD: Germinal Vesicle breakdown  
LH: Hormone lutéinisante  
MIH: Maturation-inducing Hormone  
MPF: Maturation- Promoting Factor  
PBS: Phosphate Buffer Salt  
PGE2: Prostaglandin E2  
PGF2 $\alpha$ : Prostaglandine F 2 alpha  
TGF $\alpha$ : Transforming Growth Factor Alpha  
TSH: Thyrotropine  
[Val5] ANG II: Val5 Angiotensin II

# *Introduction*

La biologie de la reproduction concerne la formation des gamètes, la fécondation et le développement. Elle comprend également le mode de formation et la structure des glandes sexuelles, les aspects physiologiques et notamment le rôle des hormones sexuelles.

L'étude de la biologie de la reproduction des vertébrés inférieurs a porté sur la mise en évidence des modalités du développement sexuel en relation avec les facteurs du milieu auquel ils sont inféodés, en tenant compte du rôle joué par les centres supérieurs de régulation et par les facteurs hormonaux.

De nos jours, il existe encore de nombreuses espèces dont la biologie est connue de manière imparfaite. Leur étude mérite d'être entreprise et approfondie, notamment à une époque où la diminution de la biodiversité impose des mesures de protection adaptées. Parmi ces espèces, *Bufo mauritanicus* fait l'objet de ce travail. Prélevé dans la zone humide de Beni-Belaïd (Jijel, Algérie), son étude permettra d'apporter quelques éléments complémentaires à la connaissance de la biologie de la reproduction des amphibiens et de comprendre l'importance du milieu environnant sur cette dernière.

Les Amphibiens sont des vertébrés inférieurs intermédiaires évolutifs entre les poissons et les reptiles. Outre leur connaissance pour comprendre leur biologie et participer à leur protection, les amphibiens sont considérés depuis longtemps comme un matériel privilégié pour les études physiologiques ou encore pour comprendre les modalités du développement embryonnaire, les lois de l'embryologie causale et les aspects moléculaires du développement (Exbrayat, 2003). Les cellules des Amphibiens étant de grande taille, un grand nombre de recherches en microscopie photonique ont utilisé ces animaux comme modèles (Grassé, 1986).

Ils représentent le passage de la vie aquatique à la vie terrestre et sont parmi les premiers vertébrés à avoir colonisés le milieu terrestre. Leurs stratégies de reproduction sont très diversifiées (Duellman and Trueb, 1986), tout spécialement au regard de l'affranchissement progressif du milieu aquatique. Certaines espèces présentent des adaptations tout à fait particulières pour s'affranchir de ce milieu aquatique (Lamotte et Lescure, 1977). Par leur mode de vie comportant deux phases, les Amphibiens sont également considérés comme d'excellents indicateurs de l'état de santé du biotope.

Chez presque toutes les espèces du monde vivant, la reproduction n'a lieu qu'à certaines périodes cycliques. Chez certains mammifères, elle peut avoir lieu au cours de périodes assez

longues et même toute l'année chez quelques formes supérieures. Il est bien connu qu'il n'en est pas de même des autres vertébrés (Pujol, 1985).

La classe des Amphibiens comprend trois sous-classes, ce sont les Labyrinthodontes, les Lépospondyles et les Lissamphibiens. Les deux premières sous-classes sont des groupes fossiles alors que les Lissamphibiens correspondent aux formes vivantes actuelles. Ces dernières sont divisées en trois ordres : *Salientia* ou Anoures, *Caudata* ou Urodèles et *Gymnophiona* ou Gymnophiones connus également sous le nom de Cécilies (Delsol, 1995). Les Anoures regroupent les Amphibiens sans queue tels que les grenouilles, les rainettes et les crapauds ; les Urodèles sont beaucoup plus discrets que les Anoures et comportent les tritons et les salamandres alors que les Gymnophiones sont des animaux allongés et fouisseurs vivant exclusivement dans les zones intertropicales.

Chez tous les Amphibiens des différences morphologiques entre les mâles et les femelles peuvent être observées. Le dimorphisme sexuel peut être très poussé chez certaines d'entre elles, se traduisant alors par des caractères sexuels secondaires permanents ou temporaires dont le développement atteint son amplitude maximale pendant la période de reproduction (Grassé, 1986).

Les Amphibiens Anoures des pays tempérés (Europe, Amérique du Nord) se reproduisent une seule fois par an et leur spermatogenèse est discontinue. Un certain nombre d'Anoures de régions chaudes, notamment d'Afrique, semblent avoir un cycle sexuel plus ou moins continu leur permettant de se reproduire en toute saison.

Depuis déjà bien des années, des études faites sur les Anoures mâles ont permis de mettre en évidence trois types de cycle d'activité sexuelle en fonction de la présence simultanée ou non des différents stades de la spermatogenèse dans les tubes séminifères (Cei, 1942, 1944 ; Galgano, 1952 ; Delso et *al.*, 1981, 1995). On notera alors des cycles à spermatogenèse discontinue, à spermatogenèse potentiellement continue et des cycles à spermatogenèse continue. Ces trois types de cycles pourraient représenter trois états progressifs de spécialisation du cycle sexuel (Cei, 1965) : un état représenté par des formes d'activité gonadique continue avec des poussées successives arythmiques dans les pays à faibles variations annuelles de température, un état représenté par une spermatogenèse potentiellement continue dans les pays tempérés avec de sensibles variations saisonnières de



température et pour terminer, un état adapté à des climats froids et représenté par une spermatogenèse discontinue se régularisant suivant un rythme interne propre.

Les cycles à spermatogenèse continue sont caractérisés par des poussées spermatiques successives plus ou moins rapprochées, de telle sorte que des cystes à des stades très différents coexistent dans un même tube séminifère. La formation de spermatozoïdes se fait toute l'année, avec toutefois une période plus active en vue de la reproduction. Ce cycle est celui des espèces de pays chauds présentant de faibles écarts de température annuelle (Ceï, 1949 ; Mondal et Basu, 1960 ; Basu, 1962). Ce type de cycle a été décrit chez des Anoures tropicaux ou sub-tropicaux d'origine africaine comme *Phrynobatrachus calcaratus* (Gueydan-Baconnier, 1980), ou indienne comme *Rana erythrea*, *Rana grahami* (Champy et Coujard, 1939), *Rana hexadactyla* (Basu, 1968) et sud-américaine comme *Bufo paronemis*, *Bufo granulatus* (Ceï, 1949), *Bufo arenarum* (Houssay, 1954).

Les cycles de reproduction des mâles des espèces africaines sont assez peu connus. Plusieurs travaux ont cependant permis de mettre en évidence des cycles annuels continus chez plusieurs espèces (*Bufo regularis*, *Ptychadena macCarthyensis*, *Ptychadena oxyrhynchus*, *Phrynobatrachus calcaratus*, *Xenopus laevis* ; Delsol *et al.*, 1980, 1981, 1995 ; Exbrayat *et al.*, 1998 ; Gueydan-Baconnier, 1980 ; Gueydan-Baconnier *et al.*, 1984a, b ; Pujol, 1985 ; Pujol et Exbrayat, 1996, 2000, 2002 ; Van Wyk *et al.*, 2005 ; Du Preez *et al.*, 2005). Chez ces espèces, la spermatogenèse se réalise par petites divisions et différenciations successives. Des spermatozoïdes sont observés pendant toute l'année dans les tubes séminifères. Chez *Nectophrynoïdes occidentalis*, le cycle de reproduction des mâles est au contraire de type discontinu. La spermatogenèse se déroule pendant la saison humide et les spermatozoïdes sont évacués aussitôt après leur constitution (Gavaud, 1975, Xavier, 1986).

L'ovogenèse des espèces chez lesquelles le mâle possède un cycle à spermatogenèse continue ou potentiellement continue est relativement moins connue que celle des espèces à cycle discontinu. On sait toutefois qu'en élevage certaines de ces espèces peuvent pondre plusieurs fois, ce qui suggère des vitellogenèses successives ou permanentes. Dans ce type de cycle, l'ovogenèse a été partiellement étudiée chez *Phrynobatrachus calcaratus* (Gueydan-Baconnier, 1980) et par quelques observations concernant *Bufo regularis* (Salami-Cadoux, 1979 ; Pujol, 1985).

Nous appuyant sur ces travaux concernant les cycles de reproduction des Anoures mâles et femelles en particulier, le but de notre travail est de comprendre et déterminer le type de cycle et les modalités de la reproduction de *Bufo mauritanicus*, en relation avec les conditions externes.

L'étude et le choix du terrain concernent la zone humide de Beni-Belaïd. La principale caractéristique de ce site est l'humidité et la présence d'eau en quantité relativement importante a conditionné la mise en place d'un couvert végétal qui lui est totalement inféodé. Cette végétation est en effet caractérisée par une composition spécifique directement liée au degré et à la durée d'inondation des différentes parties du site. La présence de l'eau a également directement conditionné le développement d'une faune qui lui est largement tributaire : les micro-organismes planctoniques, les invertébrés aquatiques, les poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les mammifères (Benessaiah et Belhaj, 1998).

La zone de Beni Belaïd est une zone qui revêt une importance au niveau international et elle est l'objet d'une stratégie de conservation de la biodiversité dont le facteur « eau » est un élément principal incontestable.

Les amphibiens et les reptiles participent à la diversité biologique du site et constituent un véritable réservoir de ressources alimentaires pour de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux. Les reptiles contribuent également à réguler les effectifs de rongeurs.

Le présent travail est divisé en quatre chapitres. Dans le premier chapitre, nous traiterons quelques données bibliographiques sur la zone humide de Beni-Belaïd, le second chapitre sera consacré à la biologie de la reproduction des Amphibiens Anoures, le matériel et les méthodes feront l'objet du troisième chapitre et enfin dans le dernier chapitre nous aborderons successivement les résultats et les discussions suivis par une conclusion générale.

## *Chapitre I : Présentation de la région d'étude*

### **I.1. Aperçu sur les zones humides**

Au sens de la convention de Ramsar (Iran) signée en 1971 par plusieurs pays dont l'Algérie, les zones humides sont « des étendues de marais, de fagnes, de tourbières, ou d'eau naturelle ou artificielle, permanentes ou temporaires, où l'eau est statique ou courante, douce, saumâtre ou salée n'excédant pas six mètres ». En résumé, il s'agit de toute zone dans laquelle s'est développé un milieu propice aux flores et faunes aquatiques, dépendant étroitement de l'eau. Les zones humides assurent plusieurs avantages économiques à l'homme à travers la production halieutique, le maintien des aquifères pour l'agriculture, la stabilisation des côtes, la production de bois mais ce sont les zones les plus vulnérables à l'action de l'être humain.

### **I.2. Coordonnées géographiques et localisation générale du site**

La zone humide de Béni-Bélaïd se situe dans la wilaya de Jijel, sur le littoral Est Algérien, elle dépend de la daïra d'El-Ancer et de la commune de Kheïri Oued Adjoul et fait partie de la plaine de Béni-Bélaïd. Elle est située à quelques 32 kilomètres du chef lieu de la wilaya, dans le prolongement de la vaste plaine agricole de Belghimouz. La région d'étude se caractérise par une altitude qui va depuis 0m au bord de mer jusqu'à 8 à 10 m à l'intérieur des terres (Doumandji, 1997).

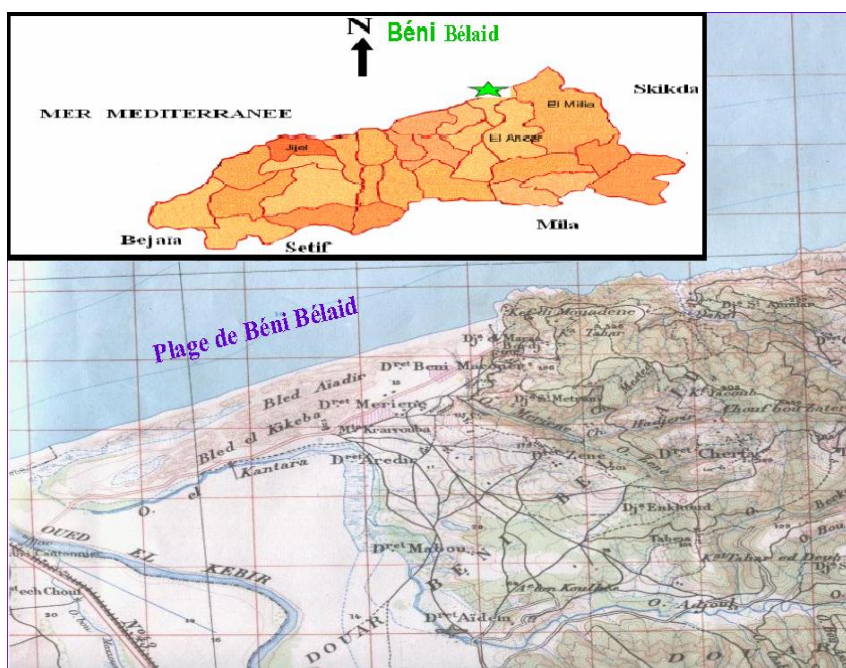
Les coordonnées géographiques de la zone humide de Béni-Bélaïd sont 6° 5' 6'' de longitude Est et 36° 53' 28'' de latitude Nord <sup>(2)</sup>. Selon la figure n° 1, ce site est donc limité :

- au nord, par un cordon dunaire et la mer méditerranée,
- au sud, par des terrains agricoles,
- à l'ouest, par l'embouchure de l'oued El-Kébir,
- à l'est, par des terrains marécageux.

---

<sup>1</sup> Article Ier, Convention sur les zones humides (Ramsar, Iran, 1971).

<sup>2</sup> Article Ilième, Atlas des zones humides algériennes d'importance internationale (Alger, 2002).



**Figure 1 : Situation géographique de la zone humide de Beni-Belaïd.**

La superficie du site est évaluée à environ 120 hectares et englobe le plan d'eau libre, les prairies inondables, la peupleraie située à l'ouest, les terres inondables entourées de roselières et les dunes au nord (Benhalla, 1997).

### **I.3. Etude du milieu**

#### **I.3.1. Caractéristiques physiques du milieu**

##### **I.3.1.1. Relief et géologie**

La plaine de Béni-Bélaïd est située dans l'une des séries complexes de la zone côtière du secteur des massifs anciens de la Petite Kabylie ; elle est délimitée par des chaînes montagneuses formées essentiellement de terrains métamorphiques et recouvertes de lambeaux Oligo-Miocènes (argilo-gréseux) et traversées par des roches éruptives datant du miocène <sup>(2)</sup>. Ces montagnes d'âge jeune sont très accidentées, entaillées par des vallées profondes à évolution morphologique très rapide. La plaine elle-même se caractérise par des dépôts de charriages, d'alluvions d'argiles, de limons, de sable fin et grossier du quaternaire.

Dans son ensemble, le terrain est relativement plat et l'altimétrie n'excède pas 10 mètres. En allant d'Ouest vers l'Est, le cordon dunaire limitant la partie Nord de la zone est plus large, ce qui explique l'étroitesse de la partie Est de la zone et la pauvreté de sa végétation <sup>(1)</sup>.

<sup>1</sup> Article Ier, Convention sur les zones humides (Ramsar, Iran, 1971).

<sup>2</sup> Article IIIème, Atlas des zones humides algériennes d'importance internationale (Alger, 2002).

### **I.3.1.2. Pédologie**

Dans les endroits nus du cordon dunaire où il est continuellement remanié par le vent, le sable est de couleur blanche ou beige friable et sans structure. Dans les endroits couverts de végétation, il est friable en surface, de plus en plus humide et compact en profondeur et de couleur beige à gris. Au niveau de la partie inondée, le sol est formé de dépôts de vase et de sédiments qui, au fil des ans, ont fini par former une couche compacte.

La région de Jijel présente quatre types principaux de sols : des sols bruns parfois lessivés de texture moyenne à fine, des sols bruns calcaires sur marnes de texture lourde généralement peu épais sur les fortes pentes et caractérisés par une bonne capacité de rétention, des sols encore peu érodés sur substrats calcaires et des sols d'apports alluviaux profonds, de texture variable, particulièrement riche en éléments fertilisants (Berchiche, 1997).

### **I.3.1.3. Hydrologie**

Le site de Béni-Bélaïd constitue le prolongement de la plaine alluviale de Belghimouz, d'une superficie de 1800 hectares, drainée par un réseau hydrographique caractérisé par une fréquence élevée de confluences, des crues rapides et puissantes. La plaine de Béni-Bélaïd favorise l'abondance des ressources en eau fluviale. Lors des crues de faible récurrence, il se produit des débordements et des inondations qui donnent lieu à la constitution de marécages persistants et temporaires comme ceux du lac de Béni-Bélaïd.

Le phénomène d'hydromorphie ainsi provoqué empêche la culture des sols approximativement du mois de décembre jusqu'aux mois de mars et avril. Le lac de Béni-Bélaïd est alimenté, par temps d'orage par les eaux de mer via l'estuaire de l'Oued El Kébir, par l'Oued Adjoul, ainsi que par les eaux de pluies et les résurgences de la nappe phréatique.

Les valeurs hydrologiques du site sont de telle sorte que le lac de Béni-Bélaïd, en période de faible pluviosité, assure l'alimentation des réserves en eaux souterraines, notamment celle de la nappe aquifère de Belghimouz. En période de fortes pluies, il assure la régulation des crues, et sert dans la rétention des eaux excédentaires de l'Oued Adjoul.

## **I.3.2. Caractéristiques climatiques**

Le site est sous l'influence directe de la Mer Méditerranée, il est protégé par une chaîne montagneuse située en bordure d'une vallée élargie et ouverte uniquement du côté Nord. La zone à laquelle il appartient est caractérisée par un bioclimat méditerranéen humide à variante

douce, très pluvieuse qui recueille plus de 1100 mm par an, avec une température moyenne annuelle de 18°C <sup>(2)</sup>.

### I.3.2.1. Données climatiques de la région d'étude

Faute de station météorologique au niveau de la zone humide de Béni-Bélaïd, nous avons utilisé les données climatiques représentées par les valeurs mensuelles moyennes des températures et des précipitations prélevées à la station météorologique du port de Djendjen située à 0m d'altitude. Les valeurs illustrées dans les tableaux I et II portent sur les deux années d'échantillonnage dans la région d'étude.

#### I.3.2.1.1. Température

La température est le facteur climatique le plus important. C'est celui dont il faut examiner en priorité les répercussions écologiques (Dreux, 1980). D'un mois à un autre la température moyenne s'accroît ou diminue lentement. L'animal est sensible à ces faibles variations (Doumandji et Doumandji-Mitiche, 1994).

Le tableau n° 1 résume les valeurs moyennes mensuelles des températures prélevées durant les deux années d'étude.

Tableau 1: Les températures mensuelles moyennes enregistrées au niveau du port de Djendjen durant la période 2003-2004

Mois Année	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Jui	Juil	Août	Sep	Oct	Nov	Déc	Moyenne annuelle
2003	12,4	11,8	14,6	16,5	18,9	25,6	28,1	28,6	24,7	22	17,4	13,3	19,5
2004	12,7	13,5	14,2	15,5	17,5	22,1	25,7	27,3	24,7	23,0	15,2	13,7	18,8
T(°C)Moy	12,6	12,7	14,4	16	18,2	23,9	26,9	28	24,7	22,5	16,3	13,5	19,1

Les températures les plus élevées sont enregistrées pendant les mois de juillet et août, tandis que les températures basses sont enregistrées les mois de janvier et février pour les deux années d'étude. Le mois le plus chaud est le mois d'août où on a enregistré une moyenne de 28°C, alors que le mois de janvier s'avère le plus froid avec une température moyenne de 12,6°C.

---

<sup>2</sup> Article IIIème, Atlas des zones humides algériennes d'importance internationale (Alger, 2002).

### I.3.2.1.2. Pluviométrie

La région d'étude est l'une des régions les plus arrosées de toute l'Algérie. Il tombe en moyenne plus de 1000 mm/an. Les pluies interviennent principalement en automne, en hiver et au printemps. Les étés sont généralement secs, c'est d'ailleurs là une caractéristique du climat méditerranéen (Emberger, 1971).

Le tableau n° 2 révèle les hauteurs mensuelles et annuelles des précipitations enregistrées au cours des deux années d'étude 2003-2004.

**Tableau 2 : Répartition mensuelle et annuelle des pluies au niveau du port de Djendjen**

Mois Année	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Jui	Juil	Août	Sep	Oct	Nov	Déc	Année
2003	369,0	88,4	26,3	140,9	56,6	0,4	2,4	0,0	114,6	67,4	106,0	241,7	1213,7
2004	151,2	66,7	74,2	98,2	70,0	41,2	1,0	6,2	83,8	35,4	322,6	188,8	1139,3
Hm(mm)	260,1	77,6	50,3	119,6	63,3	20,8	1,7	3,1	99,2	51,4	214,3	215,3	1176,7

Hm : hauteur moyenne des précipitations en mm.

Selon les années, on constate que la répartition annuelle des précipitations moyennes est inégale : les minima sont enregistrés pendant les mois de juillet et août, alors que les maxima se situent en décembre et janvier.

Selon Seltzer (1946), les températures minimales diminuent de 0,4°C, tous les 100m d'altitude alors que les températures maximales diminuent de 0,7°C. Les précipitations annuelles augmentent de 40 mm tous les 100 m d'altitude.

Il n'y aura donc pas de corrections à porter compte tenu que notre station d'étude varie de 0m jusqu'à 8 à 10m d'altitude, ce qui autorise l'utilisation des données climatiques de la station météorologique du port de Djendjen. Pour mieux définir la nature du climat de la région par l'établissement d'une synthèse climatique, seront considérées les données obtenues pendant une période de dix années.

### I.3.3. Synthèse des données climatiques

#### I.3.3.1. Diagramme ombrothermique de Gaussen

Proposé par Bagnouls et Gaussen en 1953, ce diagramme nous permet d'étudier l'intensité et la durée de la période de sécheresse. Sa réalisation consiste à porter sur un même graphique la courbe des précipitations moyennes et celles des températures moyennes  $(M+m)/2$  (Figure



2). La hauteur moyenne des précipitations sur une période de dix ans est enregistrée dans le tableau suivant.

Tableau 3 : Moyenne des précipitations sur une période de dix ans (1995-2004)

Mois Paramètre	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Jui	Juil	Août	Sep	Oct	Nov	Déc	Année
H (mm)	143,5	83,6	51,8	73,4	48,6	14,2	3,5	14,1	67,4	64,4	170,8	182,2	917,5

H : hauteur des précipitations en mm.

D'après le tableau 3, on constate l'irrégularité de volume et de la répartition du régime pluviométrique durant les dix années prises en considération.

Le tableau n° 4 résume la moyenne des maxima M, la moyenne des minima m et la moyenne mensuelle  $(M+m)/2$  sur une période de dix ans (1995-2004) relevées à la station météorologique du port de Djendjen.

Tableau 4: Moyenne mensuelle des températures enregistrées sur une période de dix ans (1995-2004)

Mois Paramètres	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Jui	Juil	Août	Sep	Oct	Nov	Déc	Moyenne annuelle
M (°C)	16,4	16,6	18,5	20,0	22,8	27	29,5	30,8	27,8	25,2	20,3	17,5	22,7
m (°C)	9,3	8,7	10,5	11,8	15,1	18,8	21,1	22,6	19,9	16,9	12,7	9,1	14,7
M+m / 2	12,9	12,7	14,5	15,9	19	22,9	25,3	26,7	23,9	21,1	16,5	13,3	18,7

M (°C) : température moyenne maximale

m (°C) : température moyenne minimale

M+m / 2 : température moyenne mensuelle

Sur une moyenne de dix années successives, il apparaît que le mois d'août est le mois le plus chaud avec une température moyenne égale à 26,7°C, alors que le mois de février s'avère le mois le plus froid avec une température moyenne de 12,7°C.

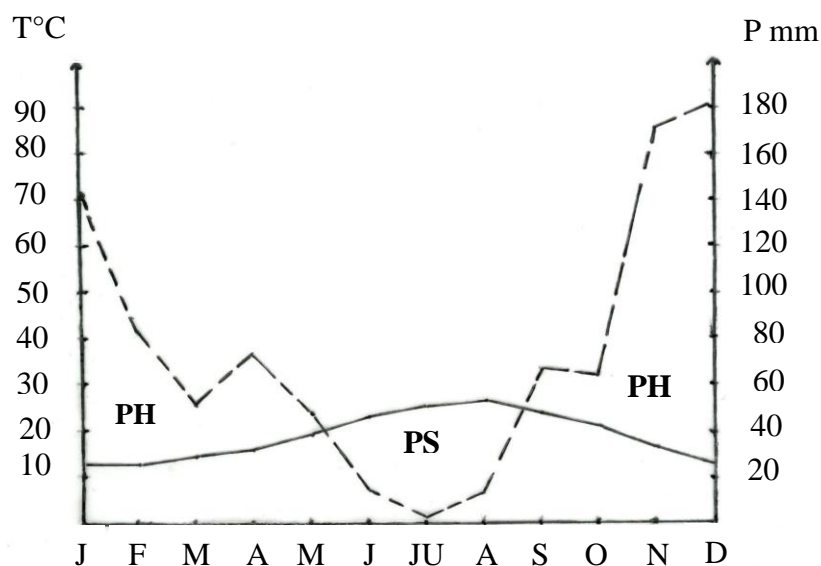


Figure 2 : Diagramme ombrothermique de la région d'étude sur une période de 10 ans (1995 – 2004).

Légendes :

- : courbe des précipitations,
- : courbe des températures,
- PH : période humide,
- PS : période sèche.

Le diagramme ombrothermique de la région d'étude pour les dix années prises en considération montre l'existence de deux périodes, l'une sèche et l'autre humide. On constate que la période sèche va de la mi-mai à la fin du mois d'août alors que la période humide s'étale sur les autres mois de l'année soit 7 mois et demi environ.

I.3.3.2. Climagramme d'Emberger

La réalisation du climagramme pluviométrique d'Emberger nécessite le calcul d'un quotient par la formule proposée par Stewart (1969).

$$Q = 3,43P / (M-m) \quad \text{avec,}$$

- Q : quotient pluviométrique d'Emberger,
- P : pluviométrie moyenne annuelle exprimée en mm,
- M : moyenne des températures maximales du mois le plus chaud exprimée en °C,
- m : moyenne des températures minimales du mois le plus froid exprimée en °C.

Ce quotient permet de situer la zone d'étude par rapport aux étages bioclimatiques représentés dans le climatogramme d'Emberger (Figure 3). Le quotient pluviométrique Q est calculé en prenant en considération une période s'étalant sur 10 ans depuis 1995 jusqu'à 2004. Ce quotient est égal à 142,4. En rapportant cette valeur sur le climatogramme d'Emberger, il apparaît que la région d'étude appartient à l'étage bioclimatique humide inférieur et au sous-étage bioclimatique à hiver chaud.

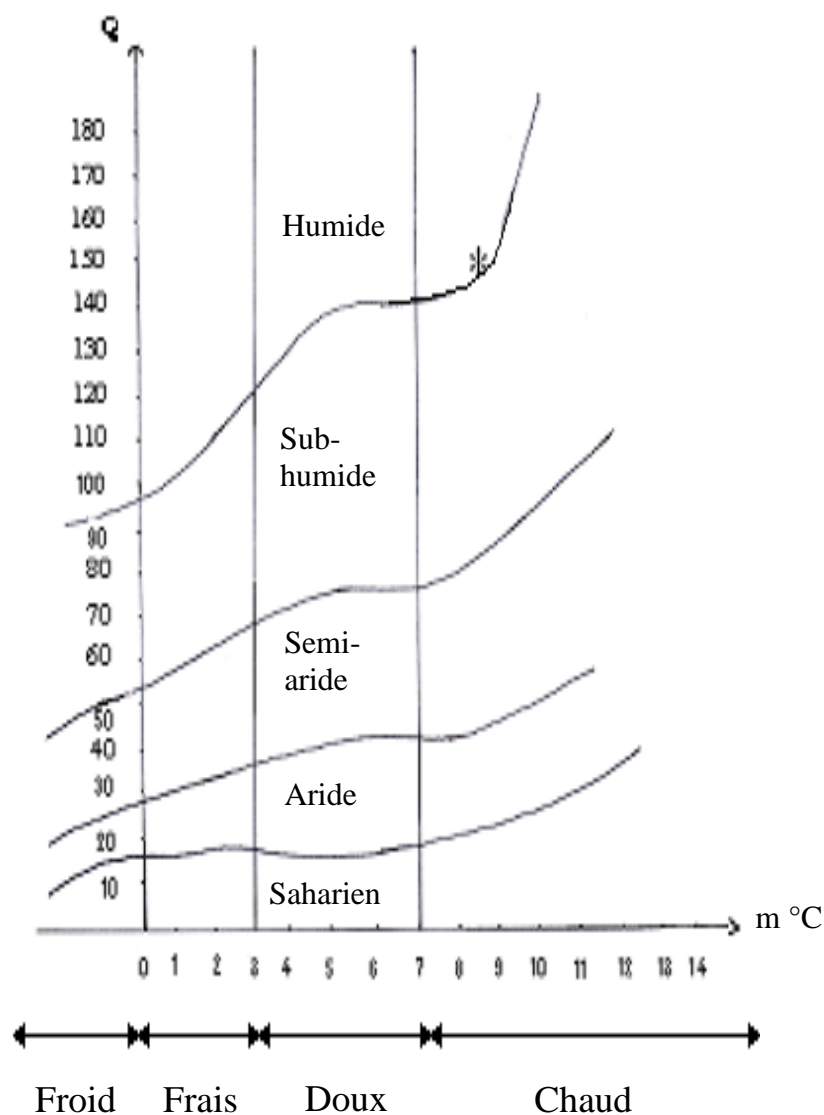


Figure 3 : Position de la zone humide de Béni-Bélaïd dans le climatogramme d'Emberger.

Légendes :

- Q : quotient pluviométrique d'Emberger,
- m °C : Température minimale du mois le plus froid,
- \* Emplacement de la zone d'étude

L'usage du quotient pluviométrique d'Emberger permet de proposer une classification des climats méditerranéens qui s'est avéré fort utile en écologie, en particulier pour l'étude de la répartition spatiale des espèces et des peuplements végétaux (Ramade, 2003).

#### **I.4. Caractéristiques écologiques**

Le site est constitué d'un plan d'eau libre d'une superficie de 10 hectares, entouré d'une végétation lacustre composé de *Tamarix*, d'aulne glutineux, de *Fraxinus angustifolia*, de phragmites (*Phragmites australis*) et de typha (*Typha angustifolia*); d'une peupleraie (*Populus alba*) âgée, au sein de laquelle coulent de nombreux ruisseaux avec un sous bois constitué de *Nerium oleander* et de *Rubus ulmifolius*, d'un cordon dunaire séparant le lac de la mer, recouvert d'une végétation inféodée à l'écosystème dunaire, d'une zone inondable qui s'assèche entièrement en été ; et enfin d'un espace agricole qui occupe une faible superficie entre le lac et la zone d'inondation (Boumezbeur et Ameur, 2003 ; Anonyme, 2002).

##### **I.4.1. Données bibliographiques sur la flore**

Le site de Béni-Bélaïd est caractérisé par une mosaïque de groupements végétaux dont on reconnaît les groupements suivants :

- les groupements de garaâs (marais et/ou étang) et de dépressions où la végétation est souvent organisée en ceintures ou en lignes parallèles. Trois ceintures peuvent ainsi être déterminées : ce sont les hydrophytes représentés par *Ceratophyllum sp.* et *Myriophyllum sp.*, un peuplement de *Nymphaea alba* et de *Jussiaena repens*, les amphiphytes représentés *Apium crassipes*, des carex, des joncs et des iris et les hygrophytes représentés par *Lippia nodiflora* et *Cotula coronopifolia* ;

- les groupements de l'Oued El-Kebir sont dominés par *Typha angustifolia*, *Potamogeton pectinatus* et *Apium crassipes*. Sur les rives, on rencontre *Tamarix gallica* qui est très abondant ;

- les groupements de ripisylves et d'aulnaies constitués d'un cortège d'espèces forestières dont la strate arborée est représentée par *Alnus glutinosa* ;

- les groupements de forêts hygrophiles composés principalement par *Populus alba*, d'*Ulmus campestris*, *Fraxinus angustifolia* et de *Nerium oleander* accompagnés d'un nombre

important de lianes (*Rubus ulmifolius*, *Hedera helix*, et *Cynanchum acutum* non signalé à l'Est) ;

- les groupements de prairies humides sont sous forme de grandes clairières occupées principalement par *Lippia nodiflora*, *Pulicaria dysenterica*, *Xanthium strumarium*, *Carex flaca*, des massifs de *Rubus ulmifolius* et *Vitex agnus castus* ornent ces prairies ;

- les groupements de xérophiles représentés par plusieurs faciès, les uns dominés par *Diotis maritima*, les autres par *Retama monosperma bovei* ou par *Echinophora spinosa* (espèce remarquable et rare). Signalons enfin deux espèces rares, *Matthiola incana* et *Calystegia soldanella*.

#### **I.4.2. Données bibliographiques sur la faune**

Le site de Béni-Bélaïd présente une faune rare et particulière notamment par la présence :

- d'une avifaune riche et diversifiée comprenant plusieurs espèces rares tel est le cas de *Porphyrio porphyrio*, *Aythya nyroca* ou peu commune comme *Alcedo atthis*, et *Acrocephalus scirpaceus* ;

- d'espèces endémiques représentées par *Pseudophoxinus callensis*, *Barbus callensis*, *Rana perezi*, *Bufo mauritanicus* ou menacées et localisées telles que *Emys orbicularis* ;

- d'odonates d'origine afrotropicale qui constituent une faune relictuelle comme *Acisoma panorpoides ascalaphoides*, *Diplacodes lefebvrei*, *Trithemis annulata*, *Hydrocyrius columbae*, *Anisops sardea* et *Mesovelgia vittigera* ;

- de la loutre *Lutra lutra* espèce rare à l'échelle mondiale mais abondante dans ce site.

#### **I.5. Originalité du site**

Le site de Béni-Bélaïd est qualifié de site original pour plusieurs raisons :

- sa situation en étage bioclimatique de végétation humide, alors que les complexes humides de Numidie s'étendent sur l'étage subhumide (De Belair *et al.*, 1997) ;

- son développement sur substrat alluvionnaire et partiellement sablo-dunaire, favorisant le voisinage de deux groupes d'écosystèmes, hydro-hygrophile et xérophile ;
- la diversité de ses groupements végétaux, composés essentiellement de forêt hygrophile, étangs, ripisylves, estuaire d'un grand oued, prairies humides et de dune littorale ;
- la présence d'espèces endémiques ou menacées ;
- la présence d'une avifaune riche et diversifiée comprenant plusieurs espèces rares ou peu communes ;
- la présence d'une faune relictuelle d'origine afro-tropicale.

En conclusion, le site de Béni-Bélaïd est un espace d'interférence où peuvent cohabiter une flore et une faune d'origines biogéographiques diverses.



*Chapitre II : Biologie de la reproduction des  
Amphibiens Anoures*



## II.1. Quelques généralités sur les Amphibiens

Les Amphibiens constituent un groupe de vertébrés qui s'est différencié depuis plus de 300 millions d'années (Weiserbs et Jacob, 2005). La classe des Amphibiens est divisée en trois ordres qui rassemblent toutes les espèces actuelles : les Gymnophiones qui représentent un groupe tropical, les Urodèles tels que les salamandres et les tritons, et les Anoures représentés par les crapauds et les grenouilles. Sur les quelques 40.000 espèces de vertébrés actuellement recensées dans le monde, on ne compte qu'environ 4000 espèces d'amphibiens (Le Garff, 1991). Le mode de reproduction des amphibiens est défini par une combinaison de caractéristiques, comprenant le site de reproduction, l'emplacement des pontes (terrestre ou aquatique) et le site de développement des larves (Salthe, 1969 ; Salthe et Duellman, 1973). Le mode ancestral de reproduction des amphibiens est supposé inclure la fécondation externe, l'oviparité et l'absence de soins parentaux (Duellman et Trueb, 1986 ; Wake, 1992). Le système urogénital des amphibiens est formé par des organes sexuels primaires, les gonades, et des organes accessoires qui comprennent les conduits.

Chez les amphibiens anoures, les testicules sont pairs, de forme ronde et compacte, et généralement jaunâtre (Goin et Goin, 1962; Santos et Oliveira, 2008; Duellman et Trueb, 1986). Ils sont entourés par une capsule de tissu conjonctif mince et fibreux, la tunica albuginea, qui enveloppe les tubes séminifères (Oliveira *et al.*, 2002; Santos et Oliveira, 2007).

Parmi les Amphibiens, certains genres, espèces, familles ou même certains ordres possèdent des testicules plurilobés (Pujol et Exbrayat, 2000). Parmi les Urodèles, le nombre de lobes testiculaires est fonction de l'âge de l'animal chez les Salamandridae (Delsol *et al.*, 1995). Les Amphibiens Gymnophiones, sauf rares exceptions, ont des testicules composés de plusieurs lobes situés les uns derrière les autres et de taille et de forme plus ou moins irrégulières selon les espèces (Wake, 1968). Parmi les Anoures, *Bufo regularis* possède, contrairement à la plupart des autres espèces, une paire de testicules qui n'ont pas l'aspect allongé habituel mais celui d'une bandelette irrégulière plus ou moins repliée sur elle-même présentant souvent plusieurs lobes irréguliers (Pujol, 1985).

La transition d'une vie totalement aquatique à une vie partiellement terrestre, représente un défi majeur dans l'évolution des vertébrés et a conduit à une explosion des adaptations reproductives (Zug *et al.*, 2001). Parce que la fécondation externe est la condition ancestrale des premiers amphibiens, l'eau est nécessaire à la reproduction.

La majorité des espèces d'amphibiens sont terrestres pendant la plus grande partie de leur vie. Pourtant, leurs processus de reproduction ne sont pas fondamentalement adaptés à l'environnement terrestre, mais reflètent l'ascendance aquatique du groupe dans la mesure où ils sont encore tributaires d'un retour à l'eau pour se reproduire (Lofts, 1974).

Les Amphibiens, intermédiaires évolutifs entre les poissons et les reptiles sont des tétrapodes ectothermes et présentent des cycles sexuels particulièrement adaptés à leur milieu de vie (Exbrayat *et al.*, 1997).

Une stratégie reproductrice peut être considérée comme un succès de la combinaison physiologique, morphologique, et comportementale agissant de façon à produire le nombre optimal de progéniture sous certaines conditions environnementales (Tyler, 1976 ; Duellman et Trueb, 1986). Les stratégies de reproduction sont aussi importantes pour la survie des espèces qui sont physiologiquement et morphologiquement adaptées à l'environnement.

Les modes de reproduction sont modifiés par la sélection naturelle afin de produire les stratégies les plus efficaces possibles, et ils reflètent un compromis entre de nombreuses pressions sélectives. Certains éléments des stratégies de reproduction sont : les contrôles endogènes et extrinsèques des cycles gamétogénétiques, la fécondité y compris le nombre et la taille des œufs, la fréquence de ponte, la durée du développement, l'effort de reproduction et les contraintes environnementales.

Dans cette partie du chapitre, nous présenterons le schéma général des grandes étapes de la spermatogenèse, une synthèse des cycles sexuels et des modes de reproduction essentiellement chez les Amphibiens Anoures.

## **II.2. Appareil génital mâle des Anoures**

La figure n°4 illustre le système reproductif des mâles Anoures.

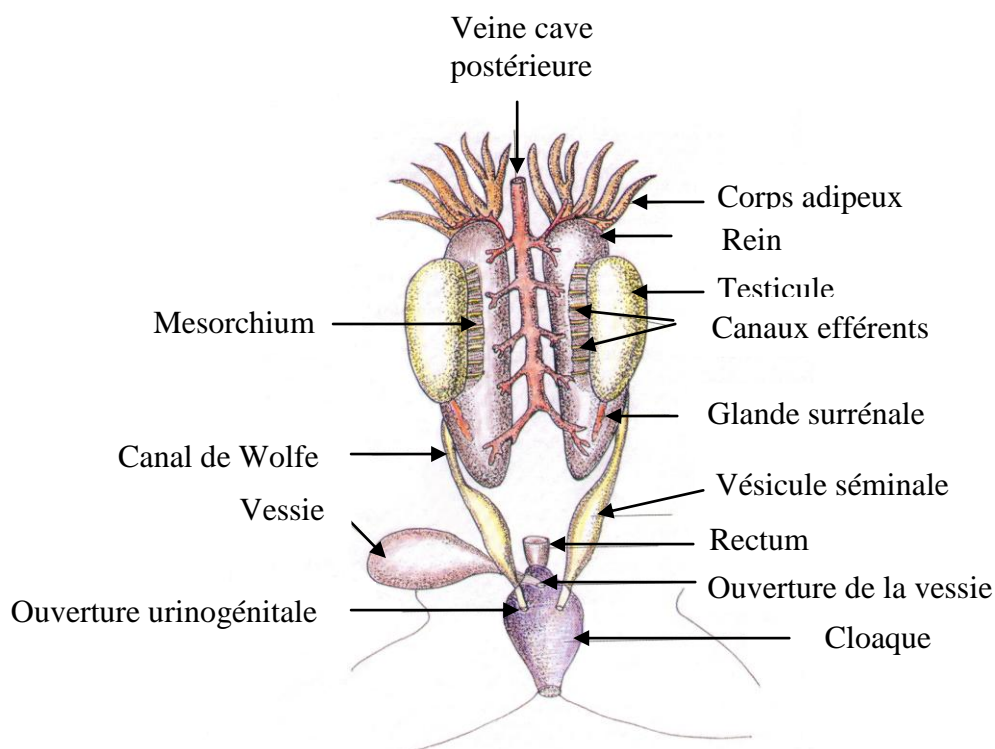


Figure 4 : Représentation schématique de l'appareil uro-génital des mâles Anoures. (Tyler, 2003)

Chez les Anoures, sauf exception, les testicules de forme ovale sont situés de chaque côté de la ligne médiane du corps contre la face ventrale des reins auxquels ils sont rattachés par un repli péritonéal, le mesorchium, parcouru par les canaux efférents et par des ramifications de l'artère testiculaire issue de l'aorte descendante (Delsol *et al.*, 1995; Lofts, 1974; Tyler, 2003).

Les testicules remplissent la double fonction commune aux vertébrés : produire les gamètes mâles, les spermatozoïdes, et sécréter les hormones sexuelles mâles, les androgènes, à l'origine des caractéristiques sexuelles secondaires (Lofts, 1974; Rastogi *et al.*, 2005).

### **II.3. Cycle de reproduction des mâles**

En fonction des différentes régions géographiques qu'ils occupent et de la diversité des conditions écologiques dans lesquelles ils vivent, les amphibiens affichent une variété de modes de reproduction. Chacun de ces modes, à son tour, peut être divisé en sous-catégories selon le degré de variabilité interne et des facteurs externes responsables du déclenchement et de l'entretien du cycle de reproduction (Rastogi *et al.*, 2005).

### II.3.1. Cinétique de la spermatogenèse et cycles spermatogénétiques

Le cycle spermatogénétique est l'ensemble des divisions et des différenciations cellulaires qui, à partir de la spermatogonie souche, aboutissent aux spermatozoïdes (Vaissaire, 1977). L'élaboration des spermatozoïdes se déroule dans les tubes séminifères, de la paroi vers la lumière, c'est-à-dire en direction centripète, suivant des coordonnées spatio-temporelles très précises. Les différentes phases du cycle spermatogénétique chez les vertébrés, en particulier chez les Amphibiens, sont expliquées par la figure n° 5, montrant le schéma général de la spermatogenèse.

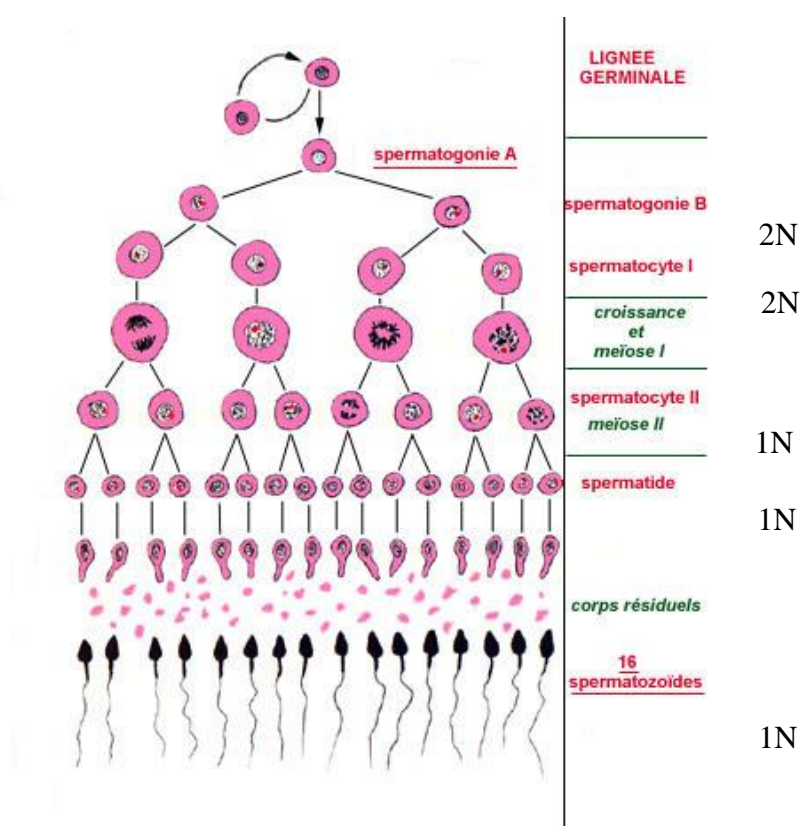


Figure 5 : Schéma général de la spermatogenèse.

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/fr/2/2b/SPERMATOGENESE.JPG>)

La spermatogenèse a fait l'objet de si nombreuses recherches, celle des Amphibiens suit le schéma général de la gamétogenèse mâle.

La spermatogenèse est l'ensemble des processus qui différencient les spermatogonies en spermatozoïdes. Cette évolution se fait en trois phases, une période de multiplication qui

aboutit à la constitution d'un stock de spermatogonies, la période d'accroissement qui mène la spermatogonie au stade de spermatocyte de premier ordre, et enfin celle de la maturation, caractérisée d'une part par la division réductionnelle (méiose) qui se situe entre spermatocyte de premier et de deuxième ordre et la phase de spermiogenèse qui transforme la spermatide en spermatozoïde (Kayser, 1963).

La spermatogenèse est soumise à des variations cycliques et le processus débute en général à l'extrémité borgne du tube séminifère pour progresser vers son embouchure.

Dans les tubes séminifères adultes, les différentes couches de cellules germinales représentent les phases de la spermatogenèse qui s'effectuent de façon centripète, depuis la spermatogonie située contre la lame basale jusqu'au spermatozoïde libéré dans la lumière.

Chez plusieurs espèces africaines, la maturation des spermatogonies en spermatozoïdes s'effectue en 21 jours (Gueydan-Bacconnier *et al.*, 1984a).

Les spermatides vont s'allonger et se transformer en spermatozoïdes au cours de la spermiogenèse (Pierantoni *et al.*, 2002). Ceci rend difficile l'étude *in vivo* des différentes étapes de la progression des cellules germinales et a nécessité le développement de systèmes *in vitro* (Russel and Steinberger, 1989; Jegou, 1993).

La spermatogenèse est régulée par diverses interactions cellulaires à l'extérieur du testicule (Fasano *et al.*, 1998 ; Chieffi *et al.*, 1991). Les différents types cellulaires se trouvent dans le tissu germinal des tubes séminifères (Figure 6). On note ainsi la présence de spermatogonies à la base de l'épithélium germinal, des spermatocytes et des spermatides disposées selon une direction centripète et des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère (Oliveira *et al.*, 2003).

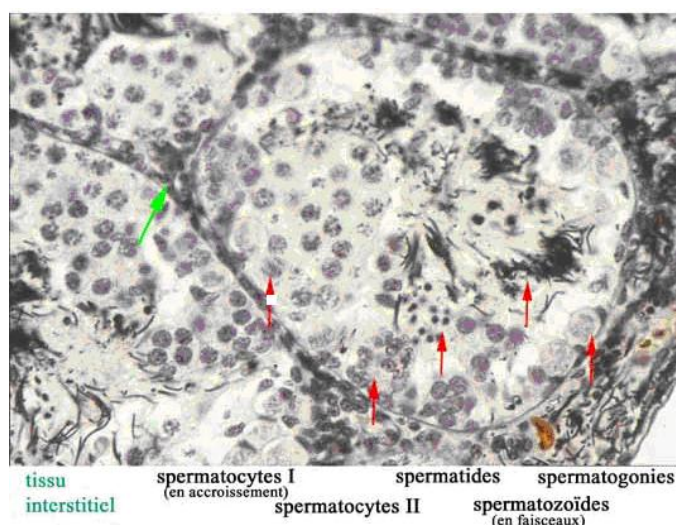


Figure 6 : Coupe histologique du testicule de Crapaud adulte. Organisation en cystes des cellules germinales. ([http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/PetitBuffon/amphibien/uro/uro\\_13.html](http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/PetitBuffon/amphibien/uro/uro_13.html))

Au niveau de cet épithélium, il existe également un arrangement cystique, c'est-à-dire que les cellules germinales qui sont au même stade de différenciation sont regroupées et associées à des cellules de Sertoli, pour former des cystes spermatogénétiques, (Wake, 1968; Lofts, 1974; Rastogi *et al.*, 1988; Oliveira *et al.*, 2002, 2003). L'organisation histologique du testicule des anoures et la spermatogenèse ont été décrits en détail chez l'Anoure *Bufo arenarum* en microscope photonique et électronique à transmission (Burgos et Fawcett, 1956; Scheltinga and Jamieson, 2003) (Figure 7).

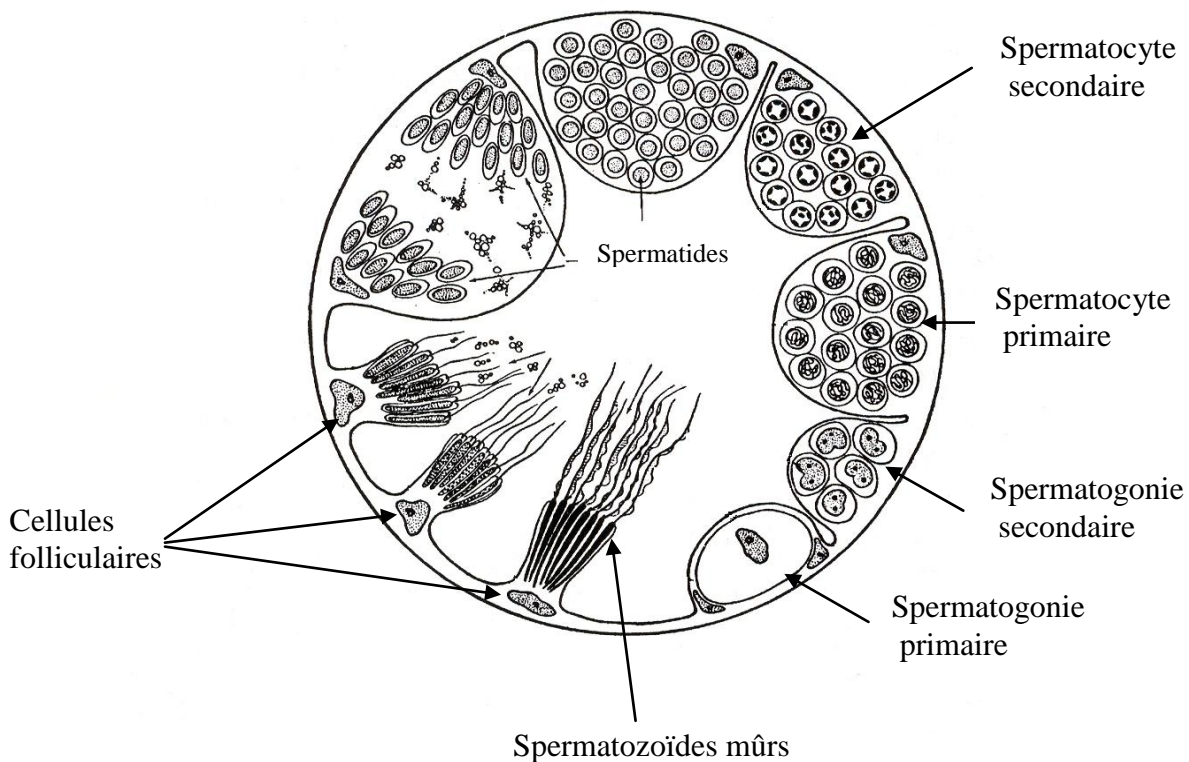


Figure 7 : Représentation schématique de l'arrangement des spermatocystes à la base du tube séminifère de *Bufo arenarum*. Les cellules folliculaires représentent les cellules de Sertoli de la terminologie actuelle. (Burgos et Fawcett, 1956 ; Scheltinga and Jamieson, 2003).

La spermatogenèse des Anoures a été décrite en microscopie photonique chez *Bombina bombina*, *Bombina pachypus* (Champy, 1913; Scheltinga et Jamieson, 2003), *Bombina variegata* (Obert, 1976) ; *Discoglossus pictus* ( Champy, 1923; Favard 1955; Sandoz 1970, 1974, 1975) ; *Alytes obstetricans* (Champy, 1913, 1923 ; Scheltinga et Jamieson, 2003 ; Grassé, 1986), *Xenopus laevis* ( Kalt, 1976, 1977 ; Gambino *et al.*, 1981 ; Bernardini *et al.*, 1990 ; Kobayashi *et al.*, 1993 ; Takamune *et al.*, 1995) ; chez les Bufonidae *Bufo vulgaris*,

*Bufo calamita*, *Bufo pantherinus* (Champy, 1913 ; Scheltinga et Jamieson, 2003), *Bufo regularis* (Pujol, 1985 ; Neyrand de Leffemberg et Exbrayat, 1995 ) et *Bufo mauritanicus* (Kisserli et Exbrayat, 2006).

Les cellules de Sertoli jouent un rôle important dans le déroulement de la spermatogenèse (Elftman, 1963 ; Vaissaire, 1977). Les testicules possèdent donc un rôle mécanique, de soutien, de protection et de nutrition des cellules germinales, un rôle dans la libération des spermatozoïdes matures dans la lumière du tube séminifère et un rôle endocrinien.

Chez les Amphibiens Anoures, trois types de cycles sexuels peuvent être mis en évidence, à savoir les cycles à spermatogenèse discontinue, continue ou potentiellement continue (Delsol *et al.*, 1995 ; Exbrayat *et al.*, 1997).

### **II.3.2. Cycles à spermatogenèse discontinue**

Chez les espèces à spermatogenèse discontinue, les spermatogonies se divisent au même moment dans l'ensemble du testicule et évoluent de manière synchrone (Delsol *et al.*, 1981). A l'intérieur du tube séminifère, les cellules sont donc à des stades assez proches. Les modalités peuvent être différentes selon les espèces. Chez *Rana temporaria*, espèce européenne, l'activité spermatogénétique a été décrite par Van Oordt (1956) en février-mars les testicules évacuent les spermatozoïdes et ne contiennent plus que des spermatogonies, alors que durant la période allant d'avril à octobre, la spermatogenèse s'accomplit et les testicules sont finalement remplis de spermatogonies primaires et de spermatozoïdes. Ce stock ainsi formé sera évacué à la prochaine période de reproduction. Par contre, chez l'espèce *Nectophrynoides occidentalis*, la spermatogenèse se déroule pendant la saison humide et les spermatozoïdes sont évacués aussitôt après leur constitution (Gavaud, 1975 ; Xavier, 1986).

On considère habituellement que la spermatogenèse discontinue caractérise les espèces des régions froides et des régions tempérées. En effet, dans ces pays la période de chaleur nécessaire pour que les testicules fabriquent les spermatozoïdes est courte et la spermatogenèse doit se réaliser rapidement. Dans les régions chaudes, au contraire, la spermatogenèse serait en général continue (Delsol *et al.*, 1995).

### II.3.3. Cycles à spermatogenèse continue

Les espèces qui appartiennent à ce type de cycle se caractérisent par une évolution spermatogénétique se réalisant par petites poussées successives plus ou moins rapprochées et présente donc une allure plus ou moins continue.

Les cycles de reproduction des mâles des amphibiens africains sont assez peu connus. Plusieurs travaux ont cependant permis de mettre en évidence des cycles annuels continus chez plusieurs espèces (*Bufo regularis*, *Ptychadena macCarthyensis*, *Ptychadena oxyrhynchus*, *Phrynobatrachus calcaratus*, *Xenopus laevis*; Delsol *et al.*, 1980, 1981, 1995 ; Exbrayat *et al.*, 1998 ; Gueydan-Baconnier, 1980 ; Gueydan-Baconnier *et al.*, 1984a,b ; Neyrand-de Leffemberg et Pujol, 1984 ; Pujol, 1985 ; Pujol et Exbrayat, 1996, 2000, 2002 ; Van Wyk *et al.*, 2005, Du Preez *et al.*, 2005). Récemment, ce type de cycle de reproduction a été confirmé chez *Bufo mauritanicus* (Kisserli et Exbrayat, 2006).

Les Amphibiens tropicaux soumis à un cycle de reproduction réellement continu présentent une spermatogenèse à vitesse variable d'une espèce à une autre. Selon Gueydan-Baconnier *et al* (1984a et b), la spermatogenèse de *Phrynobatrachus calcaratus* est plus rapide que celle de *Ptychadena macCarthyensis*.

Selon Cei (1949), les espèces *Bufo paracnemis*, *Bufo arenarum*, *Bufo granulatus*, *Leptodactylus prognathus*, *Leptodactylus ocellatus reticulatus*, *Leptodactylus laticeps*, *Physalaemus fascomaculatus*, *Pseudis paradoxa* et *Pseudis mantidactyla* sont toutes caractérisées par un cycle spermatogénétiques de type continue.

### II.3.4. Cycles à spermatogenèse potentiellement continue

Ces cycles de reproduction présentent une grande souplesse chez les espèces d'amphibiens où une simple variation de température peut provoquer le démarrage ou, au contraire, l'arrêt des processus de la reproduction, et ceci quelle que soit la période. Tel est le cas pour *Rana esculenta*. Un cycle de ce type a été reconnu chez *Leptodactylus bufonius*, *Lepidobatrachus asper* et *Rana tigrina* (Galgano, 1934, 1936 ; Cei, 1949 ; Van Oordt, 1960 ; Basu et Mondal, 1961).

Neyrand de Leffemberg et Exbrayat (1991) ont démontré l'importance du facteur abiotique, la température et son influence sur la cinétique de la spermatogenèse chez deux espèces d'Anoures, *Rana esculenta* et *Rana lessonae*. Ainsi les cycles spermatogénétiques de ces deux espèces s'avèrent de type potentiellement continu, c'est-à-dire qu'il existe en permanence des divisions de spermatogonies mais que la poursuite de la spermatogenèse est soumise aux



facteurs externes et, en particulier, aux conditions de température. En hiver, on observe quelques spermatogonies en division et des spermatocytes primaires ; au printemps, c'est à dire en avril-mai, toutes les catégories spermatogénétiques sont représentées (Delsol *et al.*, 1981 ; Guyétant, 1986).

Divers travaux dans lesquels *Rana esculenta* est considérée comme une espèce unique ont permis de mettre en évidence les effets de la température sur la gamétogenèse. Pendant l'hiver, si des individus sont placés artificiellement dans des conditions de température estivale, la spermatogenèse est observée ; inversement, aux périodes normales d'activité sexuelle, la spermatogenèse est arrêtée chez des animaux qui sont élevés artificiellement dans des conditions de température hivernale (Galgano, 1934 ; Lofts, 1964). En outre, il a pu être démontré que la température de l'ordre de 20°C représente une limite thermique au dessous de laquelle la spermatogenèse est ralentie aussi bien chez *Rana esculenta* que chez *Rana lessonae* (Neyrand de Leffemberg et Exbrayat, 1987). Egalement, une étude comparative de la vitesse spermatogénétique chez les deux espèces par histoautoradiographie a été réalisée (Neyrand de Leffemberg, 1988). A 20°C, la spermatogenèse démarre plus rapidement chez *Rana esculenta* que chez *Rana lessonae*.

#### **II.4. Cycle de reproduction des femelles**

Chez les Amphibiens Anoures dont les mâles ont un cycle de reproduction de type continu, les cycles des femelles sont moins connus (Exbrayat *et al.*, 1997). Pujol (1987), au cours d'une étude faite sur les individus femelles de *Bufo regularis*, a procédé à une étude quantitative des ovaires et a montré que toutes les étapes de l'évolution des follicules étaient représentées tout au long de l'année.

L'examen des oviductes des mêmes animaux a permis de mettre en évidence une constance dans la structure glandulaire de ces organes. Le cycle de ces femelles paraît donc réellement continu.

##### **II.4.1. Appareil génital femelle**

La figure ci-dessous, nous montre la structure générale du système reproducteur d'une femelle Anoure.

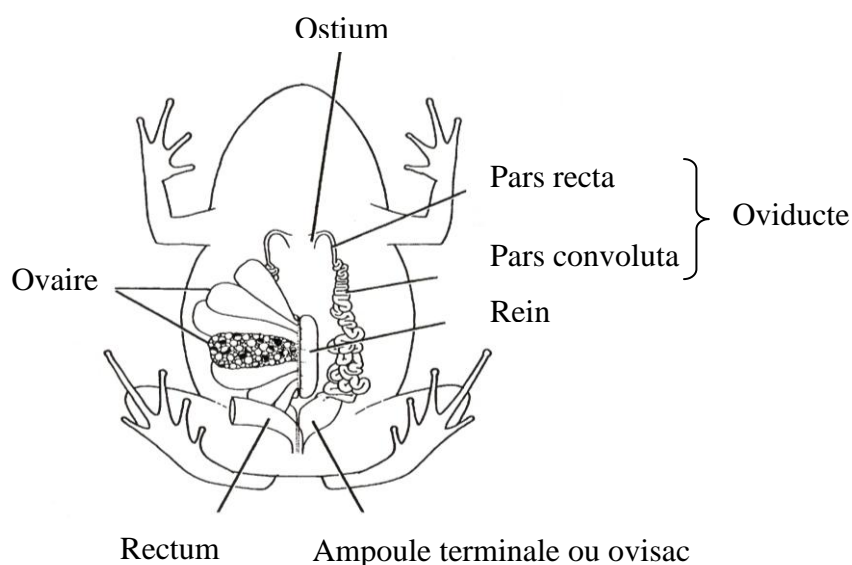


Figure 8 : Représentation schématique de la structure générale du système reproducteur d'une femelle Anoure. (Tyler, 2003)

Les ovaires des Anoures sont deux masses symétriques situées de chaque côté de la colonne vertébrale sur la face ventrale des reins. Ils constituent des sacs creux divisés en lobes à l'intérieur desquels les ovocytes font saillie. Le nombre de lobes est très variable d'une espèce d'Amphibien à une autre (Spengel, 1876; Bhaduri, 1953; Horton, 1984; Tyler, 2003).

La taille des ovaires varie beaucoup suivant l'âge de l'individu et la période de l'année en fonction du cycle vitellogénique. Ces ovaires polylobés sont attachés à la paroi dorsale du corps par une double extension du péritoine appelé le mésovarium.

Le cycle sexuel de l'ovaire des batraciens est synchrone de celui des testicules.

#### **II.4.2. Cycle ovarien**

Les cellules germinales primordiales se divisent en produisant des ovogonies qui se multiplient à leur tour par divisions mitotiques. Les ovogonies sont transformées en ovocytes primaires en entrant en prophase de la première division méiotique (Van Gansen, 1986).

Lorsque les ovogonies entrent dans la première division méiotique, elles deviennent des ovocytes primaires qui sont ensuite soumis à un processus complexe de cyto-différenciation et de division dont le résultat est la production de gamètes femelles (Dumont, 1972; Holland et Dumont, 1975; Brummett et Dumont, 1977; Dumont et Brummett, 1978; Kanamadai et Saidapur, 1982; Exbrayat et Collenot, 1983; Exbrayat, 1986; Villecco *et al.*, 2002; Sanchez et Villecco, 2003).

La figure n° 9 montre un exemple de stades prévitellogéniques au cours du cycle ovogénétique chez *Xenopus laevis* (Hausen et Riebesell, 1991).

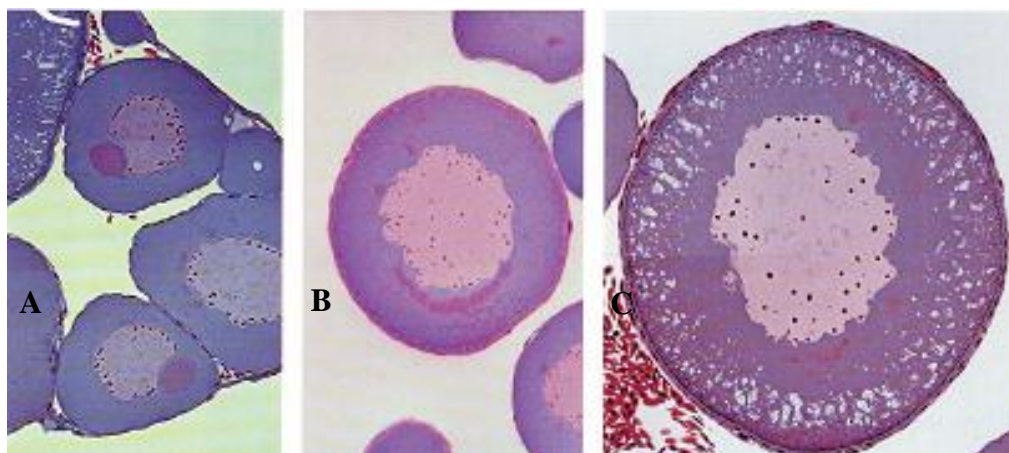


Figure 9 : Les différents stades prévitellogéniques au cours du cycle ovogénétique de *Xenopus laevis*. A: fin du stade ovocyte I, B: début du stade ovocyte II, C: fin du stade ovocyte II (Hausen et Riebesell, 1991).

Les ovocytes provenant des ovogonies sont enveloppés par une seule couche de cellules somatiques (épithélium folliculaire) pour former les follicules ovariens. Après la formation des follicules par le recrutement des ovocytes, ils suivent une séquence complexe de développement.

Comme chez la plupart des vertébrés inférieurs, l'ovogenèse des Amphibiens est caractérisée par un stade diplotène très long au cours duquel les chromosomes prennent un aspect plumeux caractéristique tandis que le cytoplasme devient le siège d'une vitellogenèse importante. Toute la croissance de l'ovocyte se produit pendant le stade diplotène, avant, pendant et même après la vitellogenèse (Van Gansen, 1986 ; Sanchez et Villecco, 2003).

Les principaux événements au cours de cette séquence sont l'accumulation du vitellus dans le cytoplasme de l'ovocyte et la formation de l'enveloppe vitelline qui l'entoure. Bien que le rôle de l'ovocyte dans la synthèse des constituants vitellins ne soit pas négligeable, la contribution majeure vient du foie sous forme de vitellogénine, séquestrée dans le sang par les cellules du follicule et transférée à l'ovoplasme par le processus complexe de vitellogenèse (Villecco *et al.*, 2002).

Au cours de la vitellogenèse, l'évènement majeur est l'accumulation des nutriments sous forme de protéines vitellines dans l'ovocyte. Chez la plupart des Amphibiens Anoures, le

stade III ovogénétique représente le début du processus vitellogénique, caractérisé par l'incorporation et l'accumulation dans le cytoplasme du vitellus sous forme de plaquettes vitellines (Wallace, 1985), qui comprend jusqu'à 85 pour cent du total des protéines d'œuf et est responsable de l'augmentation remarquable dans la croissance de l'ovocyte. L'accumulation du vitellus fournit les matériaux nutritifs nécessaires à l'embryogenèse (Follett et Redshaw, 1974 ; Sanchez et Villecco, 2003). Ces matériaux nutritifs, collectivement désignés sous le nom de vitellus se composent de 45% de phosphoprotéines, de 25% de lipides et de 08% de glycogène (Barth et Barth, 1954).

Le développement des gonocytes ovariens comprend diverses étapes successives, la multiplication des ovogonies, l'entrée en prophase méiotique, la croissance de l'ovocyte diplotène avant la vitellogenèse, la croissance de l'ovocyte pendant et après la vitellogenèse et enfin la maturation. Le début du stade diplotène coïncide donc avec le déclenchement de la croissance ovocytaire. Des modifications cellulaires se produisent en même temps, ainsi, le follicule se forme et la différenciation corticale de l'ovocyte commence. Les nucléoles de l'ovocyte se multiplient et son cytoplasme devient très basophile, ce qui est lié à une forte teneur en acides ribonucléiques. Le gonocyte au début du stade diplotène, est plus ou moins polyédrique et devient sphérique. Les cellules préfolliculeuses proches du jeune ovocyte tapissent complètement la surface ovocytaire. Les cellules folliculeuses constituent ainsi la granulosa monostratifiée typique des Amphibiens lorsque le follicule sera définitivement formé. A la fin de la croissance prévitellogénique, la surface de l'ovocyte est hérissée de courtes microvillosités qui refoulent les cellules folliculeuses. La granulosa est enrobée de fibroblastes et de fibres de collagène. Le noyau diplotène, arrondi et turgescant, prend le nom de vésicule germinative. Pendant cette période, les nucléoles augmentent en nombre de manière massive et présentent une évolution remarquable qui permet de reconnaître au sein des diplotènes prévitellogéniques une série continue de classes bien définies (Van Gansen et Schram, 1972).

La croissance du cytoplasme est encore plus importante que celle du noyau. L'asymétrie manifeste de la cellule germinale initiale se maintient de manière discrète dans le jeune ovocyte diplotène où le noyau est d'emblée légèrement excentré dans la cellule arrondie. La figure n° 10 montre la structure de la région périphérique animale d'un ovocyte d'Amphibien en phase de vitellogenèse.

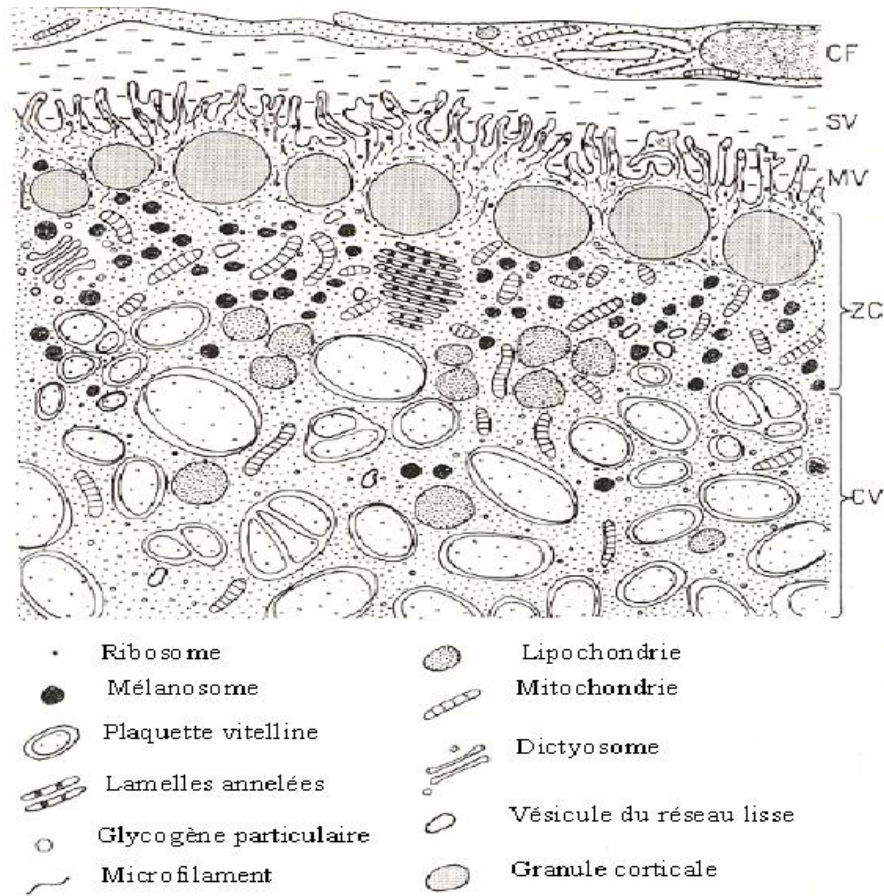


Figure 10 : Représentation structurale de la région périphérique animale d'un ovocyte vitellogénique d'Amphibien. CF: cellule folliculaire; SV: strate vitelline ou zone pellucide; MV: microvillosités; ZC: zone corticale; CV: cytoplasme vitellin (Van Gansen, 1986).

Chez les Amphibiens vivant dans la nature, la maturation est généralement suivie de la ponte des ovocytes mûrs. La fécondation détermine l'achèvement du processus méiotique. Les Amphibiens sont des espèces ovipares. Il existe cependant quelques espèces ovovivipares ou vivipares comme la Salamandre noire, *Salamandra atra*, le Crapaud vivipare africain *Nectophrynoides* et plusieurs genres de Gymnophiones comme *Typhlonectes*, *Siphonops* et *Dermophis*. Chez ces espèces, le développement embryonnaire se déroule dans les conduits génitaux maternels, sans qu'il n'y ait formation d'un organe de type placentaire (Van Gansen, 1986).

La taille et le nombre d'œufs varient chez les différentes espèces d'amphibiens. Ces variations sont attribuables aux exigences adaptatives des espèces à la diversité de l'environnement dans lequel elles pondent leurs œufs pour assurer leur développement

(Guraya, 1976, 1979; Del Pino *et al.*, 1986; Del Pino, 1989; Villecco *et al.*, 1996, 1999, 2000, 2002; Uribe, 2001, 2003; Sanchez et Villecco, 2003; Exbrayat, 2006).

Le nombre définitif des follicules primordiaux est établi dans l'embryon (Skinner, 2005). Toutefois, chez les Amphibiens, comme chez les autres vertébrés inférieurs, l'ovogonie persiste dans l'ovaire adulte ovogénétique au cours des cycles de reproduction pour générer ainsi une nouvelle cohorte d'ovocytes chaque année (Van Voorhis, 1999).

#### **II.4.3. Développement et maturation des gonades femelles**

Selon Perez (2005), La maturation méiotique de l'ovocyte du Xénope s'établi après plusieurs divisions mitotiques, les cellules germinales diploïdes ( $2n$  chromosomes) subissent une phase de réplication de l'ADN, pendant laquelle les chromatides sœurs se répliquent, les cellules deviennent alors tétraploïdes ( $4n$  chromosomes). Cette étape est appelée la phase S pré-méiotique, qui prépare les cellules à entrer dans un type de division cellulaire spécifique, la méiose. Celle-ci leur permettant de se diviser pour former des gamètes haploïdes ( $n$  chromosomes). La méiose est un processus clé de la reproduction sexuée, avec la fécondation, elle permet le brassage de l'information génétique à l'origine de la formation d'un individu unique. La méiose consiste en une série de deux divisions cellulaires successives, la division réductionnelle, responsable de la séparation des chromosomes homologues, directement suivie de la division équationnelle au cours de laquelle les chromatides sœurs sont séparées.

Chez la femelle, la cellule germinale diploïde (l'ovogonie) entrée en méiose (l'ovocyte primaire) ne donnera, en fin de division, qu'un seul gamète haploïde fécondable (l'ovocyte secondaire puis ovotide et ovule).

Au cours du processus de maturation de l'ovocyte, on assiste à un premier arrêt du phénomène physiologique en prophase de première division méiotique suivi de la première division de méiose et enfin arrêt en métaphase de deuxième division méiotique.

Parallèlement à la croissance ovocytaire, il y a apparition d'une pigmentation de l'ovocyte, permettant de distinguer le pôle animal du pôle végétatif. Chez le Xénope, les critères de taille et de pigmentation ont permis de définir six stades appelés stade de Dumont (Dumont, 1972). En stade VI de Dumont (prophase I), l'ovocyte I de Xénope est prêt à reprendre le cycle méiotique. A ce stade, les nucléoles sont de tailles différentes et plus centralement localisés (Hausen et Riebesell, 1991).

Au moment de l'ovulation, l'arrêt en prophase I est levé sous l'effet de la progestérone, une hormone stéroïdienne sécrétée par les cellules folliculaires environnantes stimulées par une

première hormone, la LH ou hormone de l'ovulation. L'ovocyte I reprend alors le cycle méiotique et progresse dans des étapes dites de maturation méiotique. Cette dernière est marquée, en premier lieu, par la rupture de l'enveloppe nucléaire appelée GVBD (Germinal Vesicle BreakDown) suivie par l'achèvement de la première division méiotique. La fin de la méiose I est signalée par l'émission d'un premier globule polaire, ce qui est lié à une division asymétrique de l'ovocyte I ; seul l'ovocyte secondaire (l'ovocyte II) continuera le cycle méiotique, le globule polaire sera détruit (Figure 11).

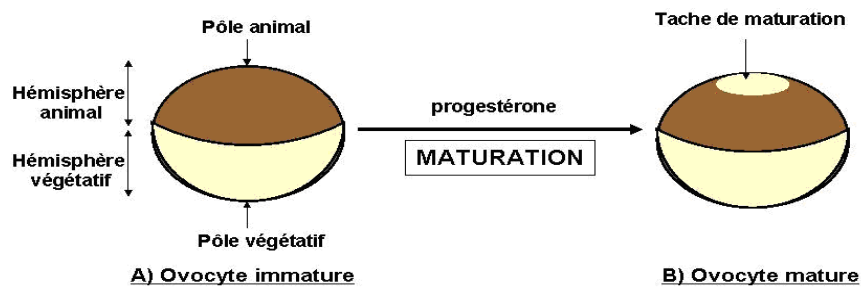


Figure 11 : Différenciation des stades ovogénétiques et induction de la maturation de l'ovocyte chez le Xénope. (<http://fr.wikipedia.org/wiki/X%C3%A9nope>)

Le GVBD se caractérise morphologiquement par l'apparition d'une tache claire de dépigmentation au pôle animal de la cellule. Après ces événements, l'ovocyte entre en seconde division de méiose, sans passer par une interphase. Pour le Xénope comme pour tous les vertébrés, le processus de maturation s'achève lorsque l'ovocyte est arrêté une seconde fois en métaphase de deuxième division de méiose. A ce stade, l'ovocyte II mature attend d'être fécondé. Cet arrêt en métaphase II de méiose ne dure pas plus que quelques heures, si l'ovocyte n'est pas fécondé à temps, il dégénère et entre dans une voie apoptotique (Figure 12).

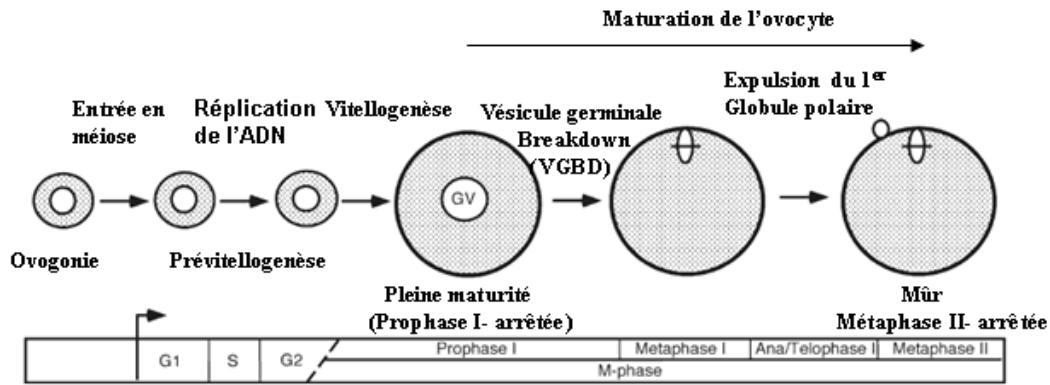


Figure 12 : Croissance de l'ovocyte, maturation ovocytaire et méiose.

GV: vésicule germinale; GVBD: Germinal Vesicle Breakdown

(Suwa et Yamashita, 2007).

Ainsi, des évènements biochimiques régulent la maturation méiotique des ovocytes (Maller, 2003 ; Karaïskou *et al.*, 2001). Ces évènements se traduisent par une voie de signalisation conduisant à l'activation du MPF (M-phase Promoting Factor) qui correspond au complexe Cdk1/Cycline B, inducteur d'entrée en phase M, aussi bien mitotique que méiotique, de toutes les cellules eucaryotes. L'activité du MPF (Maturation Promoting Factor) est essentielle à la reprise de la méiose I et donc à l'entrée en phase de maturation méiotique.

L'inducteur physiologique de la maturation méiotique de l'ovocyte de Xénope est la progestérone, qui induit une ou plusieurs voies de signalisation conduisant à l'activation du MPF et permettant la reprise de la méiose (Maller, 2003 ; Karaïskou *et al.*, 2001).

Egalement, Masui et Markert (1971) et Sheng *et al.*, (2001), ont démontré que la progestérone pourrait induire l'activité de MPF dans les ovocytes, et ils ont ainsi établi la nature extranucléaire de la voie de signalisation de la progestérone dans les ovocytes de *Xenopus*.

La maturation ovocytaire est induite par des actions séquentielles de trois principales substances: l'hormone gonadotrope (GTH) sécrétée par l'hypophyse, l'hormone induisant la maturation (MIH) synthétisée et sécrétée par les cellules folliculaires entourant les ovocytes, et le facteur promoteur de la maturation (MPF) produit et activé dans le cytoplasme ovocytaire (Yamashita, 2000).

Chez les mammifères, existent deux hormones gonadotropiques GTHs (LH et FSH). Chez les poissons, GTH comprend deux types (GTH I et GTH II). GTH I est responsable de la croissance ovocytaire, par contre GTH II est responsable de la maturation ovocytaire, stimulant les cellules folliculaires pour la synthèse et la sécrétion de MIH qui représente un



stéroïde qui interagit avec les récepteurs membranaires situés sur la surface ovocytaire (Suwa et Yamashita, 2007).

#### II.4.4. Atrésie folliculaire

La majorité des follicules est vouée à l'involution ou atrésie folliculaire (Gordon, 1994). L'atrésie se définit comme étant la régression du follicule jusqu'à sa disparition dans le stroma ovarien (Thibault et Levasseur, 2001). L'atrésie folliculaire est le processus normal qui permet d'éliminer les cellules inutiles, qui ne se sont pas développées correctement et/ou qui sont endommagées (Guthrie *et al.*, 1995). Pour définir l'atrésie folliculaire, deux types de critères sont généralement utilisés, soit les critères morphologiques tels la taille du follicule, le nombre et l'aspect des cellules de la granulosa, le nombre de pycnoses, soit des critères fonctionnels telle la production d'œstrogène, androgène et de progestérone, liaison de LH et FSH sur les récepteurs. Le mécanisme le plus probable par lequel l'atrésie opère est l'apoptose (Hirshfield, 1991; Tilly, 1996).

Le premier signe observable d'atrésie se manifeste tout d'abord dans les cellules de la granulosa. Dans les granulosae, l'apoptose est associée à une diminution de la différenciation cellulaire ainsi qu'à une baisse de production d'œstradiol et d'inhibine. Les granulosae dégèrent et perdent ainsi leur activité aromatasase (aromatasase P450), pour finalement entrer en apoptose (Garrett et Guthrie, 1997). La perte de l'activité s'étend ensuite aux cellules de la thèque, diminuant ainsi leur production d'androgènes et d'œstradiol (Driancourt *et al.*, 1991; Maxson *et al.*, 1985). Au niveau stéroïdogénique, bien qu'un follicule atrésique comporte des niveaux moindres d'œstrogène qu'un follicule sain, il possède des niveaux beaucoup plus élevés de progestérone (Guthrie *et al.*, 1994). Quant à l'ovocyte, il n'est affecté que pendant les dernières étapes de l'atrésie folliculaire (Driancourt *et al.*, 1991).

L'atrésie folliculaire implique plusieurs événements importants tel un clivage internucléosomique de l'ADN par les endonucléases (Arends *et al.*, 1990), une condensation de la structure nucléaire, une diminution du contenu protéique et une réduction du volume cellulaire (Darzynkiewicz *et al.*, 1992; Desoize et Sen, 1992; Guthrie *et al.*, 1994). Plusieurs facteurs ont été démontrés comme étant anti-apoptiques tels le bFGF, le TGF $\alpha$ , l'EGF (Chun *et al.*, 1994; Tilly *et al.*, 1992; Tilly et Hsueh, 1993), ainsi que les gonadotrophines FSH et LH (Chun *et al.*, 1996; Tilly et Tilly, 1995).

## II.5. Régulation hormonale de la reproduction chez les Amphibiens

Le système endocrinien des amphibiens, comme chez les autres vertébrés, se compose d'une série de glandes endocrines.

Les glandes endocrines sont définies en tant que glandes sans canal de sécrétion interne, ce qui signifie qu'elles libèrent leur produit de sécrétion dans le sang et non dans des conduits qui mènent à des surfaces internes ou externes de l'organisme (Norris et Lopez, 2005).

L'activité reproductrice des amphibiens anoures est synchronisée et adaptée fondamentalement aux conditions environnementales, les plus importantes sont la température, les photopériodes, l'humidité et les approvisionnements alimentaires (Fernandez et Ramos, 2003).

Différentes études montrent que l'activité reproductrice chez les anoures est contrôlée par des mécanismes endocriniens par l'intermédiaire de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique qui joue un rôle central dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques (Whittier et Crews, 1987). Toutefois, comme ces vertébrés sont extrêmement sensibles aux influences environnementales, la glande pinéale est également un important régulateur de l'activité reproductrice.

Chez les animaux présentant une reproduction saisonnière, la glande pinéale est considérée comme un transducteur neuroendocrinien de la photopériode et la température, et semble être impliqué dans la coordination du changement cyclique de la reproduction avec les saisons de l'année.

Le rôle des androgènes dans la reproduction des amphibiens mâles et la variation saisonnière dans les niveaux plasmatiques de la testostérone ont été analysés chez plusieurs espèces d'amphibiens (Specker et Moore, 1980; Licht *et al.*, 1983; Pierantoni *et al.*, 1984, 2002; Rastogi *et al.*, 1986; Delgado *et al.*, 1989; Itoh *et al.*, 1990; Guarino *et al.*, 1993; Kao *et al.*, 1993; Canosa et Ceballos, 2002; Canosa *et al.*, 2003). Dans bien des anoures, il a été signalé que les taux plasmatiques de testostérone étaient plus élevés en hiver et diminuent sensiblement au cours de la saison de reproduction lorsque se produit la spermatogenèse active (Rastogi *et al.*, 1976; Pierantoni *et al.*, 1984; Delgado *et al.*, 1989; Itoh *et al.*, 1990; Guarino *et al.*, 1993; Canosa et Ceballos, 2002).

Chez les Amphibiens, la testostérone (T) et la 5-dihydrotestostérone (DHT) ont été décrites comme les principales hormones androgènes sécrétées par les testicules.

Cependant, Kime et Hews (1978) ont constaté que les testicules de *Rana catesbeiana* produisent également 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\beta$ , 17,20 $\alpha$ -triol.

La concentration plasmatique des stéroïdes sexuels à travers le cycle de reproduction a été déterminée chez plusieurs espèces d'Amphibiens (Mendonca *et al.*, 1985; Woodley, 1994; Houck *et al.*, 1996; Houck et Woodley, 1996).

Chez les espèces telles que *Xenopus laevis* (Wetzel et Kelley, 1983), *Pachymedusa dacnicolor* (Rastogi *et al.*, 1986), *Rana catesbeiana* (Mendonca *et al.*, 1985), et *Taricha granulosa* (Specker et Moore, 1980), le comportement de reproduction semble être associé à des niveaux élevés d'androgènes plasmatiques. Toutefois, d'autres études n'ont pas déterminé de corrélation entre les androgènes et le comportement (Wada *et al.*, 1976; Moore, 1987). Une relation entre les androgènes et le développement des caractères sexuels secondaires a été clairement établi (D'Istria *et al.*, 1974; Rastogi *et al.*, 1976; Specker et Moore, 1980; Itoh *et al.*, 1990).

Chez plusieurs espèces, comme *Rana esculenta* (D'Istria *et al.*, 1974; Rastogi *et al.*, 1976), *Bufo japonicus* (Itoh *et al.*, 1990) et *Taricha granulosa* (Specker et Moore, 1980), le niveau le plus bas des androgènes est enregistré en été lorsque la spermatogenèse est maximale.

Il est connu que la spermiation des amphibiens est sous le contrôle hormonal et que l'injection d'extraits hypophysaires ou des gonadotropes stimule ce processus (Nagahama, 1986; Parvinen *et al.*, 1986; Pudney, 1998; Ishii et Itoh, 1992). La spermiation des amphibiens a été un facteur important pour une variété d'études comparatives. Par exemple, ce processus de spermiation a bénéficié d'une large attention dans l'étude de la spécificité zoologique parmi les gonadotropes des vertébrés et leur physiologie (Lofts, 1974; Licht, 1973). Chez le crapaud mâle *Bufo arenarum*, comme dans d'autres Amphibiens, la spermiation est le résultat d'une conséquence de l'accouplement pendant la saison de reproduction ou en réponse à une dose unique de l'hormone lutéinisante (LH) ou human chorionic gonadotropin (hCG) (Roseblit *et al.*, 2006).

Dans une étude précédente, Bramucci *et al* (1997) ont étudié le rôle de l'ACE et de l'ANG II dans la stéroïdogenèse ovarienne et la production de prostaglandines chez *Rana esculenta*. La production de 17 $\beta$ -œstradiol, de la progestérone, et de PGE<sub>2</sub> a été modulée par l'ACE ovarien, d'autre part, [Val5] ANG II a modulé la production de la progestérone et de PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , alors que la production d'androgènes n'a pas été influencée.

Ces études ont suggéré l'existence de deux voies, indépendamment régulées par l'ACE et l'ANG II, modulant la stéroïdogenèse ovarienne et la production des prostaglandines.

L'objectif de cette recherche était d'étudier le rôle de L'ACE (angiotensine- converting enzyme (ACE)) et de l'ANG II dans la stéroïdogénèse testiculaire de l'Amphibien *Rana esculenta* et dans la production des prostaglandines.

Le système de reproduction chez les animaux est contrôlé par l'axe gonado hypothalamo-hypophysaire, dans lequel des gonadotrophines (GTH), synthétisés et sécrétés par l'hypophyse, jouent un rôle important (Kano *et al.*, 2005).

Il est impossible de séparer l'appareil hypothalamo-hypophysaire de la fonction de reproduction puisque tout le fonctionnement gonadique est étroitement dépendant des hormones hypophysaires dont la synthèse et l'excrétion sont sous le contrôle de l'hypothalamus et d'un mécanisme de rétro-action, impliquant les sécrétions gonadiques elles mêmes. La figure n° 13 illustre schématiquement la régulation hormonale de la vitellogénèse et de la maturation ovocytaire (Van Gansen, 1986).

Les étroites relations fonctionnelles qui existent entre l'hypothalamus et l'hypophyse ont une base morphologique (Dubois, 1991). Ces relations morphologiques et fonctionnelles sont déjà visibles au cours de l'ontogénèse.

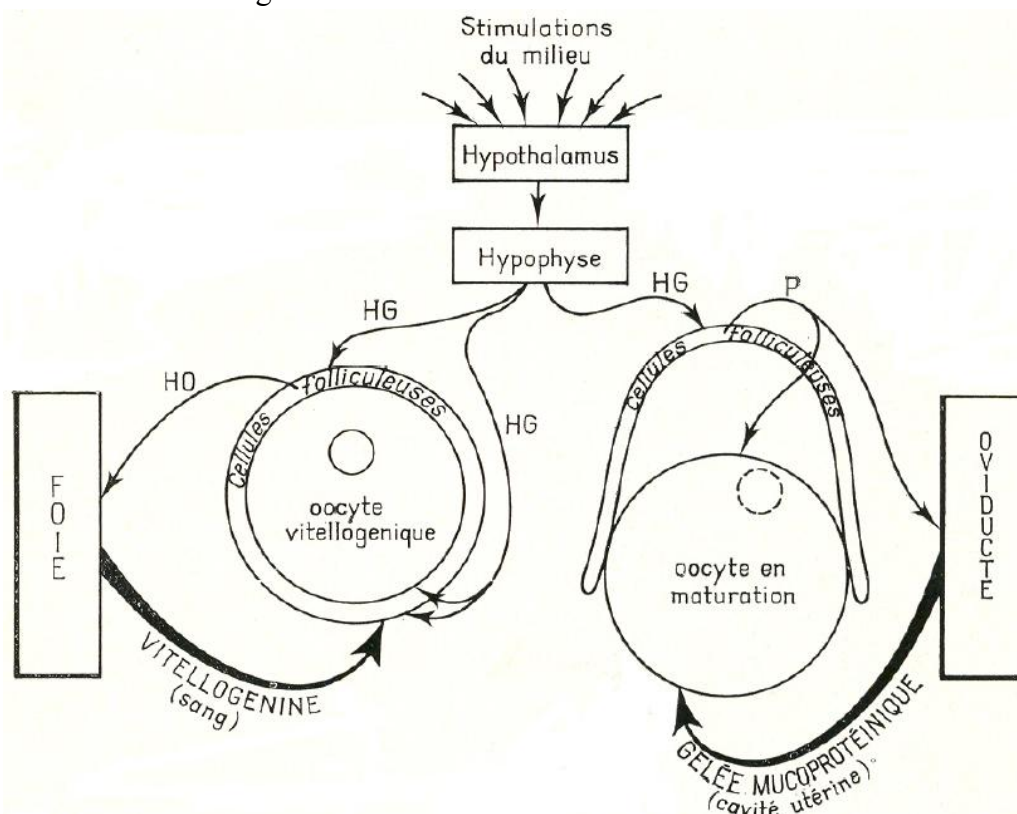


Figure 13 : Représentation schématique de la régulation hormonale de la vitellogénèse et de la maturation de l'ovocyte. HG: hormones gonadotropes; HO: hormones œstrogènes; P: progestérone (Van Gansen, 1986).

Les techniques morphologiques ne se limitent plus à l'étude de la structure des cellules ou des rapports existant entre les neurones hypothalamiques et les cellules antéhypophysaires, elles permettent d'avoir accès aux aspects fonctionnels puisqu'il est possible maintenant de mettre en évidence les facteurs intervenants dans la régulation des cellules antéhypophysaires ou des neurones eux-mêmes.

L'observation au microscope photonique de coupes colorées du lobe antérieur de l'hypophyse révèle la présence de plusieurs types cellulaires mais le microscope électronique confirme la richesse du lobe antérieur de l'hypophyse qui est une véritable mosaïque de différents types cellulaires. L'emploi des techniques immunocytologiques, a permis de confirmer l'existence de cinq types fonctionnels de cellules hypophysaires. Ce sont les cellules somatotropes, les corticotropes, les gonadotropes, les thyrotropes et les lactotropes.

Les gonadotropines jouent un rôle central dans la régulation de la fonction de reproduction chez le mâle et la femelle ; elles sont en effet les intermédiaires essentiels du système nerveux central sur les activités endocrines et gamétogénétiques (Combarous, 1991).

L'hypophyse est la principale glande endocrine contrôlant les processus physiologiques des vertébrés (Grandi et Chicca, 2004). Chez tous les vertébrés, l'hypophyse est constituée de deux types de tissus endocriniens, l'adénohypophyse et la neurohypophyse (Hazon et Balment, 1997 ; Miki *et al.*, 2005). Les hormones neurohypophysaires sont chez les poissons, comme chez les autres vertébrés, deux nonapeptides dont l'action est similaire à celle de l'ocytocine et de la vasopressine (Hazon et Balment, 1997).

La capacité fonctionnelle de l'ensemble de l'hypophyse dépend de son association nerveuse et vasculaire avec l'hypothalamus. Ces connexions sont responsables du contrôle des sécrétions hypophysaires en réponse à des stimuli externes et endogènes intégrés dans le cerveau (Frazzetta, 1975 ; Duellman et Trueb, 1986). L'adénohypophyse est soumise à régulation par les substances neurosécrétrices qui sont conduites par les fibres nerveuses du tractus hypothalamo-hypophysaire et les vaisseaux sanguins du système porte hypophysaire.

L'hypophyse est un lien important dans le système neuroendocrinien, même si toutes ces sécrétions sont contrôlées directement ou indirectement par le cerveau.

Chez les amphibiens, les rapports structuraux entre l'hypothalamus et l'hypophyse répondent au modèle typique des tétrapodes (Wingstrand, 1966). Des similitudes entre les amphibiens et d'autres tétrapodes peuvent donc être également prévues dans les relations fonctionnelles, qui ont été étudiées de manière approfondie chez certains mammifères.

L'hypophyse est étroitement liée à la surface ventrale du diencephale. La partie infundibulaire de la glande, la neurohypophyse, se compose de deux régions, la pars nervosa et l'éminence médiane (Figure 14).

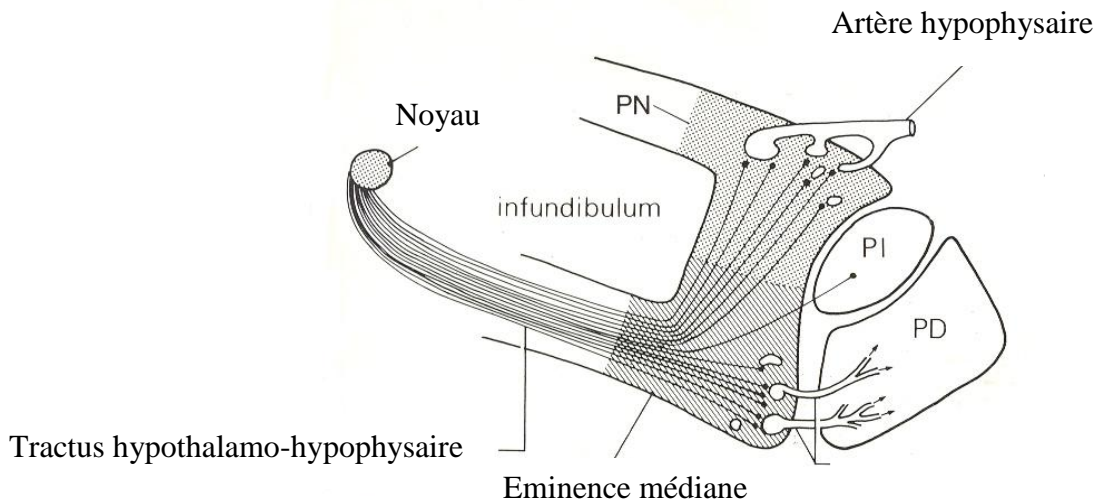


Figure 14 : Section sagittale de la région hypophysaire de la grenouille, *Rana temporaria*. PD : pars distalis, PI : pars intermedia, PN : pars nervosa.  
(Frazzetta, 1975 ; Duellman et Trueb, 1986).

L'hypophyse de *Bufo regularis* est située immédiatement au dessous du sillon médian de la formation proéminente de l'hypothalamus (Thireau et Marolle, 1968 ; Norris et Lopez, 2005). Elle est de forme ovoïde, semblable à celle des autres anoures. La *pars distalis* est irriguée de nombreux sinusoides qui se rejoignent pour former le système capillaire porte-hypophysaire. L'adénohypophyse se compose de trois régions : la *pars intermedia*, la *pars distalis* et la *pars tuberalis*, bilatérale. Cette dernière est absente chez certains Amphibiens (Frazzetta, 1975 ; Duellman et Trueb, 1986).

La *pars distalis* produit six hormones : la FSH, la LH, la prolactine, la TSH, l'ACTH et la GH. Deux hormones gonadotropiques, la FSH ou folliculo stimulating hormone et la LH ou hormone lutéinisante sont libérées cycliquement en réponse à un stimulus externe sous la médiation du cerveau. La prolactine possède plusieurs types d'effets tels que la prolifération des mélanophores et la stimulation de la croissance larvaire (Bern et Nicoll, 1969 ; Frazzetta, 1975 ; Duellman et Trueb, 1986). La thyrotropine (TSH) stimule la sécrétion de la thyroxine, l'adrénocorticotropine (ACTH) agit sur les cellules corticales des glandes surrénales pour la production des stéroïdes adrénalines et la GH, entre autres, stimule la croissance.

Il existe un lien étroit entre la période du cycle sexuel et les niveaux de circulation de la FSH et de la LH. Les niveaux des gonadotropes, qui restent faibles au début de l'hibernation, commencent à augmenter progressivement au cours du dernier tiers de la période d'hibernation pour atteindre un pic juste avant l'ovulation (Polzonetti-Magni *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 1998). Selon Licht *et al.* (1983), Kim *et al.* (1998), ce pic montre une concentration de LH, quatre à six fois plus élevé que celui de la FSH. Le deuxième pic de FSH se produit au cours de l'été, au moment où les follicules ovariens se développent rapidement, parallèlement à l'augmentation de l'indice gonadosomatique. Bien que la majorité des données concernant le rôle des gonadotropes dans la reproduction des amphibiens ait été obtenue de manière indirecte, il est maintenant certain que les deux hormones sont impliquées dans le contrôle de la sécrétion des stéroïdes ovariens (Kwon et Ahn, 1994).

Une corrélation positive des sécrétions entre la FSH et l'oestradiol-17  $\beta$  (Polzonetti-Magni *et al.*, 1998) et entre la LH et la progestérone (Itoh et Ishii, 1990) a été rapportée. La stimulation gonadotrope de la stéroïdogenèse semble dépendre sur une augmentation de l'AMPC intracellulaire qui aurait pour conséquence l'activation des protéines.

Dans une récente étude faite par Kano *et al.*, (2005) ; Saito *et al.*, (2002), ont prouvé la présence de LH et de FSH chez le triton à ventre rouge, *Cynops pyrrhogaster*, en utilisant la technique de clonage de l'ADNc.

Les hormones gonadotropes des anoures sont des glycoprotéines composées de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$  (Pierce et Parsons, 1981). La sous-unité  $\alpha$ , identique dans les deux hormones, possède 97 résidus d'acides aminés. La sous-unité  $\alpha$  a environ 70% de séquence identique avec la sous-unité  $\alpha$  des mammifères (Hayashi *et al.*, 1992a ; Combarnous, 1991). La sous-unité  $\beta$ , qui est différente dans les deux hormones gonadotropes, leur confère leur activité spécifique. Chez la grenouille, par exemple, la sous-unité  $\beta$ FSH est composée de 107 résidus d'acides aminés avec une masse moléculaire de 11782 Da (Hayashi *et al.*, 1992), alors que la sous-unité  $\beta$  LH est composée de 112 résidus d'acides aminés avec une masse moléculaire de 12675 Da (Hayashi *et al.*, 1992b). La complexité des hormones glycoprotéiques trouve son origine non seulement dans leur nature glycoprotéiques mais également dans la grande complexité de leur portion polypeptidique.

## II.6. Les organes de reproduction des Amphibiens

Le développement et la structure des gonades ont été décrits dans ce qui précède. Bien que les gonades soient principalement les organes reproducteurs, elles produisent et secrètent des hormones qui sont importantes dans le contrôle endogène des cycles de reproductions et le développement des caractères sexuels secondaires.

Les Amphibiens affichent des cycles saisonniers de reproduction. Le développement des gonades est affecté par la température ambiante (Lofts, 1974; Rastogi *et al.*, 1987; Tanaka et Takikawa, 1984). Ainsi, pour une compréhension du fonctionnement des mécanismes de la reproduction chez les Amphibiens, il est important de prendre en considération la saison de reproduction.

La GnRH (Growth hormone-releasing hormone), initialement isolée de l'hypothalamus des mammifères, représente une neurohormone-clé dans la reproduction de tous les groupes de vertébrés. Cette hormone décapeptide a été caractérisée comme le régulateur central du système reproducteur, sa fonction la plus importante étant la libération des hormones gonadotropes de l'hypophyse antérieure (Canosa *et al.*, 2002).

L'activité endocrinienne des gonades est contrôlée par les gonadotropes hypophysaires. L'hormone lutéinisante influence la production des hormones androgènes mâles, notamment la testostérone, dans les cellules interstitielles des testicules. La testostérone facilite la spermatogenèse et promeut le développement des caractères sexuels secondaires tels que les excroissances nuptiales des pouces des mâles. Les follicules ovariens produisent des œstrogènes qui favorisent la prolifération dans l'ovaire de l'épithélium germinale et la formation des follicules primaires, mais la maturation des follicules dépend de la FSH hypophysaire. Chez l'Anoure vivipare *Nectophrynoides occidentalis*, la progestérone est sécrétée par le corps jaune. Les hormones produites par les glandes endocrines, leurs zones cibles et leurs actions sont résumées dans le tableau n° 5.



Tableau n°5 : Les glandes endocrines, leurs organes cibles et leurs actions (Frazzetta, 1975)

Glandes/ Hormones	Organes cibles	Actions
<p>Hypophyse : Pars distalis</p> <p>Follicule stimulating hormone (FSH)</p> <p>Hormone lutéinisante (LH)</p> <p>Prolactine</p>	<p>Epithélium germinal</p> <p>Tissu interstitiel du testicule</p> <p>Oviducte inférieur</p> <p>Tégument</p> <p>Tégument</p> <p>Tissus de la queue et des branchies</p>	<p>Stimule la maturation des follicules ovariens</p> <p>Stimule la production de la testostérone</p> <p>Production de la gelée tubaire</p> <p>Changements glandulaires</p> <p>Prolifération des mélanosomes</p> <p>Croissance</p>
<p>Hypophyse : Pars intermedia</p> <p>Melanophore stimulating hormone (MSH)</p>	<p>Tégument</p>	<p>Change de couleur</p>
<p>Hypophyse: Pars nervosa</p> <p>Antidiurétique hormone (ADH)</p> <p>Arginine vasotocin</p>	<p>Reins</p> <p>Peau, reins, vessie</p>	<p>Concentration de l'urine</p> <p>Augmentation de la perméabilité à l'eau et aux sels</p>
<p>Gonades : testicules</p> <p>Testostérone</p>	<p>Epithélium germinal</p> <p>Tégument</p>	<p>Favorise la spermatogenèse</p> <p>Développement des caractères sexuels secondaires</p>
<p>Gonades : ovaires</p> <p>Œstrogènes</p> <p>Progestérone</p>	<p>Epithélium germinal</p> <p>Cellules folliculeuses ovariennes</p>	<p>Formation des follicules primaires</p> <p>Déclencher la maturation des ovules postvitellogéniques</p>

## *Chapitre III : Matériel et méthodes*

Le travail a porté sur *Bufo mauritanicus* et sur quelques exemplaires d'ovaires de *Bufo regularis* prélevés de la collection du laboratoire de biologie générale de l'université catholique de Lyon, afin de comparer l'évolution du cycle ovogénétique de ces deux espèces africaine.

Comme il a été décrit dans l'introduction, le but de notre travail est d'étudier les différents aspects de la reproduction du Crapaud de Maurétanie, *Bufo mauritanicus* Schlegel, 1841 en mettant l'accent sur les cycles spermatogénétique et ovogénétique de cette espèce.

### **III.1. Matériel biologique**

Le matériel biologique étudié concerne une population de *Bufo mauritanicus* composée de 39 individus répartis en 12 mâles et 27 femelles. Le nombre d'individus laisse apparaître que le taux de capture des femelles de *Bufo mauritanicus* est plus élevé à celui des mâles soit 69,23% pour les femelles et 30,77% pour les mâles.

Ce matériel a été obtenu à partir de captures répétées et aléatoires durant les années 2003 et 2004 dans la zone humide de Beni-Belaïd (Jijel, Algérie).

Les captures moyennes sont faites à raison d'un individu mâle par mois et de deux individus femelles par mois durant l'année 2003-2004. En effet, les mâles de l'espèce prélevée du terrain sont répartis en moyenne d'un seul individu par mois. On note une exception pour les mois de juin et d'octobre où on enregistre respectivement deux individus capturés. L'échantillonnage des mois de mars et de mai est considéré nul.

Les animaux d'activité nocturne ont été capturés difficilement à la main car particulièrement discrète. Les individus adultes, mâles et femelles ont été ramassés, de juin 2003 à mai 2004 justifiant ainsi un cycle annuel de reproduction.

### **III.2. Méthodes utilisées**

#### **III.2.1. Caractéristiques biométriques liées au sexe**

##### III.2.1.1. Données biométriques concernant les mâles

Pour cela, plusieurs paramètres ont été pris en considération afin de caractériser les individus mâles du crapaud de Maurétanie. On note parmi ces paramètres, la longueur du corps (cm), la masse du corps (g), la densité de l'animal :  $1000 \times \text{masse du corps (g)} / \text{longueur du corps}$

(cm), la masse du testicule gauche (mg), le rapport gonado-somatique : 2 x masse du testicule gauche (g) / masse du corps (g).

### III.2.1.2. Données biométriques concernant les femelles

Les mêmes paramètres utilisés pour les mâles ont été appréciés pour caractériser les individus femelles. Ce sont la longueur du corps (cm), la masse du corps (g), la densité de l'animal : 1000 x masse corps (g) / longueur du corps (cm), la masse des ovaires (g), le rapport gonado-somatique : 2 x masse de l'ovaire gauche (g) / masse du corps (g).

Dans les deux cas nous avons jugé utile de regrouper les individus mâles et femelles de cette espèce par classe de saison sèche et humide, ces deux saisons qualifiant la zone d'étude, et nous avons examiné quelle était la variabilité individuelle pour chaque paramètre, en comparant les différentes données disponibles par rapport à l'influence du facteur climatique.

### III.2.1.3. Dimorphisme sexuel

Pujol et Exbrayat (2002) ont comparé les données biométriques des mâles à celles des femelles d'une espèce voisine de *Bufo mauritanicus*, *Bufo regularis* Reuss (1834) originaire de la côte togolaise plus précisément de Lomé.

L'indice de dimorphisme lié à la masse du corps est donc évalué suivant la formule :

$$\text{Indice de dimorphisme} = \frac{\text{Masse moyenne du mâle}}{\text{Masse moyenne de la femelle}} \times 100$$

## III.2.2. Méthodes histologiques

### III.2.2.1. Microscopie photonique

#### III.2.2.1.1. Fixation, inclusion et coupes

Après avoir été pesés et mesurés entre le museau et la pointe de l'urostyle, les individus des deux sexes ont été immédiatement fixés pendant plusieurs mois dans le formaldéhyde à 10%. Disséquées, les gonades mâles et femelles gauches ont été pesés à leur tour et conservées dans l'éthanol à 70% (Figure 15). Après leur fixation, ces différentes gonades ont subi une déshydratation par passage du tissu dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes, suivis d'un bain de butanol. Elles ont ensuite été incluses dans la paraffine pour être coupés

transversalement en section de 7 $\mu$ m d'épaisseur à l'aide d'un microtome de Minot, puis les coupes ont été collées à l'albumine glycinée pour l'étude histologique et sur des lames superfrost pour une étude immunohistochimique.

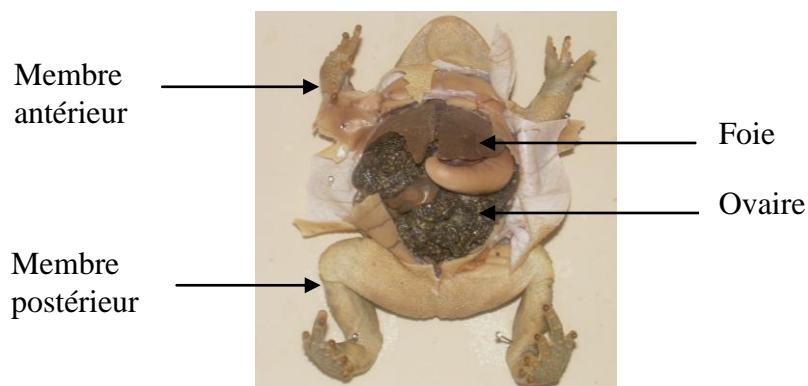


Figure 15 : Dissection de *Bufo mauritanicus* femelle (face ventrale).

#### III.2.2.1.2. Les colorations classiques

Pour un suivi histologique approprié, les coupes ainsi obtenues sur testicules, ovaires et oviductes ont été colorées par le trichrome de Masson-Goldner et l'azan de Romeis modifié (Exbrayat, 2000). Les glandes pituitaires étudiées ont été colorées au trichrome de Cleveland et Wolfe.

##### - Trichrome de Masson-Goldner

Le trichrome de Masson est une coloration qui permet de mettre en évidence les structures tissulaires. Le colorant nucléaire peut être l'hémalum de Masson ou diverses hématoxylines. Le colorant cytoplasmique est une fuchsine. Un colorant à base d'aniline permet de différencier les fibres de collagène. Il est à noter que cette technique a donné naissance à de nombreuses variantes, dont le trichrome de Masson-Goldner. Le principe est le même que celui du trichrome de Masson. Le colorant nucléaire employé est alors l'hématoxyline de Groat qui donne des meilleurs résultats.

##### Réactifs

- Hématoxyline de Groat ; fuchsineponceau ; orange G molybdique ; vert lumière acétique.
- Eau acétique à 1%.

### Mode opératoire

- Déparaffiner, hydrater.
- Hématoxyline de Groat : 5 min
- Eau courante jusqu'au virage au bleu
- Fuchsine ponceau : 5 min
- Eau acétique : rinçage
- Orange G - molybdique : passage
- Eau acétique : rinçage
- Vert lumière acétique : 10 min
- Eau acétique : rinçage
- Déshydrater - monter.

N.B. - Il est nécessaire de changer les eaux acétiques après le passage de chaque panier. L'hématoxyline de Groat est à employer exclusivement.

### Résultats

Les noyaux sont noirs, le réticulum endoplasmique gris, les cytoplasmes acidophiles et les nucléoles roses, les sécrétions sont rouges ou verts. Les muscles sont rouges, les fibres de collagène vertes.

#### **- Trichrome de Cleveland et Wolfe**

La technique de Cleveland et Wolfe est utilisée pour distinguer, sur coupes, les différents types cellulaires de l'adénohypophyse, caractérisés par leurs qualités tinctoriales.

### Réactifs

- Erythrosine à 1% ; orange G à 2% dans acide phosphotungstique à 1% ; bleu d'aniline à 1%.

### Mode opératoire

- Déparaffiner, hydrater
- Erythrosine : 3 min
- Eau distillée : rincer
- Orange G phosphotungstique : 30 s
- Eau distillée : rincer
- Bleu d'aniline : 1 à 2 min
- Eau distillée : rincer

- Déshydrater, monter

### Résultats

Les cellules somatotropes sont roses, les thyrotropes violets, les corticotropes violet pâle, les lactotropes orangé et les gonadotropes ont un fond bleu avec granulations roses.

#### **- Azan modifié**

Ce sont des colorations en rouge nucléaire qui permettent une mise en évidence fine de nombreuses structures histologiques.

Il faut éviter de colorer ensemble des coupes de tissus différent.

### Mode opératoire

- Déparaffiner, hydrater.
- Rouge nucléaire : 15 min
- Rincer à l'eau.
- Orange G molybdique : 5 min
- Rincer à l'eau
- Bleu d'aniline : 2 à 5 min
- Laver à l'eau distillée (elle élimine du bleu).
- Ethanol à 95°
- Déshydrater.
- Monter.

### Résultats

Les noyaux et certains cytoplasmes sont rouges, d'autres cytoplasmes sont jaunes ou gris. Le collagène est bleu. Les sécrétions peuvent être de différentes couleurs selon leur nature. Les mucopolysaccharides acides sont bleus.

#### III.2.2.1.3. Colorations histochimiques

Pour caractériser les composés chimiques présents dans les tissus par des détections histochimiques, certains organes ont été également débités en coupes à congélation épaisses d'environ 14 µm et colorés au Noir Soudan pour la mise en évidence des lipides au niveau

ovarien et testiculaire. Des colorations à l'APS et au Bleu alcian-APS ont été appliquées à des coupes à la paraffine de 7 µm d'épaisseur pour la détection des mucopolysaccharides.

- **Méthode à l'APS** (Acide périodique, Schiff.) - Hématoxyline - Orange G molybdique

La méthode consiste à oxyder par l'acide périodique les glucides qui libèrent alors un groupement aldéhyde (CHO). Ces groupements ont la propriété de se combiner avec le réactif de Schiff qui prend alors une teinte rouge vif.

Fixateurs

Il faut tenir compte, dans certains cas, du pouvoir oxydant du fixateur. Pour les mucopolysaccharides, les fixateurs courants conviennent.

Mode opératoire

- Déparaffiner, hydrater
- Acide périodique : 10 min
- Eau courante : 10 min.
- Réactif de Schiff : 10 min
- Eau courante : 10 min
- Hématoxyline de Groat : 5 min
- Eau courante : 5 min
- Orange G - molybdique : 2 min
- Laver
- Déshydrater, monter

Résultats

Les composés A P S positifs sont rouges, les noyaux brun-bleus, les cytoplasmes acidophiles jaunes et le collagène violet.

- **Bleu alcian-APS**

Cette coloration permet de mettre en évidence les mucopolysaccharides simples et acides. Les colorants de la famille du bleu alcian sont des colorants basiques. Leur sélectivité est accrue par abaissement du pH. L'APS met en évidence l'ensemble des protéoglycannes.

Fixateurs

Tous les fixateurs usuels conviennent.



### Réactifs

- Bleu alcian à pH 2,5 ; réactif de Schiff ; hématoxyline de Groat ; orange G molybdique.
- Acide périodique à 1 %

### Mode opératoire

- Déparaffiner, hydrater
- Bleu alcian : 20 min
- Laver à l'eau courante
- Acide périodique : 10 min
- Eau courante : 10 min
- Réactif de Schiff : 10 min
- Eau courante : 10 min
- Hématoxyline de Groat : 5 min
- Eau courante : 5 min
- Orange G - molybdique : 2 min
- Laver
- Déshydrater, monter.

### Résultats

Les mucopolysaccharides sont colorés du rouge au bleu, en passant par toute une gamme de violets; les noyaux sont brun-bleus, les cytoplasmes acidophiles jaunes, le collagène violet.

#### - **Noir Soudan**

Les colorants de la famille des Soudan sont des substances lysochromes qui se dissolvent dans les lipides et peuvent ainsi les colorer.

### Fixateurs

Matériel post-chromisé ou coupes à congélation.

### Réactifs

- Noir Soudan B ; rouge nucléaire.

### Mode opératoire

- Déparaffiner (coupes post-chromisées)
- Ethanol à 70° (coupes à congélation et coupes déparaffinées) : 1 min
- Noir Soudan : 20 à 60 min (flacon bouché)
- Ethanol à 70° : 1 min
- Eau : rincer
- Rouge nucléaire : 30 s
- Eau : rincer
- Monter en milieu aqueux (sirop de Kaiser).

### Résultats

Les lipides sont colorés en noir, les noyaux sont rouges.

#### III.2.2.2. Techniques morphométriques

Tous les animaux sont pesés puis mesurés entre l'extrémité du museau et la pointe de l'urostyle.

Les variations annuelles de l'état de la gamétogenèse le long des différents mois de l'année 2003-2004 ont été réalisées grâce à une étude quantitative. Cette technique de comptage histologique effectuée en microscopie photonique couplée à un analyseur d'image (Nikon éclipse E400) a permis d'établir un échantillonnage rigoureux et représentatif des lignées spermatique et ovogénétique permettant ensuite de définir la nature du cycle sexuel.

##### III.2.2.2.1. Techniques propres aux femelles

Après dissection, l'ovaire gauche, dont l'aspect et la couleur ont été pris en considération, a été prélevé. L'ovaire a donc été pesé puis conservé dans l'éthanol 70° (Figure 16). L'oviducte gauche a également été prélevé, pesé et conservé pour examen histochimique.



Figure 16 : Représentation après dissection de l'ovaire de *Bufo mauritanicus*.  
(échantillon du 23.06.03)

Pour l'examen histomorphométrique, comme pour les testicules, les gonades femelles, après leur fixation, leur déshydratation par passage dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes ont été immergés dans des bains de butanol pur. Les ovaires ont ensuite été inclus en paraffine, puis coupés au microtome de Minot à 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les coupes d'ovaires ont ensuite été colorées à l'azan de Roméis modifié puis observées au microscope photonique couplée à un analyseur d'image (Nikon éclipse E400).

#### III.2.2.2.2. Techniques propres aux mâles

Après avoir noté éventuellement la symétrie entre les deux gonades mâles, le testicule gauche est disséqué sous loupe binoculaire, permettant ainsi de repérer le sens de coupe au cours du montage histologique, puis il a été pesé (Figure 17).

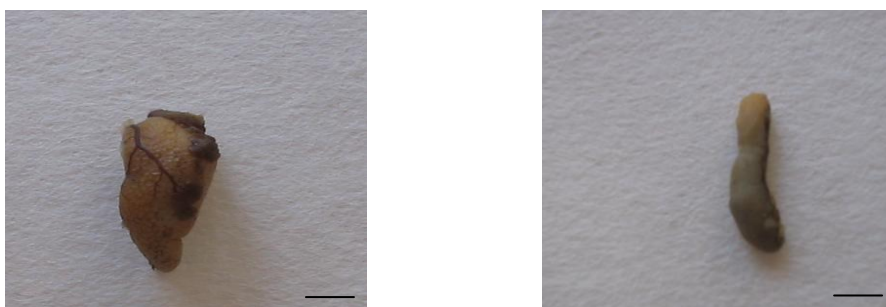


Figure 17 : Représentation après dissection des gonades mâles de *Bufo mauritanicus*.

Les testicules gauches des différents individus étudiés ont été coupés transversalement en sections de 5 à 7µm d'épaisseur dans le sens postéro antérieur. Les coupes ont été colorées par l'azan de Roméis modifié (Exbrayat, 2000).

Les différentes étapes de la lignée spermatogénétique des Anoures ont été décrites par de nombreux auteurs (Witschi, 1924 ; Van Oordt, 1956 ; Basu, 1968).

Dans cette étude, nous essayerons d'appliquer la classification adoptée par Gueydan-Baconnier (1980) et Pujol (1985) pour l'étude des différentes catégories cellulaires spermatogénétiques suivantes :

- spermatogonies primaires situées contre la paroi des tubes séminifères,
- spermatogonies secondaires de plus petite taille groupées en cystes et issues des divisions successives des spermatogonies primaires,
- spermatocytes primaires subissant la méiose dont les étapes sont souvent reconnaissables,
- spermatocytes secondaires issus des spermatocytes primaires. Ces cellules sont de taille beaucoup plus petite,
- spermatides se présentent comme de petits noyaux très foncés aux formes d'abord arrondies puis allongées en fonction de leur évolution,
- spermatozoïdes d'abord ancrés dans les cellules de sertoli en un faisceau très dense, puis libres dans la lumière des tubes séminifères et dans les canaux évacuateurs.

Une étude quantitative en microscopie optique a été entreprise afin de suivre l'évolution spermatogénétique au cours du cycle annuel de reproduction en prenant en considération les variations climatiques.

#### III.2.2.2.3. Etude quantitative par numération ponctuelle

Au microscope photonique, une étude détaillée a été entreprise afin d'établir un échantillonnage représentatif qui sera utilisé pour l'étude du cycle sexuel.

Une évaluation du pourcentage du volume de testicule occupé par chaque catégorie cellulaire a été obtenue en appliquant la technique des numérations ponctuelles assurée à l'aide du micromètre intégrateur de Zeiss (Solari, 1973). Cette méthode d'analyse quantitative a été mise au point et employé pour la caractérisation du cycle spermatogénétique des poissons téléostéens (Solari, 1973; Billard *et al.*, 1974) et appliquée chez différents amphibiens anoures (Delsol *et al.*, 1980). La méthode des numérations ponctuelles permet de mettre en évidence le cycle de reproduction des mâles de l'espèce au cours de l'année.

Les types cellulaires pris en considération sont les mêmes que ceux employés dans l'étude de *Phrynobatrachus calcaratus* et de *Bufo regularis* respectivement par Gueydan-Baconnier (1980) et Pujol (1985).

L'étude quantitative a donc porté sur les testicules gauches de douze individus.

Certains paramètres propres aux gonades mâles et à la lignée spermatogénétique ont été pris en considération à savoir entre autres :

\* le nombre moyen de faisceaux de spermatozoïdes par tube (a) obtenu après avoir calculé:

- le nombre moyen de faisceaux de spermatozoïdes par coupe de testicule (b),
- et le nombre moyen de tubes séminifères (c).

donc :  $a = b / c$

\* Après avoir vérifié si les coupes de testicules étudiées comportaient toujours le même nombre moyen de tubes séminifères, les variations du nombre moyen de faisceaux de spermatozoïdes par unité de surface de coupe de testicules ont été recherchées.

La surface testiculaire appréciée à partir de la surface moyenne des coupes transversales a également été prise en compte. Ceci se justifie par le fait que chez les batraciens, le testicule présente des variations cycliques importantes. Certains auteurs admettent qu'une augmentation de l'activité spermatogénétique entraîne une augmentation du poids et du volume des gonades et que la taille maximale de ces caractères est atteinte à la veille de la reproduction pour décroître ensuite très rapidement tel est le cas chez *Rana temporaria* (Van Sonderen, 1958). Les surfaces de coupes prises en considération sont assimilées à des ellipses et calculées selon la formule :

$$S (\text{mm}^2) = \frac{\pi \times L \times l}{4} \quad \text{avec : } \pi \text{ égale à } 3,14$$

L définit la longueur de la coupe testiculaire

l définit la largeur de la coupe testiculaire

Pour les femelles, les méthodes de mesure et de comptage ont été choisies de telle sorte que sur chaque coupe histologique, les ovocytes et follicules sont comptés pour déterminer et évaluer la proportion relative de chaque stade.

En ce qui concerne la dynamique d'évolution de la lignée ovogénétique de *Bufo mauritanicus*, nous avons donné une importance particulière à la reconnaissance des différents stades ovocytaires durant la folliculogénèse en fonction du cycle annuel de reproduction. Seuls les ovocytes et follicules sectionnés au niveau du noyau ovocytaire ont été pris en considération. Pour un stade de développement donné, en fonction du matériel biologique disponible, les diamètres d'une série de follicules et de noyaux ovocytaires ont été mesurés.

« L'ovogenèse est un processus continu chez les Amphibiens, depuis la métamorphose jusqu'à la mort de l'animal » (Van Gansen, 1986). Cependant l'activité ovarienne est généralement cyclique chez les Amphibiens. En effet, différents stades distincts par la morphologie, la taille des follicules, des noyaux ovocytaires, la disposition nucléolaire et la structure des différentes membranes périphériques de l'ovocyte ont été mis en évidence avant et après la vitellogenèse.

### **III.2.3. Méthodes immunohistochimiques**

L'immunohistochimie est une technique qui combine l'immunologie et l'histochimie dont le but est de mettre en évidence sur une coupe histologique une molécule grâce à ses propriétés antigéniques. La méthode d'immunocytochimie est basée sur la liaison Ag-Ac1 qui permet d'identifier une molécule tissulaire considérée comme Ag. Cette technique repose sur l'usage d'un anticorps primaire spécifique dirigé contre la molécule à étudier.

Pour localiser cette liaison, la technique choisie a été celle de l'immunohistologie indirecte par amplification nécessitant un anticorps secondaire biotinylé, un complexe streptavidine-peroxydase, du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Et un chromogène permettant de visualiser sur les coupes les sites de fixation de l'anticorps primaire.

Dans la technique indirecte qui a été choisie, un anticorps secondaire reconnaît l'espèce dans laquelle l'anticorps primaire a été produit. Il est couplé à de la biotine (il s'agit d'un anticorps biotinylé). Il est ensuite fixé à un complexe Streptavidine-peroxydase qui a une forte affinité pour la biotine. La peroxydase réagit ensuite avec un substrat, le peroxyde d'hydrogène provoquant sa désoxygénation. L'oxygène ainsi libéré réagit avec un chromogène amino éthyl carbazole (AEC) et le produit obtenu développe un précipité rouge au niveau tissulaire (Figure 18). Les coupes sont ensuite montées en résine hydrosoluble ou en « crystal mount » car le produit coloré obtenu ne supporte pas la déshydratation.

Pour ce travail, ont été utilisés un kit de révélation Vector (Dako) contenant l'anticorps secondaire, la streptavidine et l'AEC, et des anti-corps primaires (anti-testostérone(Biomed), anti-oestradiol (Chemicon AB924), anti-LH, anti-FSH issus du lapin et l'anti-prolactine monoclonal issu de souris).

Sur le plan fonctionnel, la recherche d'hormones stéroïdes au cours du développement sexuel femelle de *Bufo mauritanicus* s'avère indispensable pour déceler l'étroite relation entre les centres de régulation supérieurs de la reproduction en fonction de l'activité stéroïdogène de l'ovaire. Plusieurs dilutions de l'anticorps primaire ont été réalisées et le marquage optimal a été recherché en respectant les données inscrites sur le protocole approprié à la méthode immunohistochimique par amplification à la streptavidine-biotine et révélation à l'aide de la peroxydase (annexe 1).

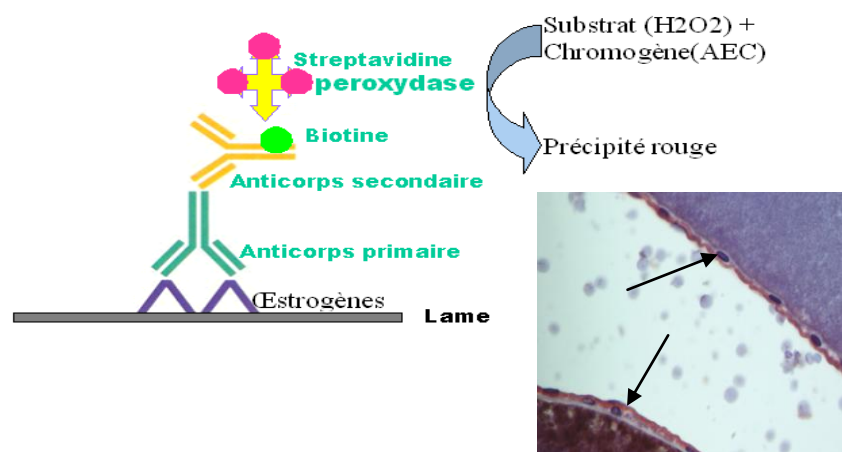


Figure 18 : Principe de la technique d'immunohistochimie par amplification.

Protocole d'immunohistochimie par amplification avec le kit Vector.

Les coupes sont déparaffinées et hydratées par passage dans différents bains :

- Cyclohexane 2 x 15 min
- Ethanol 100% 5 min
- Ethanol 95% 5 min
- Ethanol 70% 5 min
- H<sub>2</sub>O distillée 2 min
- Rincer au PBS 2 min

Enlever l'excès de PBS au moyen d'un papier absorbant

Entourer les coupes d'une résine hydrophobe (DAKO-pen)

Incuber 30 min dans le mélange PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,3%

Rincer 5 minutes au PBS

Appliquer le sérum normal de dilué et incuber 20 minutes à température ambiante

Rincer au PBS 5 min

Appliquer l'anticorps primaire : une heure à température ambiante

Rincer au PBS 5 min

Appliquer l'anticorps secondaire biotinylé dilué pendant 30 minutes à température ambiante

Rincer au PBS 5 min

Ajout ABC Reagent pendant 30 minutes à température ambiante

Rincer au PBS 5 min

Ajouter le substrat chromogène (AEC) à température ambiante

Rincer à l'eau du robinet

Rincer à l'eau distillée

Contre colorer à l'hématoxyline : 01 minute à température ambiante

Rincer à l'eau courante

Rincer à l'eau distillée

Monter au Crystal mount (Biomeda)

Laisser polymériser une heure à 60° C

Observation au microscope photonique

### **III.2.4. Méthodes statistiques**

III.2.4.1. Analyse de la variance appliquée aux différents paramètres propres aux gonades mâles

L'analyse de la variance permet de dire s'il existe une différence significative entre les valeurs de deux ou plusieurs séries de données. La variance d'une série statistique ou d'une distribution de fréquences est la moyenne arithmétique des carrés des écarts par rapport à la moyenne (Dagnélie, 1975).

Les paramètres propres aux gonades mâles et à la lignée spermatogénétique pris en considération pour élucider le cycle de reproduction annuel de *Bufo mauritanicus* sont le nombre moyen de faisceaux de spermatozoïdes par tube séminifère et la surface testiculaire.

Le test ANOVA est donc appliqué en utilisant le logiciel Statistica version 5.1.



## *Chapitre IV : Résultats et discussions*

## IV.1. Etude Biométrique des paramètres sexuels

Avant d'étudier de manière approfondie les cycles mâle et femelle de cette espèce, il s'est avéré indispensable de réaliser une étude biométrique de certaines caractéristiques liées au sexe.

Nous avons classé les différents individus mâles et femelles en fonction de leur longueur et de leur masse pour apprécier les effets des saisons sur les variations pondérales.

### IV.1.1. Données biométriques chez les mâles

Les paramètres dont il a été tenu compte ont été la longueur du corps (cm), mesurée entre l'extrémité du museau et l'extrémité de l'urostyle, la masse du corps (g), la densité de l'animal :  $1000 \times \text{masse du corps (g)} / \text{longueur du corps (cm)}$ , la masse du testicule gauche (mg), le rapport gonado-somatique :  $2 \times \text{masse du testicule gauche (g)} / \text{masse du corps (g)}$ .

Le tableau n° 6 indique les variations corporelles linéaires et pondérales moyennes en fonction des classes établies à partir de l'ensemble de l'échantillonnage.

Tableau 6 : Variation moyenne du poids et de la longueur en fonction des classes de longueur chez les individus mâles de *Bufo mauritanicus*

Paramètres	N	Longueur (cm)	Poids du corps (g)
Classes de longueur			
[5 – 6,5]	2	5,55	13,85
[6,5 - 8]	4	7,14	39,37
[8 – 9,50]	5	8,45	63,10
[9,50 - 11]	1	10,20	116,50

Les mesures indiquent qu'il existe des variations importantes de la masse corporelle de l'animal. Notamment, l'individu de la classe 4 atteint une longueur maximale égale à 10,20 cm qui correspondrait un poids du corps maximal de 116,50 g (tableau 6, figures 19 et 20).

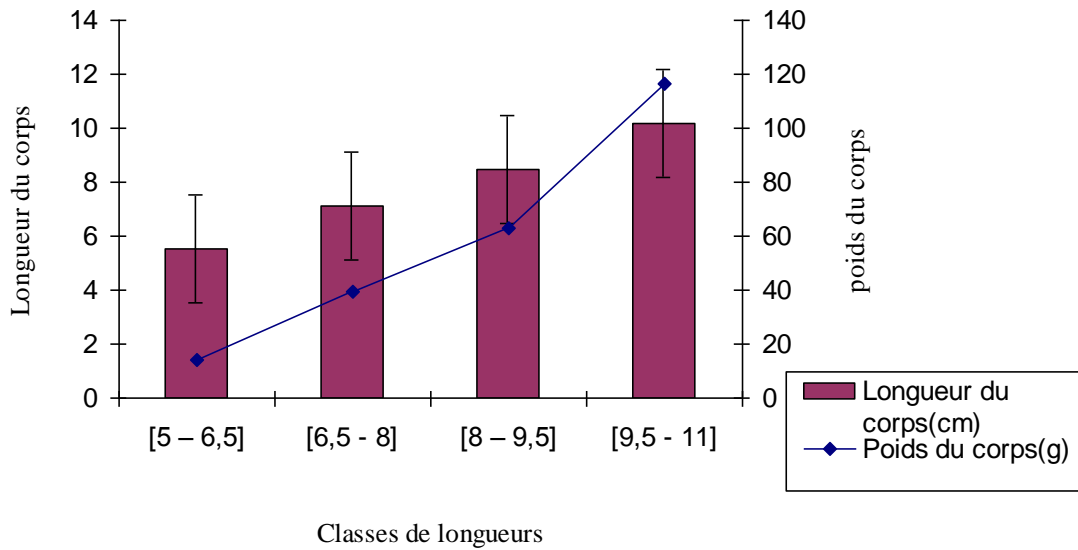


Figure 19 : Variation moyenne du poids et de la longueur du corps en fonction des classes de longueur répertoriées chez le mâle de *Bufo mauritanicus* Schlegel, 1841.

Les résultats portés sur les figures 19 et 20 montrent des variations importantes du poids corporel alors que la longueur du corps par classe ne varie pratiquement pas au cours des mois de prélèvement (Annexe 2).

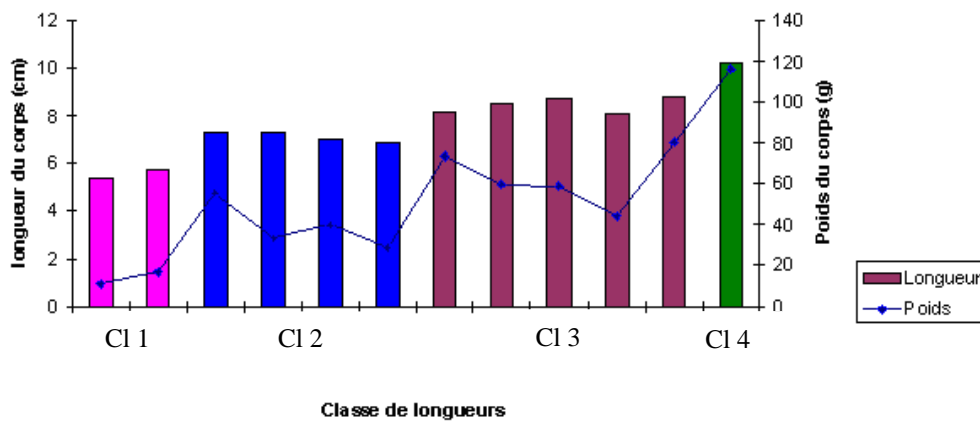


Figure 20 : Variations du poids et de la longueur du corps en fonction des classes de longueur répertoriées chez les individus mâles de *Bufo mauritanicus* Schlegel, 1841.

La figure 19 traduit les variations moyennes par classe de tous les individus confondus (par rapport aux données du tableau 6) et la figure 20 traduit les variations enregistrées par individu de chaque classe mentionnées au niveau de l'annexe 2. Les couleurs indiquent les limites de chaque classe.

On enregistre que la longueur du corps varie de 5,4 à 10,20 cm alors que le poids du corps de l'animal enregistre une variation comprise entre 11,2 et 116,50 g.

Les individus de la classe 1, sont capturés à des périodes différentes de l'année à savoir l'automne et le printemps où on enregistre respectivement une longueur de 5,4 et 5,7cm pour des poids respectifs de 11,2 et 16,49g.

#### IV.1.1.1. Structure histologique des testicules

Le testicule de *Bufo mauritanicus* est un organe pair ovale plus ou moins régulier. Les testicules droit et gauche sont symétriques. Pour notre étude, le poids moyen du testicule gauche a été évalué à partir de 12 animaux ; il est de 0,10 g.

Chaque testicule est constitué de tubes séminifères entre lesquels se développe le tissu interstitiel, les vaisseaux sanguins et les canaux efférents. A l'intérieur de chaque tube, les cellules représentant la lignée spermatique sont regroupées en amas de même type, les cystes entourés d'une fine paroi. Tout au long de l'année, chaque testicule contient des cystes représentatifs de tous les différents stades de la spermatogenèse (Figure 21).

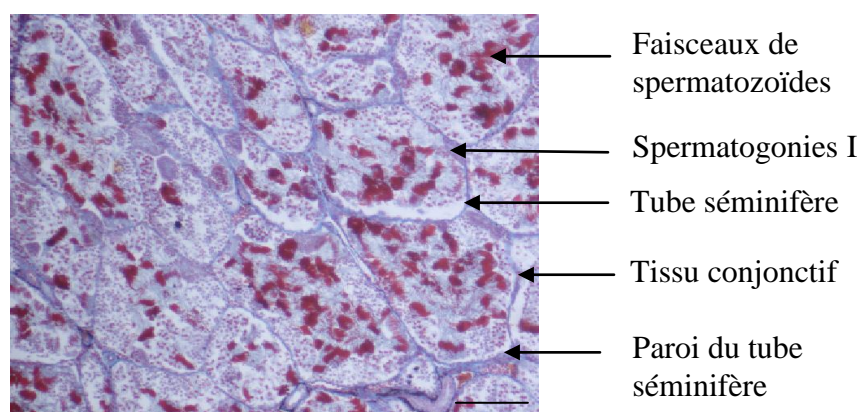


Figure 21 : Vue d'ensemble d'une coupe histologique du testicule gauche de *Bufo mauritanicus*. La barre d'échelle indique 50µm.

L'examen histologique des différentes coupes de testicules a révélé la présence permanente de toutes les catégories cellulaires de la lignée spermatique (Figure 22). Les spermatozoïdes, notamment, sont présents pendant toute l'année, ancrés dans les cellules de Sertoli, prêts à être libérés dans la lumière du tube séminifère. Ces résultats rappellent les observations effectuées chez la plupart des espèces africaines étudiées.

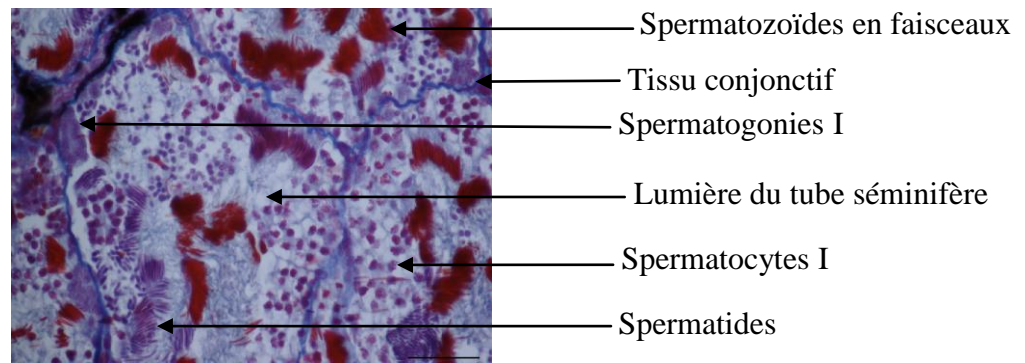


Figure 22 : Coupe histologique du testicule de *Bufo mauritanicus*, Schlegel, 1841. La barre d'échelle indique 50µm.

#### IV.1.1.2. Etude quantitative des coupes de testicules mâles

Cette étude porte sur les testicules gauches de 12 animaux et son but est de suivre l'état spermatogénétique tout au long des différents mois de l'année 2003-2004.

Le nombre moyen de faisceaux de spermatozoïdes par tube et la surface des coupes de testicule ont été pris en considération pour cette étude quantitative.

Les résultats représentés par la figure 23 indiquent les variations de la surface moyenne testiculaire en fonction du cycle annuel.

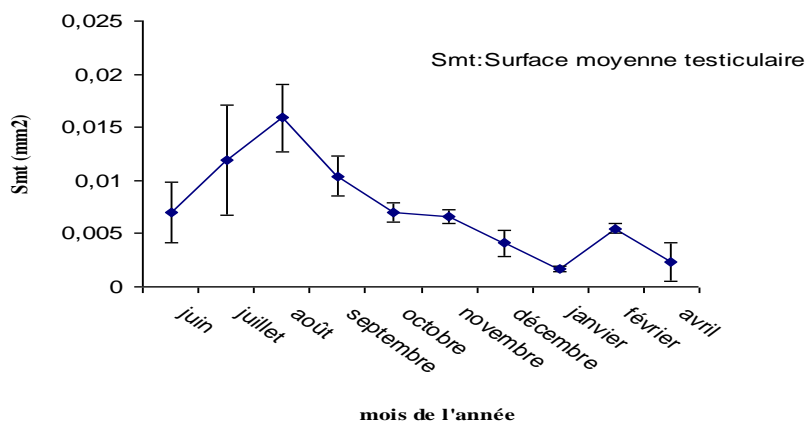


Figure 23 : Variation de la surface moyenne testiculaire en fonction du cycle annuel.

La surface moyenne testiculaire présente une nette variation mensuelle au cours d'un cycle saisonnier. Un pic est enregistré au cours du mois d'août 2003 avec une surface moyenne égale à  $15,9 \times 10^3 \text{ mm}^2$  alors que cette surface est plus faible au cours des mois qui suivent.

L'analyse de la variance révèle pour ce paramètre l'existence d'une différence hautement significative ( $F_{20}^9 = 10,61$  ;  $p < 0,001$ ) (tableau 7). Ce dernier nous a permis d'estimer l'évolution de la lignée spermatogénétique en fonction du cycle annuel.

Tableau 7 : Résultats de l'analyse de la variance (surface moyenne testiculaire en fonction du cycle annuel)

	dl	MC	dl	MC		
	Effet	Effet	Erreur	Erreur	F	niveau p
1	9	0,000059	20	,000006	10,61418	0,000007

Sur les douze testicules étudiés le nombre moyen de faisceaux de spermatozoïdes par tube séminifère est égal à 3,78 - 5,31 et 3,61 durant les mois de juillet, août et novembre de l'année 2003 respectivement. Il est par contre beaucoup plus faible en avril 2004 (0,15 faisceaux environ) (Figure 24).

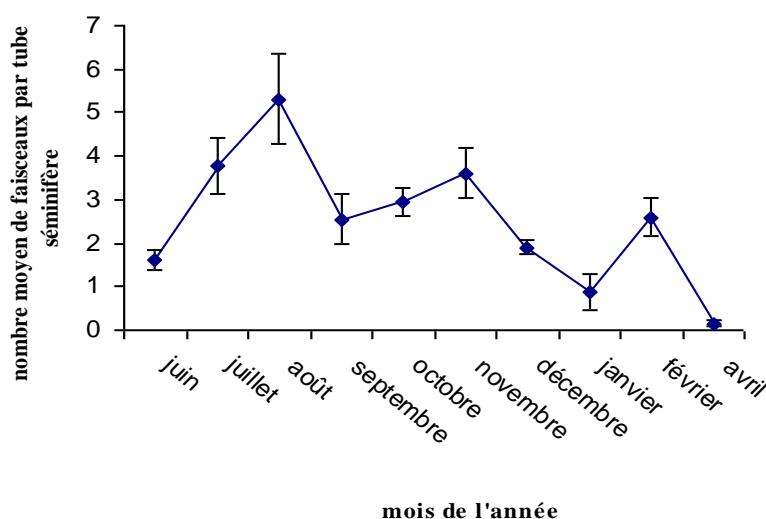


Figure 24 : Evolution du nombre moyen de spermatozoïdes en faisceaux en fonction des mois de l'année 2003-2004.

L'analyse de la variance révèle pour ce paramètre l'existence d'une différence hautement significative ( $F_{21}^9 = 31,71$  ;  $p < 0,001$ ) en fonction des mois de l'année 2003-2004 (tableau 8).

Tableau 8 : Résultats de l'analyse de la variance du facteur étudié en fonction du cycle annuel

	dl	MC	dl	MC		
	Effet	Effet	Erreur	Erreur	F	niveau p
1	9	8,295156	21	,261604	31,70888	,000000

Le nombre moyen de tubes séminifères par coupe, représenté par la figure 25, oscille entre 100 et 150 tubes séminifères c'est-à-dire que le nombre de tubes séminifères est constant et comparable chez tous les animaux étudiés, quelle que soit la période de prélèvement.

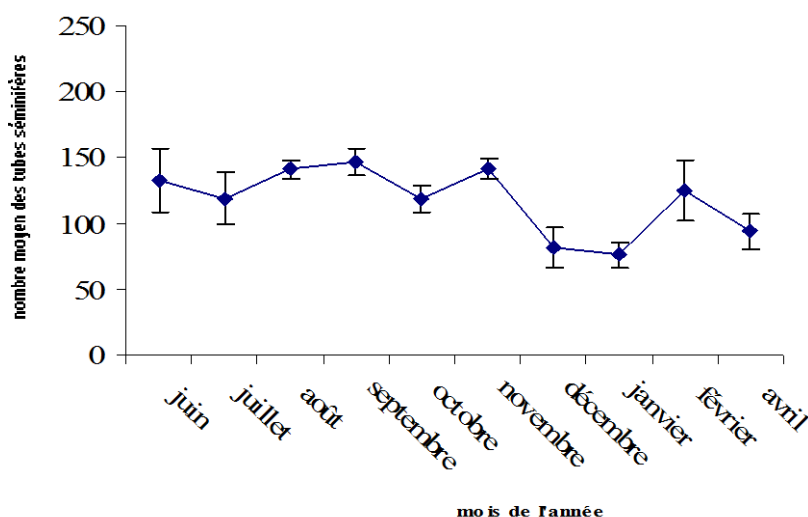


Figure 25 : Evolution du nombre moyen des tubes séminifères en fonction des mois de l'année 2003-2004.

L'analyse de la variance effectuée pour ce paramètre traduit une différence hautement significative ( $F_{21}^9 = 7,75$  ;  $p < 0,001$ ) au cours du cycle annuel de l'espèce étudiée (tableau 9).

Tableau 9 : Résultats de l'analyse de la variance (nombre moyen des tubes séminifères en fonction des mois de l'année 2003-2004)

	dl	MC	dl	MC		
	Effet	Effet	Erreur	Erreur	F	niveau p
1	9	1942,584	21	250,6420	7,750433	0,000058

### IV.1.2. Données biométriques chez les femelles

Comme pour les mâles, plusieurs paramètres ont été appréciés pour caractériser les femelles : la longueur du corps (cm), la masse du corps (g), la densité de l'animal :  $1000 \times \text{masse du corps (g)} / \text{longueur du corps (cm)}$ , la masse des ovaires (g), le rapport gonado-somatique :  $2 \times \text{masse de l'ovaire gauche (g)} / \text{masse du corps (g)}$ .

Les variations du poids corporel moyen des individus femelles en fonction des différentes classes de longueur sont données dans le tableau n° 10.

Tableau 10 : Variation du poids corporel moyen en fonction des différentes classes de longueur

Paramètres	N	Longueur (cm)	Poids du corps (g)
Classes de longueur			
[5 – 6,5]	2	5,9	20,40
[6,5 - 8]	10	7,31	38,52
[8 – 9,5]	11	8,72	74,01
[9,5 - 11]	4	9,8	99,59

Chez les femelles, le poids moyen du corps est le siège d'importantes variations selon les classes de longueur (Figure 26).

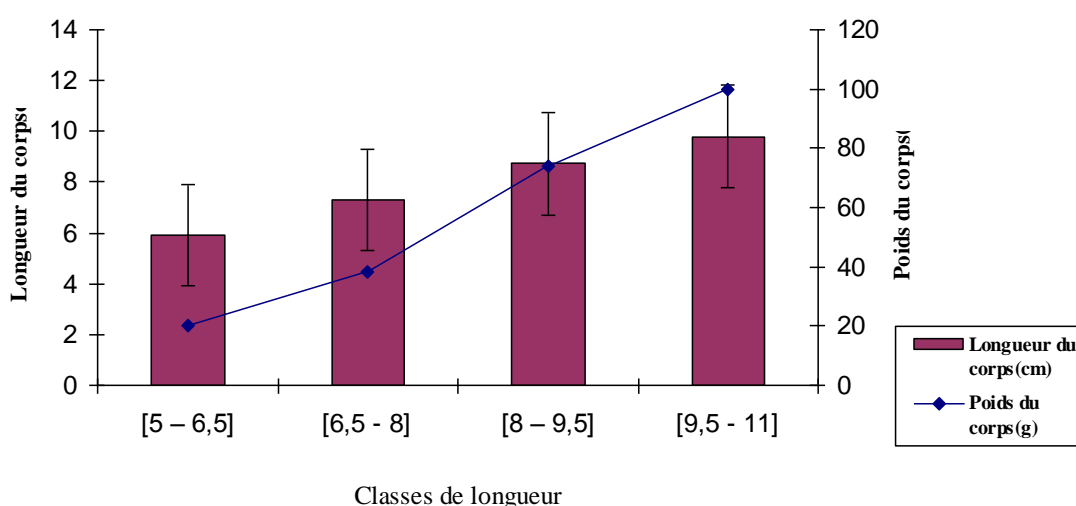


Figure 26 : Variations moyennes du poids et de la longueur du corps en fonction des classes de longueur répertoriées chez la femelle de *Bufo mauritanicus* Schlegel, 1841.



Chez les femelles, à une même longueur du corps, peuvent correspondre des poids très différents. Par exemple, dans la classe 3, le poids corporel d'un animal de longueur égale à 8,30 cm peut être de 46,00 g, 67,90 g ou 70,19 g (Figure 27).

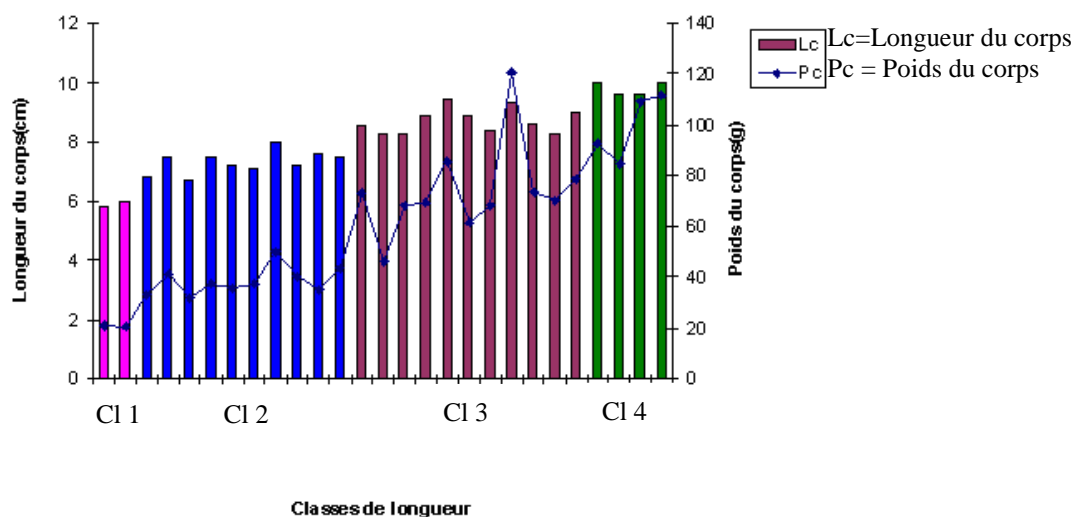


Figure 27 : Variations du poids et de la longueur du corps en fonction des classes de longueur répertoriées chez les individus femelles de *Bufo mauritanicus* Schlegel, 1841.

Ces variations peuvent être expliquées par le fait que les prélèvements n'ont pas été effectués à la même période de l'année. Les facteurs climatiques et trophiques peuvent ainsi avoir des répercussions sur l'état physiologique des individus. Le régime alimentaire est dépendant de la richesse en source de nourriture qui varie selon la saison considérée. Une étude portant sur le régime alimentaire de *Bufo mauritanicus* vivant près du lac Aguelmam Azegza (Maroc) a montré que le régime alimentaire de cette espèce était essentiellement composée de Coléoptères et de Formicidae (Chillasse *et al.*, 2002).

#### IV.1.3. Caractéristiques biométriques liées au sexe au cours du cycle de reproduction

Les tableaux ci-dessous résument les différentes variations des caractéristiques liées au sexe prises en considération pour mieux apprécier le cycle annuel de reproduction des individus mâles et femelles de *Bufo mauritanicus*.

Tableau 11 : Variations mensuelles des caractéristiques liées au sexe de *Bufo mauritanicus* mâle au cours du cycle annuel 2003-2004

Paramètres Mois de prélèvement	Pc (g)	Pt (g)	Lc (cm)	Dt	Da	RGS
Jui	64,33	0,08	07,76	0,02	13,77	0,002
Juil	59,63	<b>0,21</b>	08,50	0,034	09,71	0,007
Août	<b>116,5</b>	0,19	10,20	0,018	10,98	0,003
Sep	58,5	0,10	08,70	0,015	08,88	0,003
Oct	22,3	0,06	6,35	0,02	08,71	0,005
Nov	43,9	0,09	08,10	0,016	08,26	0,004
Dec	39,9	0,07	07,00	0,020	11,63	0,004
Jan	28,71	0,04	06,90	0,011	08,74	0,002
Fev	80,32	0,10	08,80	0,015	11,79	0,003
Avr	16,49	0,02	05,70	0,008	08,90	0,002

Avec :

Pc : poids du corps de l'animal

Pt : poids du testicule

Lc : longueur du corps

Dt : densité des testicules

Da : densité de l'animal

RGS : rapport gonado-somatique

$$Dt = \frac{Pt \text{ en g} \times 100}{(Lc \text{ en cm})^3}$$

Selon le tableau 11, le rapport gonado-somatique est une constante par rapport à la longueur, au poids du corps de l'animal, à la densité et au poids du testicule gauche. C'est donc une variable indépendante.

L'expression de la variation mensuelle du poids du corps (Pc) et du testicule (Pt) de *Bufo mauritanicus* au cours du cycle annuel 2003-2004 est donnée par la figure 28.

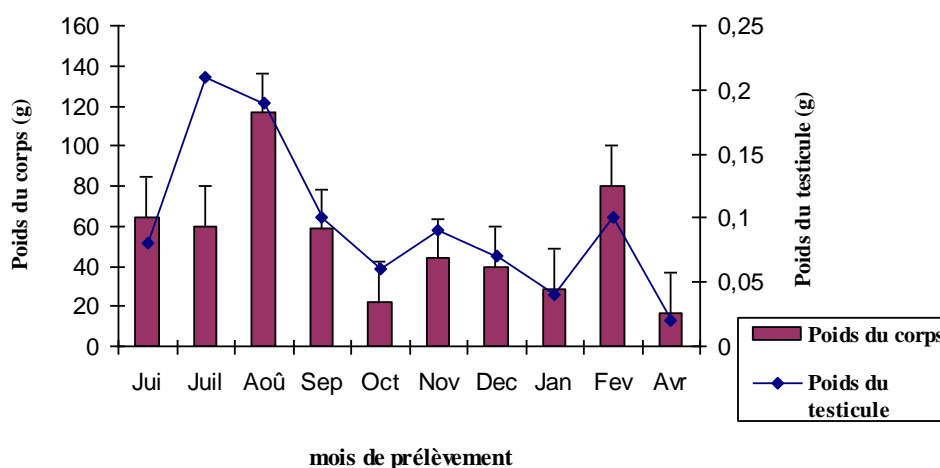


Figure 28 : Variations mensuelles du poids du corps et du testicule de *Bufo mauritanicus* au cours du cycle annuel 2003-2004.

Le poids du testicule et celui du corps de l'animal respectivement de 0,21g et 116,5g en juillet et août.

Tableau 12 : Variations mensuelles moyennes des caractéristiques liées au sexe de *Bufo mauritanicus* femelle au cours du cycle annuel 2003-2004

Paramètres Mois de prélèvement	Pc (g)	Lc (cm)	Pov (g)	Povi (g)	Da	RGS
Jui	52,88	07,68	0,84	0,20	11,67	0,03
Juil	51,61	08,03	2,23	0,87	09,97	0,09
Août	82,22	09,50	1,21	0,29	09,59	0,03
Sep	58,95	08,05	1,93	0,48	11,30	0,07
Oct	26,13	06,43	0,33	0,04	09,83	0,03
Nov	48,50	08,05	2,15	0,33	09,30	0,09
Dec	37,36	07,10	2,79	0,57	10,44	0,15
Jan	52,62	07,87	2,82	1,00	10,80	0,11
Mar	95,58	09,13	8,83	2,84	12,56	0,18
Avr	72,27	08,63	3,87	1,18	11,24	0,11
Mai	43,59	07,50	0,56	-	10,33	0,03

Les valeurs moyennes du rapport gonado-somatique des femelles sont largement supérieures à celles des mâles. Les mois de juin, août, octobre de l'année 2003 et le mois de mai de l'année 2004 enregistrent la plus faible valeur de ce rapport (0,03) ; au cours des autres mois de l'année, ce rapport est plus élevé pour atteindre 0,18 en mars de l'année 2004. Ce rapport est principalement lié à plus d'ovocytes et de follicules volumineux (Pujol et Exbrayat, 1998).

La figure 29 résume les résultats illustrés dans le tableau précédent.

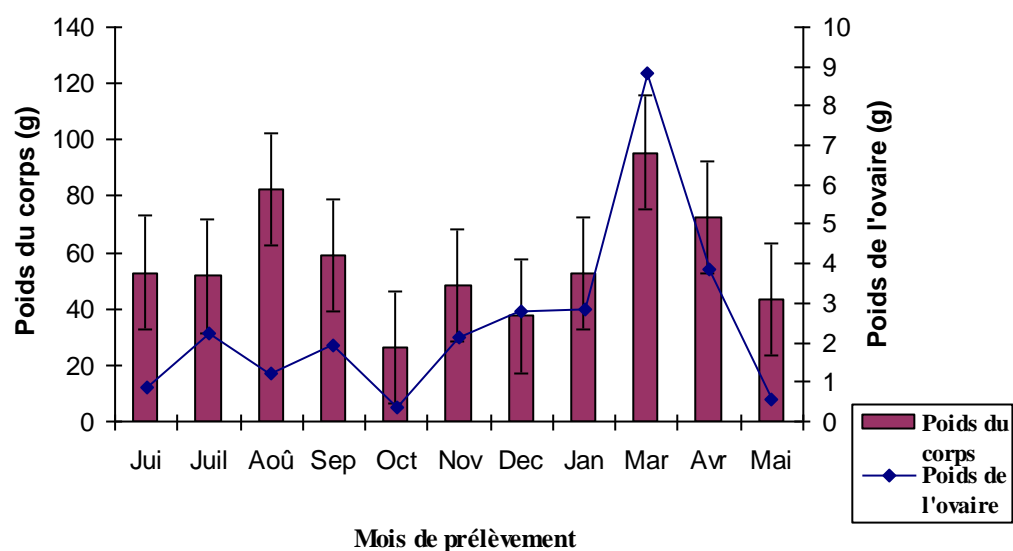


Figure 29 : Variations mensuelles du poids du corps et de l'ovaire de *Bufo mauritanicus* au cours du cycle annuel 2003-2004.

Le poids de l'ovaire et celui du corps de l'animal varient respectivement de 0,33g ; 26,13g pendant le mois d'octobre de l'année 2003 et de 8,83g ; 95,58g pendant le mois de mars 2004.

#### IV.1.4. Dimorphisme sexuel

Il est intéressant de comparer les données biométriques des mâles et des femelles afin de mettre en évidence un éventuel dimorphisme sexuel chez *Bufo mauritanicus*.

L'ensemble de ces données collectées chez les mâles et chez les femelles a permis de déterminer un animal type représentatif de chaque sexe pour cette espèce, dont les caractéristiques sont le résultat de la moyenne de chaque valeur de l'échantillonnage. Le tableau suivant définira l'ensemble de ces caractéristiques.

Tableau 13 : Paramètres moyens utilisés pour les deux sexes de l'espèce *Bufo mauritanicus*

Paramètres Sexe	L (cm)	Pc (g)	D	RGS
Mâle	7,80	53,06	10,14	0,004
Femelle	8,00	56,52	10,64	0,08

L = Longueur du corps, Pc = Poids du corps, D = Densité, RGS = Rapport gonado-somatique.

Les différences obtenues lors de la comparaison des données biométriques des animaux mâles et femelles ont permis la mise en évidence d'un dimorphisme sexuel pouvant être étudié de manière quantitative et permettant la comparaison avec les autres espèces d'amphibiens.

L'indice de dimorphisme pour une population de *Bufo mauritanicus* prélevée dans la zone humide de Beni-Belaïd est de l'ordre de 93,88 %. Cet indice est largement supérieur à celui de *Bufo regularis* (55,8 % ; Pujol et Exbrayat, 2002), *Phrynobatrachus calcaratus* (65,7 % ; Gueydan-Baconnier, 1980), *Ptychadena macCarthyensis* et *Ptychadena oxyrhynchus* (respectivement 65 % et 67,2 % ; Neyrand de Leffemberg et Pujol, 1984). La taille des femelles est supérieure à celle des mâles chez 90 % des espèces anoures (Shine, 1979 ; Monnet et Cherry, 2002). Plusieurs tentatives ont été faites pour considérer ce dimorphisme comme une conséquence de la sélection sexuelle.

#### **IV.2. Etude et variations saisonnières des organes sexuels de *Bufo mauritanicus* au cours du cycle annuel de reproduction**

Les caractéristiques climatiques de la région d'étude données par le diagramme ombrothermique, nous ont permis de répartir les individus mâles et femelles de l'espèce étudiée en fonction des saisons de l'année.

Le tableau n° 14 montre les variations saisonnières du poids des testicules et des ovaires de *Bufo mauritanicus* au cours du cycle annuel 2003-2004.

Tableau 14: Variations saisonnières du poids des testicules et des ovaires gauches de *Bufo mauritanicus*

Saison	Pm t (g)	Pm ov (g)
Eté	0,14	1,71
Automne	0,07	1,17
Hiver	0,07	2,24
Printemps	0,02	5,93

Avec :

- Pm t : Poids moyen du testicule gauche

- Pm ov : Poids moyen de l'ovaire gauche.

Les saisons semblent ainsi affecter aussi bien le poids du testicule gauche que celui de l'ovaire gauche. En effet, le testicule gauche atteint son poids maximal moyen ( 0,14 g), durant l'été de l'année 2003, alors que le poids maximal moyen des gonades femelles (5,93g) est enregistré au printemps 2004 (Figures 30 et 31).

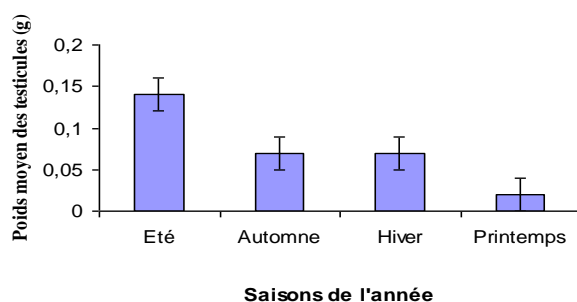


Figure 30 : Variations saisonnières du poids des testicules gauches de *Bufo mauritanicus* prélevés de la zone Beni-Belaid(Jijel-Algérie) au cours du cycle annuel 2003-2004.

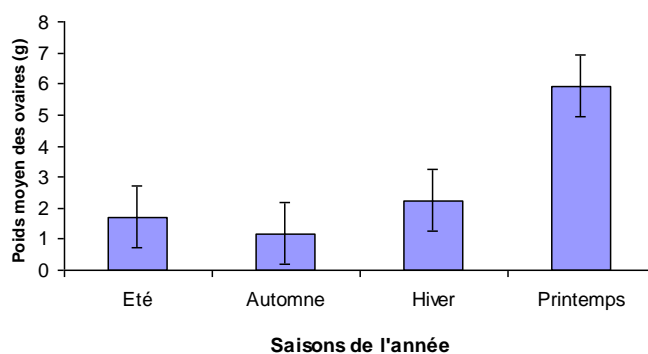


Figure 31 : Variations saisonnières des ovaires gauches de *Bufo mauritanicus* prélevés de la zone Beni-Belaid(Jijel-Algérie) au cours du cycle annuel 2003-2004.

Nous avons également jugé utile d'examiner l'évolution du poids moyen du corps de l'animal et des gonades mâles ou femelles au cours du développement sexuel en fonction des périodes humides et sèches. Ceci nous a permis de regrouper les individus mâles et femelles par période de l'année (tableau 15).

Tableau 15 : Variations pondérales du poids moyen du corps et des gonades mâles et femelles gauches de *Bufo mauritanicus* en fonction des périodes de l'année 2003-2004

Paramètres Périodes	Gonades		Densité		Pmc (g)		Da	
	Pmt(g)	Pmov (g)	Dt	Dov	mâle	femelle	mâle	femelle
PH1	0,05	5,08	0,011	0,74	41,84	72,78	9,81	11,22
PS	0,14	1,50	0,022	0,24	76,20	63,41	12,02	10,04
PH2	0,08	1,49	0,019	0,29	37,38	41,33	8,89	9,82

Pmt : Poids moyen du testicule

Dt : Densité du testicule

PH1 : Période humide

Pmov : Poids moyen de l'ovaire

Dov : Densité de l'ovaire

PS : Période sèche

Pmc : Poids moyen du corps

Da : Densité de l'animal

PH2 : Période humide

La période humide (PH1) représentée par les mois de janvier, février, mars, avril et mai compte 3 mâles et 11 femelles. La période humide (PH2) représentée par les mois de septembre, octobre, novembre et décembre compte 5 individus mâles et 8 individus femelles. La période sèche (PS), représentée par les mois de juin, juillet et août compte 4 individus mâles et 8 individus femelles (Figure 32).

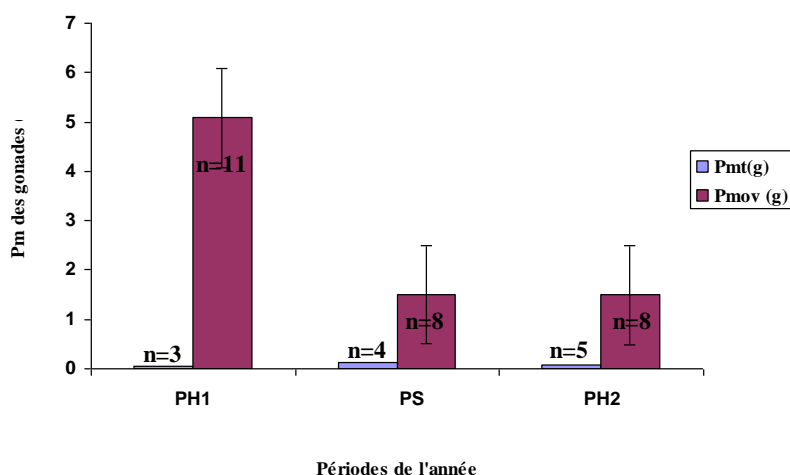


Figure 32 : Variation du poids moyen des gonades mâles et femelles de *Bufo mauritanicus* en fonction des périodes enregistrées dans le diagramme ombrothermique au cours du cycle annuel de reproduction 2003-2004.

n: nombre d'individu  
Pm: Poids moyen

Les résultats obtenus montrent que la masse des gonades croît en fonction de la masse du corps de l'animal chez les mâles et les femelles.

La figure 33 illustre les variations pondérales liées au sexe en fonction des périodes de l'année d'échantillonnage. Par ailleurs, le poids moyen du corps de l'animal atteint une valeur maximale à une saison différente en fonction du sexe. C'est ainsi que l'on constate que le poids moyen des individus mâles atteint 76,20 g durant la période sèche alors que celui des femelles, atteint 72,78 g durant la période humide. Par comparaison des deux périodes humides nous constatons également que le poids moyen du corps de *Bufo mauritanicus* femelle enregistre une nette différence. Par contre, chez les mâles, cette différence n'est pas aussi significative. Face à cela, le poids moyen des gonades mâles et femelles enregistre des variations qui vont dans le même sens que celles du poids moyen du corps. Pendant la période sèche, le poids moyen des testicules de *Bufo mauritanicus* est ainsi de 0,14 g alors que celui des ovaires présente une valeur moyenne maximale de 5,08 g durant la période humide.



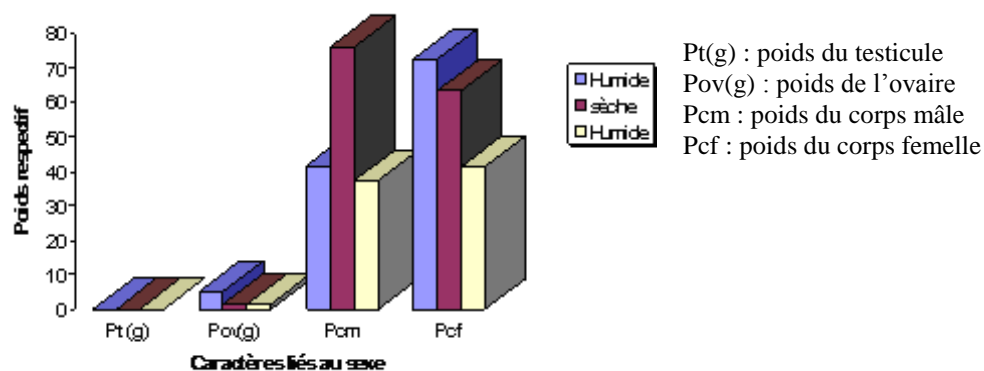


Figure 33 : Variations pondérales des caractères liés au sexe en fonction des périodes de l'année.

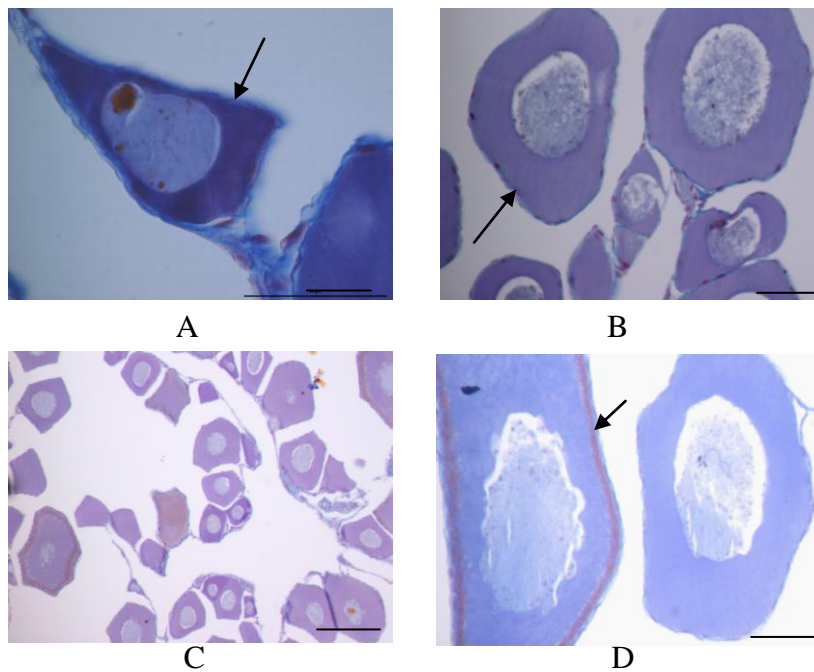
Selon le tableau 15 ci-dessus, Le poids des gonades mâles et femelles ne dépend pas de la densité. Il est fortement corrélé à la longueur et au poids du corps.

### IV.3. Dynamique du cycle ovogénétique

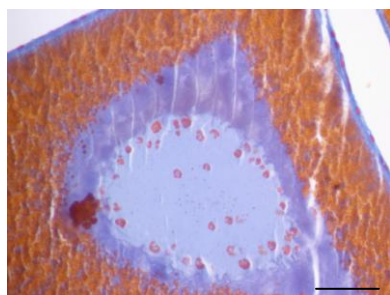
Pour comprendre la dynamique de la lignée ovogénétique de *Bufo mauritanicus*, les différents stades de follicules ovariens ont été décrits puis quantifiés au cours du cycle annuel de reproduction sur coupes histologiques. Seuls les follicules dont les coupes d'ovocytes présentent le noyau (ou vésicule germinative) ont été pris en considération pour éviter de compter plusieurs fois les mêmes follicules.

Les critères de classements choisis ont été la taille des follicules, l'aspect de l'ovocyte, celui de son noyau, en tenant compte de la disposition des nucléoles et l'aspect des différentes membranes et des cellules folliculeuses. Ces critères ont permis de classer les follicules en grandes phases de prévitellogénèse et de vitellogénèse.

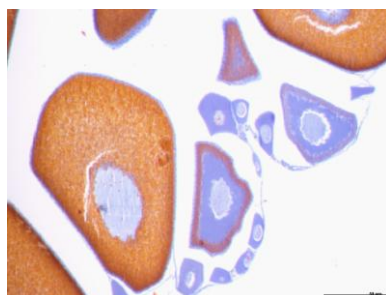
La figure 34 représente les principaux stades pris en compte qui ont permis de comprendre la dynamique de la folliculogénèse chez *Bufo mauritanicus*. Comme chez la plupart des animaux ovipares, l'ovogenèse est caractérisée par une accumulation abondante importante de vitellus fournissant les matériaux nutritifs requis pour l'embryogenèse (Villicco *et al.*, 1999).



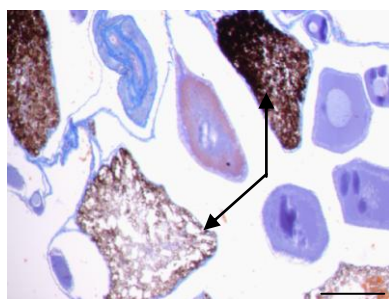
A, B et C : stades en prévitellogénèse  
D : début de vitellogénèse



Follicule au milieu de la Vitellogénèse (E).



Folliculogénèse chez (F)  
*Bufo mauritanicus*



Follicules atrétiques (G)

Figure 34 : Dynamique de la folliculogénèse chez *Bufo mauritanicus*.

La barre d'échelle indique 50µm.

L'ovaire des Amphibiens Anoures est un organe pair qui se présente sous la forme de deux masses symétriques situées ventralement de chaque côté de la colonne. Il représente ainsi des sacs creux divisés en lobes à l'intérieur desquels les ovocytes font saillie. Selon plusieurs auteurs le nombre de lobes varie d'une espèce à une autre (Spengel, 1876 ; Badhuri, 1953 et Horton, 1984).

« La taille des ovaires varie beaucoup suivant l'âge du sujet et la période de l'année suivant l'état de la vitellogénèse » (Delsol *et al.*, 1995).

### **IV.3.1. Définition des stades folliculaires et ovocytaires**

La taille de l'ovocyte, celle de son noyau, la morphologie de la membrane nucléaire, le développement centripète des plaquettes vitellines, des inclusions cytoplasmiques, la forme des cellules folliculaires et l'aspect des membranes entourant l'ovocyte ont permis de définir 5 stades de développement des ovocytes et follicules chez la femelle de *Bufo mauritanicus*. Les différents stades ovogénétiques répertoriés sont désignés par des chiffres romains I (Ia, Ib) à V.

#### **IV.3.1.1. Stades prévitellogéniques**

##### **Stade Ia**

A ce stade, les cellules germinales sont de très jeunes ovocytes dépourvus de vitellus, dont la taille est comprise entre 20 et 135  $\mu\text{m}$ . Le noyau arrondi atteint 16 à 69  $\mu\text{m}$  et il contient généralement 1 à 2 gros nucléoles périphériques avec parfois des micronucléoles et de la chromatine finement ponctuée. L'enveloppe nucléaire n'est pas dentelée. Le cytoplasme faiblement basophile est homogène et peu abondant et il est limité par une membrane plasmique présentant quelques replis. A ce stade 1 à 3 cellules folliculaires aplaties et non jointives entourent l'ovocyte. La paroi du follicule est vascularisée.

##### **Stade Ib**

A ce stade, les follicules contiennent de jeunes ovocytes de 64 à 166  $\mu\text{m}$ , avec un noyau sphérique de 27 à 93  $\mu\text{m}$  de diamètre limité par une membrane uniforme. La chromatine est finement pigmentée traduisant ainsi le début d'une activité de synthèse par des nucléoles périphériques en nombre plus important que le stade précédent. Le cytoplasme est intensément coloré par les colorants basiques de manière homogène. Les cellules folliculaires, plus nombreuses que précédemment, sont encore aplaties et apparemment non jointives.

## Stade II

Les follicules contiennent un ovocyte plus ou moins arrondis sur les coupes histologiques dont le diamètre varie entre 77 et 203  $\mu\text{m}$ . Le noyau arrondi mesurant 39 à 100  $\mu\text{m}$  est limité par une membrane nucléaire dentelée, caractéristique des anoures. A la périphérie du noyau, on note la présence d'un nombre de nucléoles de différentes tailles plus important qu'au stade précédent dont certains se rabattent vers le centre du noyau. La chromatine homogène est bien répartie. A ce stade, des chromosomes à l'aspect plumeux sont mis en évidence. Le cytoplasme homogène est basophile. Les cellules folliculaires en nombre plus important qu'au stade précédent, sont aplaties et plus ou moins rapprochées. La paroi folliculaire apparente et vascularisée, présente des replis cytoplasmiques.

## Stade III

Le diamètre des ovocytes varie entre 126 et 299  $\mu\text{m}$ . Le noyau, possède une forme arrondie et mesure entre 45 et 149  $\mu\text{m}$  de diamètre. De nombreux nucléoles tapissent la périphérie du noyau à la membrane très dentelée. La chromatine est finement ponctuée. L'ovocyte est entouré par une couche de cellules folliculaires aplaties et rapprochées.

Ce stade est caractérisé par l'apparition des alvéoles corticales et des inclusions lipidiques à la périphérie du cytoplasme qui prend un aspect hétérogène. La paroi folliculaire est vascularisée.

### IV.3.1.2. Stades vitellogéniques

## Stade IV

Ce stade est divisé en deux états caractérisés, pour l'un, par la présence de plaquettes vitellines à la périphérie du cytoplasme ovocyttaire et, pour l'autre par la tendance qu'ont ces plaquettes à envahir tout le cytoplasme ovocyttaire.

## Stade IVa

Ce stade représente le follicule en début de vitellogenèse. Ce dernier de taille comprise entre 184 et 416  $\mu\text{m}$  comporte un noyau arrondi mesurant 59 à 162  $\mu\text{m}$  ; la membrane nucléaire est beaucoup plus marquée que les stades précédents. Le noyau contient de nombreux nucléoles périphériques qui, dans certains cas, commencent à perdre leur caractère sphérique et à s'orienter vers le centre du noyau. La chromatine, finement ponctuée, est uniforme. On note à ce stade, un début de mise en place des plaquettes vitellines peu volumineuses à la périphérie du cytoplasme ovocyttaire. Ce stade est également caractérisé par la mise en place de la zone

corticale et l'apparition de la membrane vitelline jusqu'à présent absente. La paroi folliculaire est vascularisée. Les cellules folliculaires sont nombreuses, aplaties et jointives.

#### Stade IVb

Ce stade caractérise les ovocytes en milieu de vitellogenèse. Les ovocytes mesurent entre 246 et 588  $\mu\text{m}$ . Les plaquettes vitellines, de plus en plus nombreuses envahissent de manière centripète. Chaque ovocyte contient un noyau arrondi, volumineux dont la taille varie entre 65 et 203  $\mu\text{m}$ . La migration de ce noyau (vésicule germinative) se manifeste à ce stade bien avant que le vitellus n'ait entièrement envahi le cytoplasme de l'ovocyte, donc au fur et à mesure que le dépôt vitellin progresse dans la cellule, la vésicule devient plus excentrée. La membrane nucléaire est dentelée. Les nucléoles sont périphériques et moins nombreux qu'au stade précédent, de forme sphérique mais certains ont perdu ce caractère. Ces nucléoles, d'abord sphériques, se transforment progressivement en structures annulaires monoliformes, de plus en plus étirées. Selon Van Gansen (1986), les nucléoles des ovocytes vitellogéniques sont le siège d'abondantes synthèses d'ARN ribosomiaux. Les cellules folliculaires sont alors nombreuses, aplaties et rapprochées. A ce stade, la zone corticale est très apparente. La paroi du follicule est vascularisée.

#### Stade V

Ce stade représente les ovocytes en fin de vitellogenèse où le vitellus coloré par l'orange G molybdique envahit entièrement le cytoplasme. Les follicules ont atteint leur taille maximale. L'ovocyte mesure de 403 et 1181  $\mu\text{m}$ . La vésicule germinative au diamètre compris entre 113 et 328  $\mu\text{m}$ , située au pôle animal présente une forme qui épouse dans certains cas la forme de l'ovocyte qu'il soit allongé ou plus ou moins arrondi. L'enveloppe nucléaire est dentelée, les nucléoles dont certains ont perdu leur caractère sphérique sont en partie périphériques et en partie au centre du noyau et moins nombreux que les stades précédents. La chromatine est bien répartie de manière homogène. Les granules corticaux de très petite taille se retrouvent à la périphérie cytoplasmique de l'ovocyte. Certains ovocytes présentent une pigmentation périphérique du cytoplasme qui apparaît au niveau du pôle animal, d'autres ne sont pas encore pigmentés. Les cellules folliculaires sont nombreuses, aplaties et jointives. La paroi du follicule est vascularisée.

Deux catégories d'ovocytes, les ovocytes pigmentés et non pigmentés, sont observées. La pigmentation de l'ovocyte surgit au niveau du pôle où s'effectue la migration de la vésicule germinative.

La figure 35, montre des vues d'ensemble des follicules sur des coupes histologiques colorées à l'azan de Romeis modifié et étudiées au microscope photonique.

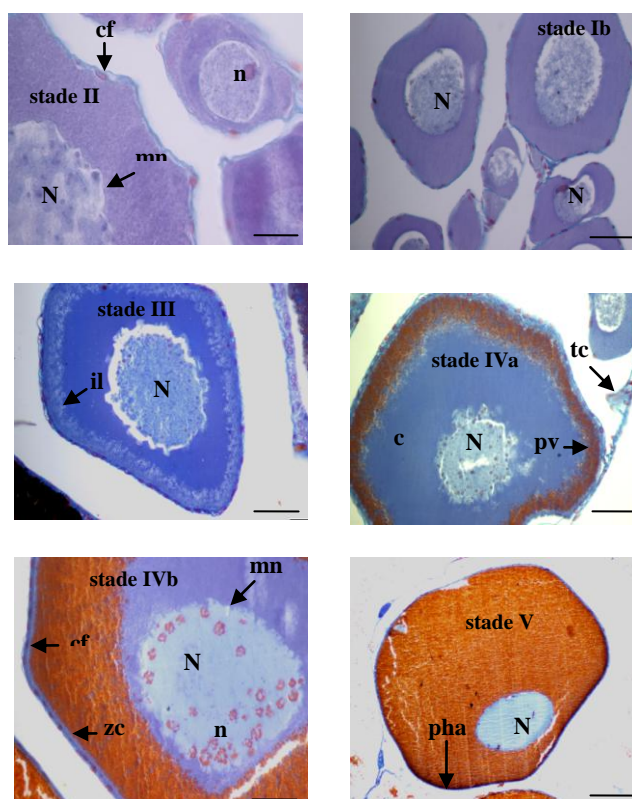


Figure 35 : Vue d'ensemble de l'évolution ovogénétique et dynamique de la folliculogénèse chez *Bufo mauritanicus* au cours du développement sexuel. Coloration Azan de Roméis. N : noyau ; n : nucléole, mn : membrane nucléaire ; tc : thèque conjonctive ; pv : plaquettes vitellines ; c : cytoplasme ; il : inclusions lipidiques ; zc : zone corticale ; cf : cellule folliculaire ; pha : pigmentation de l'hémisphère animale. La barre d'échelle indique 100  $\mu$ m.

La nature mucopolysaccharidique de la membrane vitelline et de la zone corticale est également mise en évidence par la réaction à l'APS (Figure 36).



Figure 36 : Mise en évidence des mucopolysaccharides dans les ovaires de *Bufo mauritanicus*.

(a): coloration à l'APS, (b): coloration bleu alcian-APS. mv: membrane vitelline, fb: fibroblaste, cf: cellule folliculaire, zc: zone corticale, pv: plaquettes vitellines, co: cytoplasme ovocytaire. La barre d'échelle indique 50µm.

#### IV.3.1.3. Variations biométriques de la taille des ovocytes et des noyaux au cours de l'évolution des follicules ovariens

Il est également paru utile de mettre en évidence l'évolution moyenne de la taille des différents stades ovogénétiques répertoriés au cours du cycle annuel de reproduction en prenant en considération la taille de l'ovocyte et celle du noyau (Figure 37).

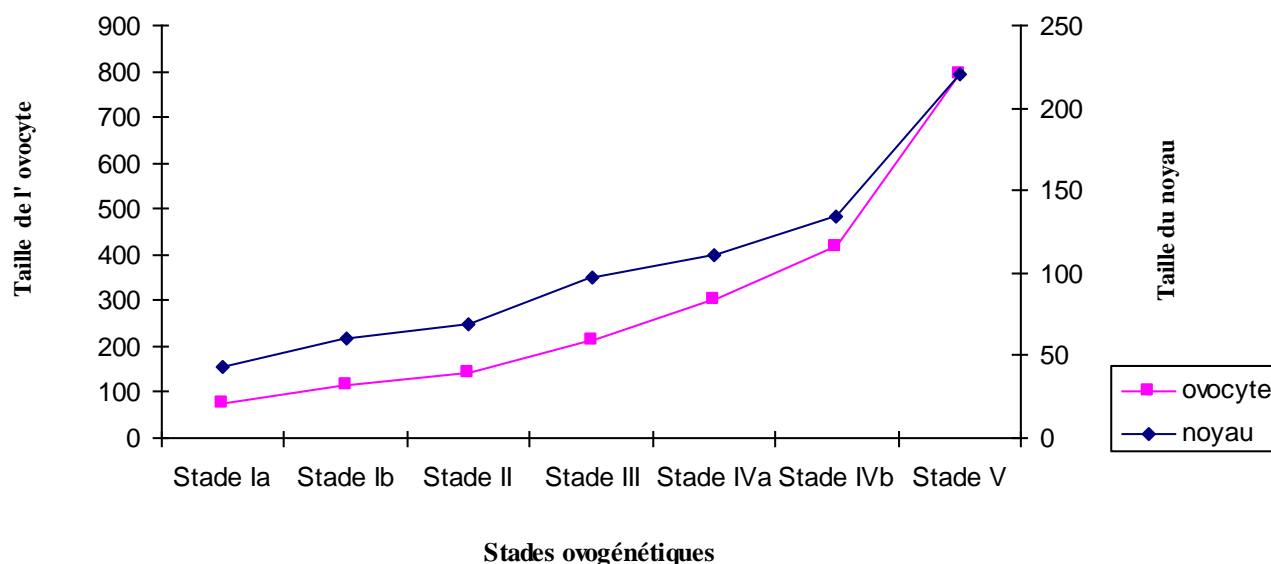


Figure 37 : Evolution de la taille des différents stades ovogénétiques au cours du cycle annuel de reproduction de *Bufo mauritanicus*.

Des stades prévitellogéniques aux stades de la vitellogénèse, la taille du noyau ovocytaire augmente avec celle de l'ovocyte. La taille moyenne du noyau varie de 42,5  $\mu\text{m}$  au stade Ia à 220,5  $\mu\text{m}$  au stade V et celle de l'ovocyte varie respectivement de 77,5  $\mu\text{m}$  à 792  $\mu\text{m}$ .

#### IV.3.1.4. Les follicules atrétiques

L'observation des ovaires a conduit à mettre en évidence la présence de follicules atrétiques se présentant sous deux aspects différents caractéristiques (FA', FA'').

La figure 38 résume une vue d'ensemble des différents follicules atrétiques.

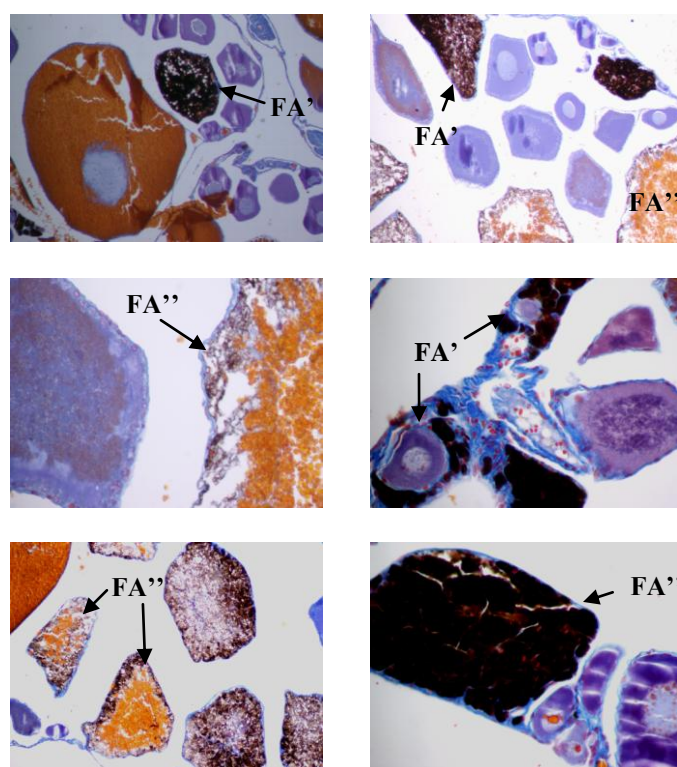


Figure 38 : Vue d'ensemble des différents follicules atrétiques au cours du développement sexuel de *Bufo mauritanicus*. FA' : follicule atrétique montrant une atrésie totale observée chez les stades prévitellogéniques de différente taille ; FA'' : follicule atrétique de grande taille observé chez les stades en vitellogénèse. La barre d'échelle indique 100 $\mu\text{m}$ .

Selon la figure précédente, les follicules atrétiques peuvent être issus de la dégénérescence des ovocytes prévitellogéniques (FA') ou de celle des ovocytes en vitellogénèse (FA''). La dégénérescence, d'abord périphérique et affectant le cytoplasme finit par atteindre et envahir le noyau ovocytaire, ce qui explique la présence de différents types de follicules atrétiques.



### IV.3.2. Variations du nombre de stades folliculaires au cours du cycle annuel de reproduction

La figure 39 montre les variations du nombre de chaque stade d'évolution folliculaire au cours d'un cycle annuel de reproduction.

Le cycle ovogénétique de *Bufo mauritanicus* présente un développement sexuel de type continu caractérisé par la présence de toutes les catégories cellulaires enregistrées au cours du cycle annuel de reproduction.

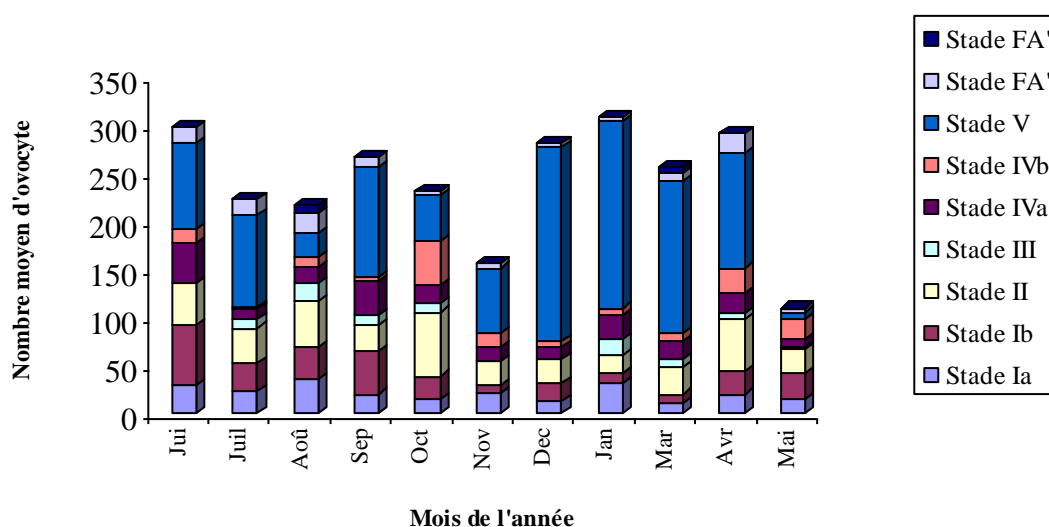


Figure 39 : Evolution moyenne des différents stades ovogénétiques de *Bufo mauritanicus* au cours du cycle annuel de reproduction.

### IV.4. Organes et aspects endocriniens du cycle sexuel

Le cycle sexuel de la population de *Bufo mauritanicus* étudiée est de type continu. Comme chez tous les vertébrés, la régulation des cycles de reproduction des amphibiens implique l'action de plusieurs tissus à fonction endocrine et notamment le tissu interstitiel du testicule, l'ovaire et les cellules de l'adénohypophyse de la glande pituitaire.

L'hypophyse des Amphibiens Anoures constitue un matériel particulièrement favorable pour l'étude des différents types cellulaires. Quelques hypophyses provenant de mâles et de femelles ont été colorées par le trichrome de Cleveland et Wolfe faisant apparaître deux types de catégories cellulaires de la *pars distalis*, les gonadotropes et les lactotropes régulièrement dispersés dans tout le volume hypophysaire (Figure 40).

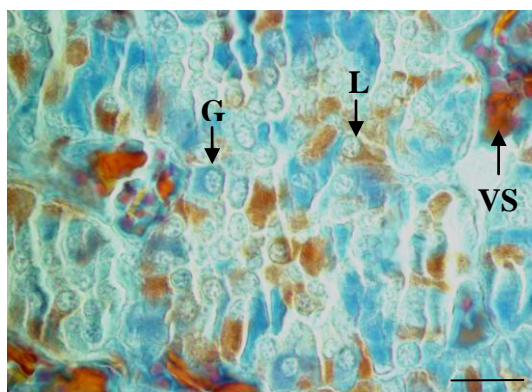


Figure 40 : Histologie de l'hypophyse de *Bufo mauritanicus*. Coloration au trichrome de Cleveland et Wolfe. G: cellule gonadotrope, L: cellule Lactotrope, VS: vaisseau sanguin. La barre d'échelle indique 50µm.

L'étude histologique de la *pars distalis* a permis de mettre en évidence les deux types cellulaires et aucun trait particulier ne semble différencier *Bufo mauritanicus* des autres amphibiens anoures.

Les différents types cellulaires de la *pars distalis* de l'adénohypophyse ont été caractérisés par leurs qualités tinctoriales établies par le trichrome de Cleveland et Wolfe et l'APS-orangé G (Gabe, 1968). Les cellules gonadotropes, sont de petites cellules rondes ou allongées, au noyau excentré. Les glycoprotéines (FSH et LH) stockées dans leur cytoplasme leur confèrent une coloration bleue due à leur affinité pour le bleu d'aniline (voir figure précédente). Les cellules lactotropes, cellules à prolactine sont reconnues par leur aspect granulaire et que ces cellules orangeophiles par la méthode de Cleveland et Wolfe, apparaissent après acidification du colorant, en brun et non en orange.

La cytologie de l'hypophyse des batraciens anoures a fait l'objet de nombreux travaux (Doerr-Schott *et al.*, 1962). La cytologie fine de la glande pituitaire de *Bufo arenarum* a permis de définir les caractères ultrastructuraux sans toutefois établir la correspondance entre les caractéristiques histologiques des types cellulaires et leur cytologie (Doerr-Schott, 1965a). Les travaux d'histologie classique ont montré que l'hypophyse distale du xénope constitue un matériel particulièrement favorable pour l'étude des types cellulaires composant cette glande. Les ultrastructures des cinq catégories cellulaires de l'hypophyse distale ont été examinées (Van Oordt, 1961 ; Guardabassi et Bianchi, 1962 ; Doerr-Schott, 1965b).

Les variations cytologiques de l'hypophyse distale des femelles de *Nectophrynoïdes occidentalis*, ont été également étudiés en fonction du déroulement de son cycle génital, tant durant la phase de maturation des follicules jusqu'à la ponte ovulaire que durant la gravidité et

après la parturition (Zuber-Vogeli, 1968). Chez d'autres catégories d'amphibiens, l'examen cytologique de l'hypophyse de *Typhlonectes compressicauda* à différentes périodes du cycle de reproduction a révélé des variations volumétriques des cellules gonadotropes et lactotropes (Exbrayat et Morel, 1991).

#### IV.5. Etude histochimique et immunohistochimique des fonctions hormonales des gonades

##### IV.5.1. Caractéristiques histochimiques des gonades mâles et femelles

La présence de lipides a été mise en évidence dans les testicules et les ovaires de *Bufo mauritanicus*.

Chez les mâles, des lipides ont été mis en évidence dans les cellules de Leydig situées dans le tissu interstitiel (Figure 41). Chez les femelles, leur détection est bien évidente au niveau des cellules de la granulosa, voire de la thèque de l'ovocyte du stade III (Figure 42).

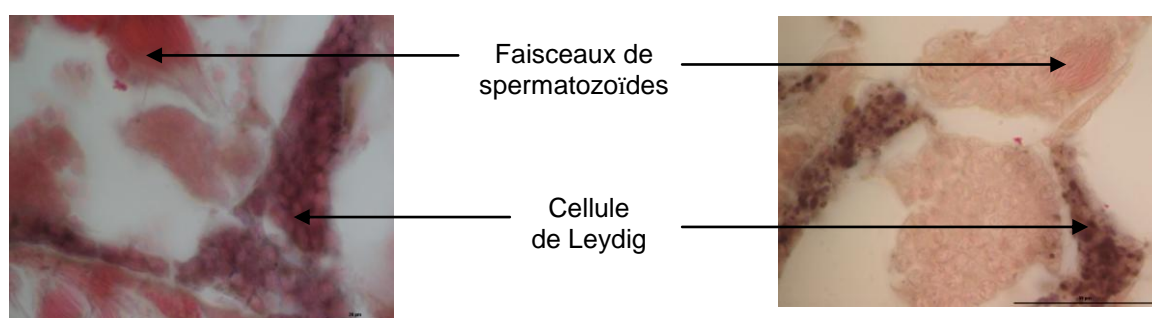


Figure 41 : Mise en évidence des lipides. Testicule de *Bufo mauritanicus*. Coupes à congélation, coloration Noir Soudan. La barre d'échelle indique 50µm.



Figure 42 : Mise en évidence des lipides. Ovaire de *Bufo mauritanicus*. Coupes à congélation, coloration Noir Soudan. La barre d'échelle indique 50µm.

## IV.5.2. Mise en évidence par immunohistochimie de la présence d'hormones

### IV.5.2.1. Au niveau des gonades

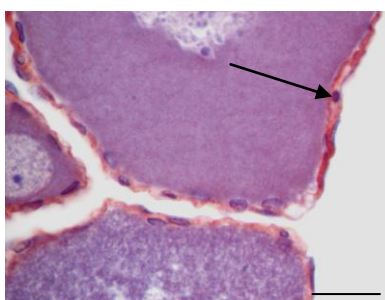
Le  $17\beta$ -oestradiol a été recherché à tous les stades ovogénétiques définis précédemment (I à V) sur des coupes d'ovaire de *Bufo mauritanicus*.

Les études immunohistochimiques par amplification ont permis de montrer sa présence au niveau des cellules folliculeuses et de la thèque conjonctive du follicule aussi bien au stade prévitellogénique (A) qu'au stade du follicule en vitellogenèse (B) (Figure 43). Les résultats préliminaires montrent que la dilution optimale de l'anticorps anti-oestradiol est de 1/300. L'étude préliminaire a également indiqué que l'anticorps utilisé produit bien un marquage spécifique de l'hormone recherchée car les tissus et les témoins où les coupes ont été testés sans anticorps primaires et secondaires ne présentent aucun marquage. Les illustrations suivantes ont été réalisées chez le même individu prélevé le 23/06/2003 avec la dilution sus indiquée. Les stades prévitellogéniques (I, II, III) présentent aussi bien un marquage que les stades vitellogéniques matures. Les follicules ovariens sont le siège d'une synthèse d'oestrogènes (Exbrayat, 1992) et, en se développant, sécrètent des quantités croissantes de ces hormones.

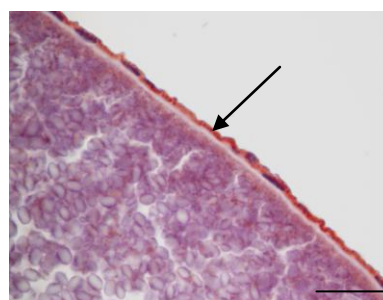
L'étude du contrôle hormonal de l'activité ovarienne d'amphibiens anoures a conduit à mettre en évidence la production d'oestrogènes dans la granulosa des follicules (Redshaw, 1972).

Chieffi et Lupo (1963) ont identifié les hormones oestrogènes dont le  $17\beta$ -oestradiol dans les extraits d'ovaires de *Xenopus laevis* et *Bufo vulgaris*. Les cellules thécales sont également capables, au même titre que les cellules folliculaires, de prendre une part active dans le métabolisme des hormones stéroïdes (Xavier *et al.*, 1970).

Chez le xénope, la capacité de produire et sécréter des stéroïdes par les follicules ovariens à différents stades de développement répond à l'activité des hormones (Fortune, 1983).



A- Stade ovocytes prévitellogéniques



B- Stade follicule vitellogénique

**Figure 43 : Localisation de l'hormone  $17\beta$ -oestradiol au cours de la folliculogénèse chez *Bufo mauritanicus*. La barre d'échelle indique 50 $\mu$ m.**

Pour confirmer les résultats obtenus, des essais ont été appliqués avec omission des anticorps primaires et secondaires (Figure 44).

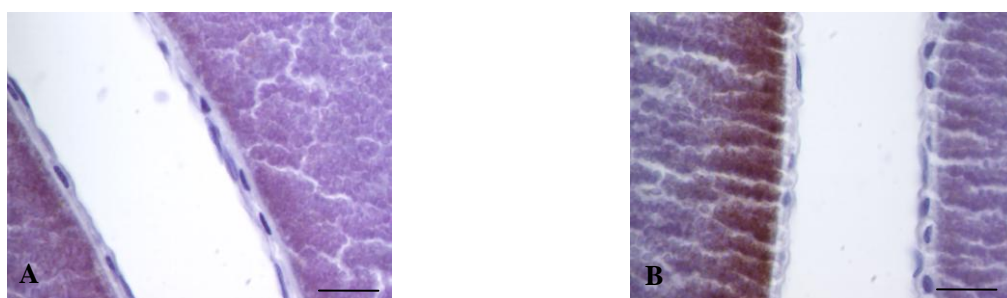


Figure 44 : coloration immunohistochimique des gonades femelles de *Bufo mauritanicus* par omission d'Anticorps. A : Témoin sans anticorps primaire (Gr x 100), B : Témoin sans anticorps secondaire (Gr x 100). La barre d'échelle indique 50 $\mu$ m.

Les témoins négatifs ne présentant pas de marquage valident les résultats immunohistochimiques obtenus sur les ovaires de *Bufo mauritanicus*.

L'étude immunohistochimique des gonades femelles de cette espèce a permis de confirmer l'existence d'un réel tissu endocrine au sein de ces ovaires. Ce tissu joue un rôle important au niveau de la stéroïdogénèse du fait que jusqu'à l'initiation de la vitellogénèse, la présence de 17 $\beta$ -oestradiol est toujours observée dans les cellules folliculaires.

#### IV.5.2.2. Au niveau de l'hypophyse

Les résultats obtenus dans la recherche de la FSH par individu de *Bufo mauritanicus* sont illustrés dans les figures suivantes qui nous indiquent un marquage cytoplasmique de l'hormone recherchée suite à l'application d'une dilution spécifique de l'anticorps.

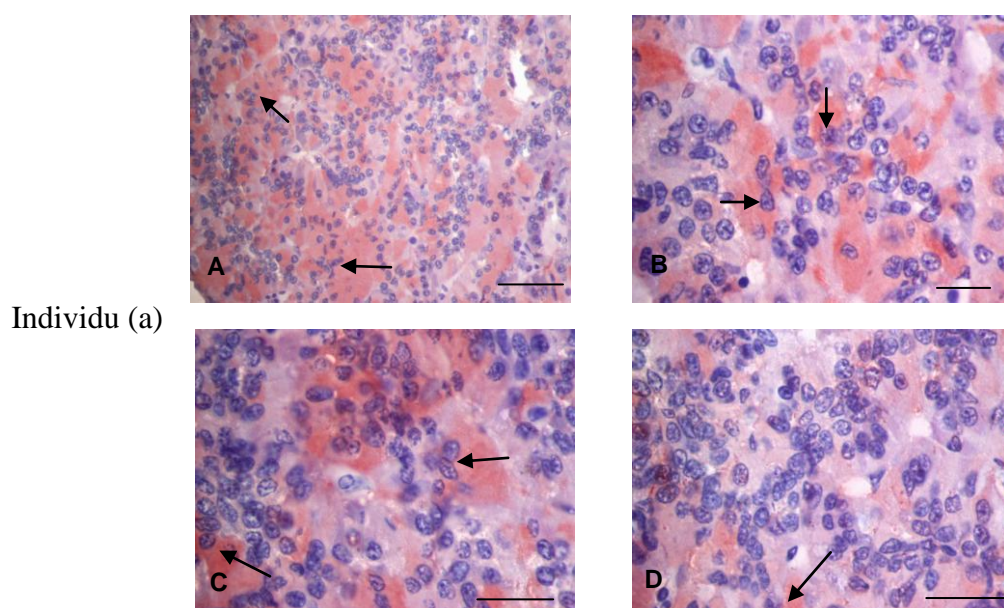


Figure 45 : Recherche de la FSH au niveau des parties médianes et latérales de l'adénohypophyse de *Bufo mauritanicus*. Les flèches indiquent le marquage cytoplasmique des cellules gonadotropes. A et B: parties médianes de l'adénohypophyse. A: Grossissement. 40. B: Grossissement. 100. C et D: parties latérales de l'adénohypophyse. C: Grossissement. 40. D: Grossissement. 100. Dilution de l'anticorps 1/75. La barre d'échelle indique 50  $\mu$ m.

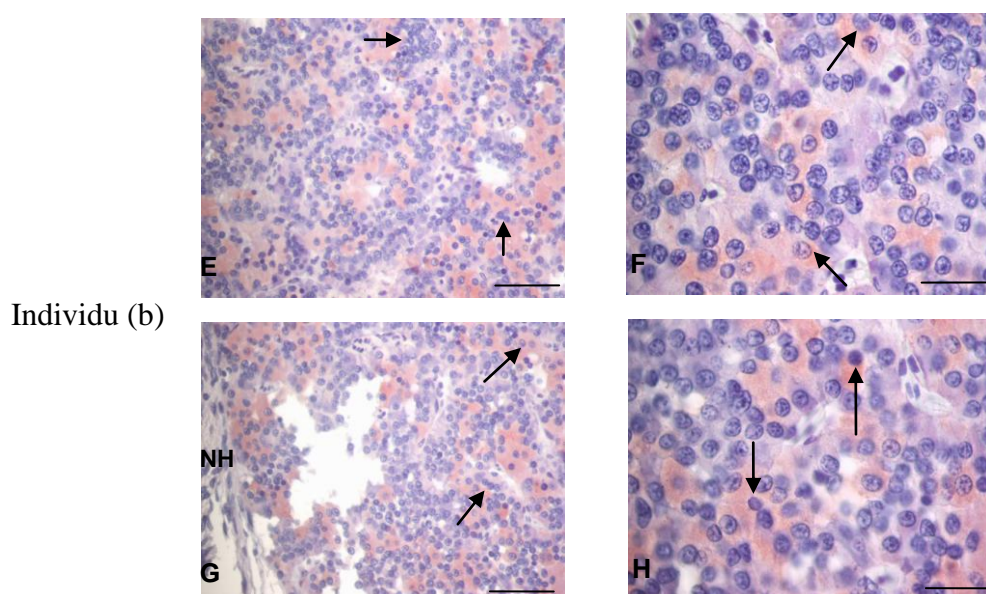


Figure 46 : Recherche de la FSH au niveau des parties médianes et latérales de l'adénohypophyse de *Bufo mauritanicus*. Les flèches indiquent le marquage cytoplasmique des cellules gonadotropes. E et F: parties médianes de l'adénohypophyse. E: Grossissement. 40. F: Grossissement. 100. G et H: parties latérales de l'adénohypophyse. NH: neurohypophyse. G: Grossissement. 40. H: Grossissement. 100. Dilution de l'anticorps 1/75. La barre d'échelle indique 50  $\mu$ m.

Pendant la phase de croissance folliculaire, l'effet de l'hormone gonadotrope sécrétée par les cellules hypophysaires est lié à la croissance des follicules et à l'ovogenèse (Exbrayat, 1992 ; Pujol et Exbrayat, 1998). Cette hormone provoque la maturation des follicules qui, à leur tour, sécrètent des oestrogènes.

#### **IV.6. Comparaison du développement sexuel de *Bufo mauritanicus* avec d'autres Amphibiens**

Peu de travaux ont été consacrés à la biologie de la reproduction de *Bufo mauritanicus*. Notons cependant la description du cycle de reproduction des mâles de cette espèce (Kisserli et Exbrayat, 2006) qui fait l'objet de ce présent travail. Néanmoins, nous citons les travaux réalisés antérieurement chez une espèce de la même famille décrivant les aspects de la reproduction du crapaud *Bufo regularis* (Pujol, 1985).

Les études histologiques et immunohistochimiques de la biologie de la reproduction de *Bufo mauritanicus* ont mis en évidence un cycle de reproduction de type continu. Toutes les catégories de cellules spermatiques ou ovogénétiques sont présentes dans tous les prélèvements quelle que soit la période du cycle annuel de reproduction. Ce type de cycle est identique à celui qui a été décrit chez de nombreuses espèces africaines (Pujol, 1985 ; Exbrayat *et al.*, 1998 ; Van Wyk *et al.*, 2005). Il apparaît ainsi que les Anoures africains étudiés présentent tous un cycle de type continu sauf *Nectophrynoïdes occidentalis* (Gavaud, 1975). Ce type de cycle pourrait correspondre à un modèle de base dont l'un des avantages sélectifs serait de présenter une grande souplesse d'adaptation aux variations climatiques parfois irrégulières.

##### **IV.6.1. Structure testiculaire**

Comme chez les autres anoures, le testicule de *Bufo mauritanicus* apparaît composé de tubes séminifères à paroi très mince entre lesquels se développent le tissu interstitiel, les vaisseaux sanguins et les canaux efférents évacuateurs. A l'intérieur de ces tubes, on reconnaît des amas cellulaires constitués de cellules de même type, appelés cystes. Chaque tube séminifère contient des cystes à des stades différents de la spermatogenèse (Gueydan-Baconnier, 1980 ; Pujol, 1985 ; Kisserli et Exbrayat, 2006). Il s'agit donc des cystes à spermatogonies, des cystes à spermatocytes I et II, des spermatides et enfin des spermatozoïdes libres et en faisceaux.

La distribution des spermatogonies primaires et des autres catégories spermatogénétiques ne semble pas se faire selon des régions particulières. De manière générale les coupes testiculaires paraissent homogènes.

#### **IV.6.2. Données sur le cycle de reproduction des mâles**

Les Amphibiens peuvent présenter trois types de cycles énoncés dans le chapitre II : les cycles à spermatogenèse discontinue, potentiellement continue ou continue (Galgano, 1952 ; Delsol *et al.*, 1981, 1995 ; Neyrand de Leffemberg et Exbrayat, 1995 ; Pujol et Exbrayat, 1996). De nombreux travaux ont porté sur les cycles de reproduction des Anoures et des Urodèles, par contre peu de travaux sont consacrés aux Gymnophiones qui de manière générale possèdent un cycle de reproduction de type discontinu avec une phase d'activité et une phase de repos sexuel (Exbrayat, 2006 ; Exbrayat *et al.*, 1997) bien que récemment, Malonza et Measey (2005), puis Raquet *et al* (2007) aient mis en évidence des cycles de reproduction de type continu chez le Gymnophione africain *Boulengerula taitanus*. Chez les Urodèles, de nombreux Salamandridae mâles et femelles ont également été étudiés. C'est le cas de *Salamandra salamandra* dont le cycle sexuel mâle est de type discontinu (Joly, 1971).

Selon Lofts (1974), chez les vertébrés, la différenciation des cellules germinales mâles est un processus hautement ordonné. La cinétique de la spermatogenèse des Amphibiens n'est cependant pas toujours directement déductible de la fréquence des catégories de cellules germinales présentes dans les testicules (Kalt, 1976).

Le cycle de reproduction des mâles de *Bufo mauritanicus* est comparable à celui d'autres amphibiens (Figure 47). Dans ce type de cycle à spermatogenèse continue, toutes les catégories germinales sont présentes en même temps dans un même tube séminifère.



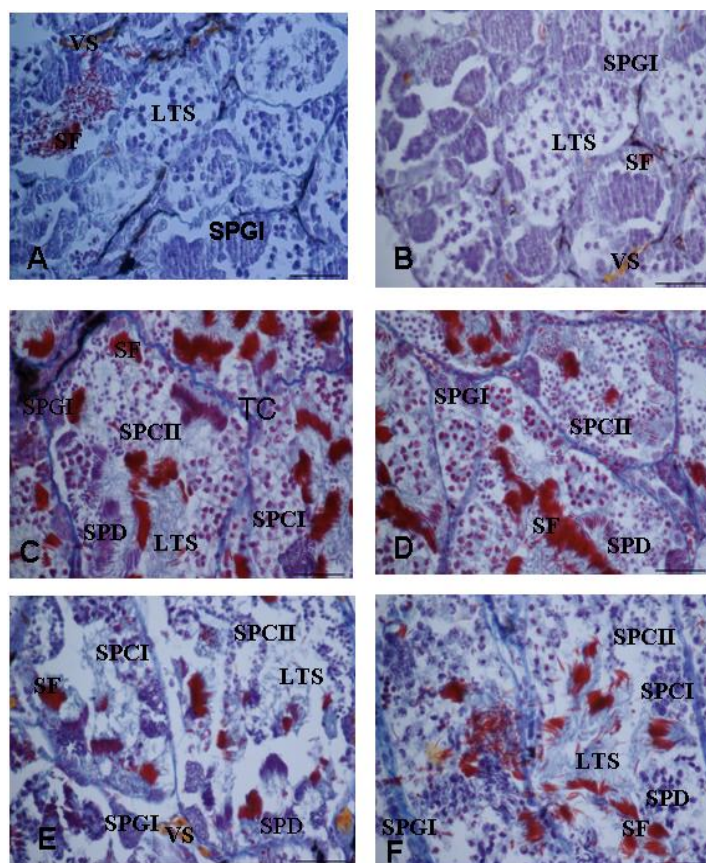


Figure 47 : Topographie et vue d'ensemble des différentes coupes histologiques de testicules de *Bufo mauritanicus* au cours du cycle annuel de reproduction 2003-2004. SPG I : spermatogonie I, SPC I : spermatocyte I, SPC II : spermatocyte II, SPD: spermatide, SF: spermatozoïde en faisceaux, LTS: lumière du tube séminifère, TC : tissu conjonctif, VS: vaisseaux sanguins. A et B : individu du mois d'avril, C : individu du mois de novembre, D : individu du mois de septembre, E : individu du mois de juillet, F : individu du mois d'août. La barre d'échelle indique 50µm.

La formation de spermatozoïdes se fait ainsi toute l'année avec une période plus active au moment de la reproduction et pendant toute l'année, des spermatozoïdes sont observés, certains attachés aux cellules de Sertoli et d'autres libres dans la lumière des tubes séminifères et des canaux évacuateurs, ce qui suggère une évacuation continue. Toutes les étapes de la spermatogenèse sont ainsi présentes simultanément dans un même tube séminifère. L'étude cinétique d'un tel type de cycle a été effectuée chez d'autres anoures africains : *Xenopus laevis* (Kalt, 1976), *Bufo regularis*, *Phrynobatrachus calcaratus*, *Ptychadena macCarthyensis* *Ptychadena oxyrhynchus*, chez lesquels l'influence de la température sur le dynamisme de la spermatogenèse a été déterminé (Gueydan-Bacconnier *et al.*, 1984b ; Neyrand de Leffemberg et Exbrayat, 1995).

L'étude quantitative de la spermatogenèse de *Bufo mauritanicus* a été menée sur les testicules gauches de 12 animaux. Pour cela, l'évolution du nombre moyen des spermatozoïdes en faisceaux, les variations de la surface testiculaire et le nombre moyen de tube séminifère au cours du cycle annuel de reproduction ont été estimés. L'analyse de la variance de chaque paramètre a montré des différences hautement significative selon les mois de prélèvement. Les stades de la lignée spermatique ont été décrits chez les anoures (Witschi, 1924 ; Van Oordt, 1956 ; Basu, 1968 ; Delsol *et al.*, 1980, 1981, 1995 ; Exbrayat *et al.*, 1998 ; Gueydan-Baconnier, 1980 ; Gueydan-Baconnier *et al.*, 1984a, b ; Pujol, 1985 ; Pujol et Exbrayat, 1996, 2000, 2002 ; Van Wyk *et al.*, 2005 ; Du Preez *et al.*, 2005). Gueydan-Baconnier (1980), étudiant le cycle annuel du testicule de *Phrynobatrachus calcaratus* a noté des variations saisonnières de la surface testiculaire.

#### **IV.6.3. Données sur le cycle de reproduction des femelles et étude quantitative des ovaires**

La cinétique de l'ovogenèse conduisant à un nombre variable d'ovocytes de diverses tailles varie selon les espèces d'amphibiens (Beyo *et al.*, 2008). Ces variations sont attribuables aux conditions de l'adaptation des espèces aux divers environnements dans lesquels elles pondent leurs œufs et qui assurent ainsi leur développement (Del Pino, 1989 ; Villecco *et al.*, 1996, 2000 ; Uribe, 2001, 2003 ; Sanchez et Villecco, 2003 ; Exbrayat, 2006). Chez les amphibiens, les ovogonies contenues dans l'ovaire adulte génèrent chaque année une nouvelle cohorte d'ovocytes (Van Voorhis, 1999).

Chez les gymnophiones *Dermophis mexicanus* (Wake, 1980) et *Typhlonectes compressicauda* (Exbrayat, 1983, 1986a ; Exbrayat et Delsol, 1985) le cycle ovogénétique est biennal.

Les *Bufo regularis* femelles présentent un cycle sexuel de type continu de sorte que les différents stades de follicules ovariens sont observés tout au long de l'année (Pujol, 1987). Chez cette espèce, cinq stades ovogénétiques ont été distingués incluant les follicules en début d'atrésie (stade IV) et les follicules atrétiques dégénérés (stade V). Pour comparer nos résultats avec ceux qui ont été obtenus chez *Bufo regularis*, nous avons étudié quelques échantillons de collection d'ovaires de cette espèce provenant de Lomé (Togo) et nous avons réalisé une série de coupes histologiques. Les résultats obtenus illustrés dans la figure 48 étaient parfaitement comparables à ceux qui avaient été obtenus chez *Bufo mauritanicus*. Tous les stades ovogénétiques étaient identifiés au niveau des coupes histologiques réalisées.

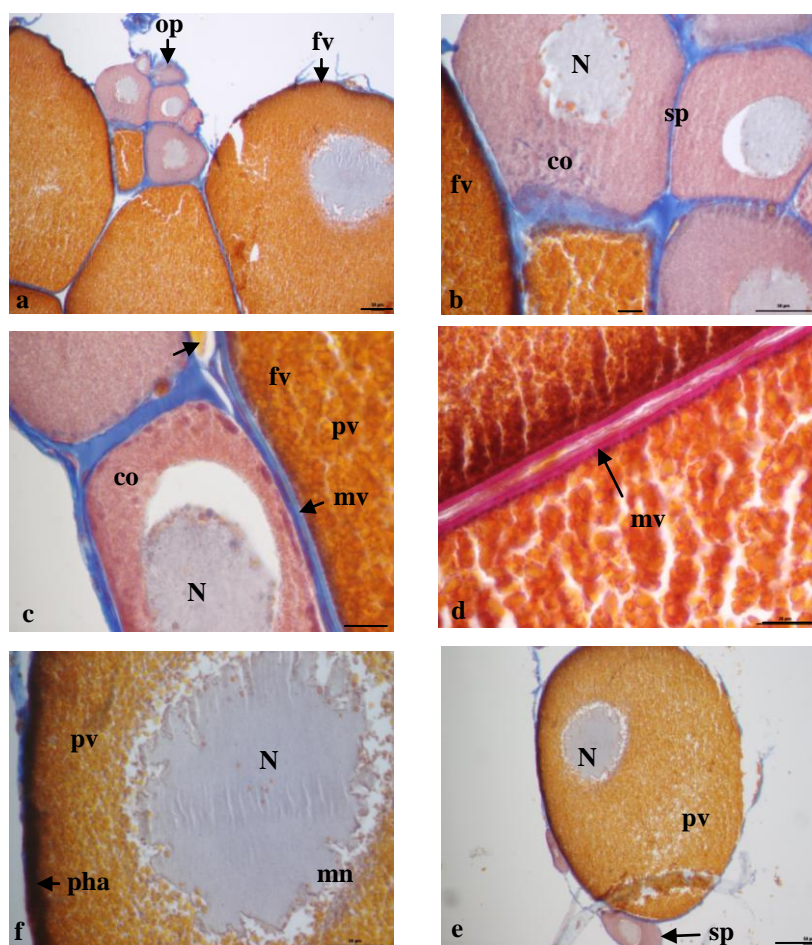


Figure 48 : La folliculogénèse chez le crapaud *Bufo regularis* Reuss, 1834. a, b et c : représentation des différents stades ovogénétiques, d : nature mucopolysaccharidique de la membrane vitelline chez *Bufo regularis*, f : pigmentation polaire du follicule en vitellogenèse, e : migration polaire du noyau ovocytaire. op : ovocytes prévitellogéniques, fv : follicule en vitellogenèse, N : noyau, co : cytoplasme ovocytaire, sp : stade prévitellogénique, pv : plaquettes vitellines, mv : membrane vitelline, pha : pigmentation de l'hémisphère animal, mn : membrane nucléaire. La barre d'échelle indique 50 $\mu$ m.

L'étude quantitative a permis de montrer que l'évolution des follicules ovariens est continue aussi bien chez *Bufo mauritanicus* de la zone humide de Beni-Belaïd que chez *Bufo regularis* capturé à Lomé (Togo)(Pujol, 1985 ; Pujol, 1987 ; Pujol et Exbrayat, 2002). Les étapes de l'évolution des follicules sont toutes présentes dans les ovaires quelle que soit la période de l'année. La migration polaire du noyau ovocytaire est visible aussi bien chez *Bufo mauritanicus* que chez *Bufo regularis*.

Pujol et Exbrayat (1998) ont démontré chez *Bufo regularis* la présence de cinq stades ovogénétiques, le stade I représentant ainsi des ovocytes prévitellogéniques, le stade II des ovocytes en début de vitellogenèse, le stade III des ovocytes en vitellogenèse alors que les

stades IV et V représentent chez cette espèce les follicules en début d'atrésie et les follicules atrétiques dégénérés. Dans notre propre étude, les stades IV et V représentent chez *Bufo mauritanicus* des ovocytes en vitellogenèse. Concernant la différenciation des stades prévitellogéniques, nous avons choisi de prendre comme critères de classification l'évolution de la taille des ovocytes, de la taille des noyaux et la morphologie de la membrane nucléaire.

Les critères de mise en évidence des stades ovogénétiques de *Xenopus* sont basés sur une échelle développée par James Dumont, qui permet l'identification des différents stades par l'aspect morphologique des ovocytes non fixés (Dumont, 1972). Cette classification est basée sur les caractéristiques cytologiques et les paramètres physiologiques des ovocytes en développement. Les caractéristiques ainsi décrites constituent la base pour identifier le stade approximatif du développement et par conséquent de prévoir les processus physiologiques se produisant dans un ovocyte donné. Etant donné que l'ovogenèse est un processus continu, il n'existe pas de limites précises qui peuvent être définies entre les différents stades identifiés.

Chez *Xenopus laevis*, cinq stades ovogénétiques distincts l'un de l'autre ont été mis en évidence en considérant le diamètre et plusieurs modifications morphologiques qui sont observées dans la paroi de l'ovaire, dans le cytoplasme et au niveau des cellules folliculaires lors de la croissance ovocytaire (Rasar et Hammes, 2006 ; Hausen et Riebesell, 1991).

Chez *Bufo arenarum* femelle, au cours de la période de repos sexuel, les ovocytes accomplissent leur croissance et certains peuvent être trouvés dans l'ovaire à l'état immature ; leur évolution est ainsi arrêtée à la prophase de la première division méiotique (Masui, 1985).

Suite à une étude récemment effectuée chez un amphibien Gymnophione, *Boulengerula taitanus*, des observations histologiques de l'ovaire ont montré que les follicules ovariens classés selon leur taille et les caractéristiques cytologiques de l'ovocyte et de la granulosa suivent un cycle continu (Raquet *et al.*, 2006). Chez *Typhlonectes compressicauda*, six stades ovogénétiques ont été identifiés pendant le développement folliculaire (Exbrayat, 2006).

Certaines données indiquent que la maturation des ovocytes est déclenchée par l'intermédiaire d'un mécanisme en deux étapes, dans lequel les hormones gonadotropes stimulent les cellules folliculaires à la production de stéroïdes qui, à leur tour, agissent directement sur l'ovocyte pour provoquer la maturation méiotique (Masui, 1967 ; Smith *et al.*, 1968).

Il est bien établi que l'oestradiol exogène peut stimuler la synthèse des protéines vitellines au niveau du foie des mâles et des femelles d'amphibiens (Wallace et Bergink, 1974). Fortune et Tsang (1981) ont trouvé que les ovaires du xénope contiennent et sécrètent du 17 $\beta$ -oestradiol.

Dans une étude réalisée sur la production de stéroïdes par les follicules ovariens de xénope à différents stades de développement, les résultats obtenus par Fortune (1983), indiquent que la sécrétion endogène d'oestradiol commence quand les follicules deviennent vitellogéniques (stade III). La sécrétion est plus importante lorsque l'accumulation de vitellus devient plus rapide (stade IV), et elle diminue au cours de la vitellogenèse (stade V). Par conséquent, il semble probable que les hormones gonadotropes appliquées *in vivo* favorisent la vitellogenèse par la médiation de l'oestradiol synthétisé par les follicules de taille moyenne.

Les follicules ovariens de xénope sont soumis à trois stades de développement en termes de sécrétion d'hormones stéroïdes: les petits follicules sécrètent très peu d'oestradiol ; ceux de taille moyenne et les follicules en vitellogenèse sont actifs dans la production d'oestradiol (Fortune, 1983).

L'étude immunohistochimique des organes de reproduction de *Bufo mauritanicus* a révélé des résultats similaires à ceux obtenus chez *Typhlonectes compressicauda*, tels que la mise en évidence du  $17\beta$ -oestradiol dans les cellules de la granulosa d'un follicule mature (Exbrayat, 1993 ; Exbrayat et Morel, 1997).

#### **IV.7. Etude préliminaire de l'hypophyse**

Les corrélations entre l'activité hypophysaire et l'évolution des follicules ovariens ou du cycle spermatogénétique en fonction du cycle annuel de reproduction n'ont pas pu faire l'objet de ce travail en raison d'un échantillonnage trop faible. Cependant, une approche topographique de l'organisation structurale de l'hypophyse de *Bufo mauritanicus* a été réalisée grâce à des méthodes de coloration classiques et par l'utilisation, de méthodes immunohistochimiques sur des hypophyses appartenant à des individus échantillonnés au cours du mois de septembre de l'année 2006.

Aussi bien chez les Anoures que chez les Gymnophiones et les Urodèles, la glande pituitaire a fait l'objet de nombreux travaux concernant notamment les modifications cytologiques. Chez *Rana pipiens*, des cellules basophiles dont le nombre et l'aspect varient au cours de l'évolution du cycle sexuel ont été étudiées par Zahl (1935). D'autres travaux portent également sur la cytologie fine des catégories cellulaires de l'hypophyse appuyée par une étude comparative au microscope photonique et électronique chez *Bufo vulgaris* Laur et *Xenopus laevis* D (Doerr-Schott, 1965 a et b). Les variations cytologiques de l'hypophyse distale de *Nectophrynoïdes occidentalis* mâle et femelle ont été étudiées par Zuber-Vogeli (1966, 1968).

L'étude histologique de la *pars distalis* chez le mâle et la femelle de *Bufo regularis* a permis de mettre en évidence les cellules gonadotropes et lactotropes (Pujol et Exbrayat, 1996, 2002). Pujol et Exbrayat (1998) ont décrit une étude morphométrique de la surface des coupes hypophysaires de *Bufo regularis* femelle adulte avec l'établissement des corrélations entre la glande pituitaire, le développement ovarien et les conditions saisonnières.

Certains travaux ont analysé l'effet des hormones stéroïdes et hypophysaires sur la reproduction des Anoures. Itoh et Ishii (1990) ont démontré que l'augmentation des hormones stéroïdes dans le plasma de *Bufo japonicus* lors de l'amplexus, dépendait de l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

Dans une étude effectuée par Doerr-Schott et Dubois (1972), les cellules gonadotropes ont été identifiées par l'utilisation de la technique de cytoimmunologie chez trois espèces d'Amphibiens, les Anoures *Rana temporaria* et *Bufo vulgaris*, l'Urodèle *Triturus marmoratus*.

L'hypophyse des Amphibiens Gymnophiones a fait également l'objet des études essentiellement morphologiques (Wingstrand, 1966), anatomiques accompagnées d'une étude cytologique approfondie chez *Ichthyophis glutinosus* (Gabe, 1972). Chez *Typhlonectes compressicauda*, des études concernant la description morphologique, cytologique et immunohistochimique de l'adénohypophyse ont été réalisées (Zuber-Vogeli et Doerr-Schott, 1981 ; Doerr-Schott et Zuber-Vogeli, 1984). Exbrayat (1989) ; Exbrayat et Morel (1991) ont étudié chez cette même espèce les modifications cytologiques du lobe distal de l'hypophyse pendant l'activité saisonnière des cycles aussi bien chez les mâles que chez les femelles adultes. L'examen cytologique de l'hypophyse à différentes périodes du cycle de reproduction a révélé chez *Typhlonectes compressicauda* des variations volumétriques des cellules gonadotropes et lactotropes (Exbrayat et Morel, 1991 ; Exbrayat, 1992).

L'hypophyse d'un certain nombre de lézards a été étudiée tant au point de vue morphologique et histologique (Saint Girons, 1976) qu'au point de vue hystophysiolgique (Bons, 1973). Diverses caractéristiques ultrastructurales ont été définies (Doerr-Schott, 1976). Zuber-Vogeli et Lemire (1982) ont mis en évidence les caractéristiques ultrastructurales de différentes cellules de l'adénohypophyse du Lézard saharien, *Uromastix acanthinura*. Des études immunohistochimiques et ultrastructurales des cellules gonadotropes chez cette même espèce femelle au cours du cycle de reproduction ont été étudiées (Hammouche *et al.*, 2002 ; Hammouche *et al.*, 2007). Desantis *et al* (1998) suite à une étude immunohistochimique ont montré la localisation de la FSH et de la LH dans la glande pituitaire du mâle adulte de *Podarcis sicula campestris* De Betta pendant la période de reproduction.

## *Conclusion générale*

L'étude du cycle annuel de reproduction de *Bufo mauritanicus* prélevé de la zone humide de Beni-Bélaïd dans la région de Jijel a permis d'aborder la stratégie du développement sexuel de cette espèce via les différentes techniques d'histologie, d'histochimie et d'immunohistochimie.

En effet, l'analyse du cycle annuel de reproduction concernait un échantillonnage au hasard de 39 individus de cette espèce en fonction des mois de l'année 2003-2004 répartis entre 12 individus mâles et 27 femelles dont les taux de capture respectifs sont 30,77 % et 69,23 %.

Une étude biométrique des caractéristiques liées au sexe est indispensable pour mieux apprécier le développement sexuel de *Bufo mauritanicus*. Des variations importantes de la masse corporelle observées chez les mâles et les femelles ont montré chez ces dernières, que le poids moyen du corps est le siège d'importantes variations selon les classes de longueur prises en considération. Le développement sexuel de *Bufo mauritanicus* présente chez les femelles des valeurs moyennes du rapport gonado-somatique supérieures à celles des mâles. Selon Pujol et Exbrayat (1998), ce rapport est lié à plus d'ovocytes et de follicules volumineux.

Les variations saisonnières des organes de reproduction de cette espèce au cours du cycle annuel indiquent que les saisons semblent affecter le poids de ces organes. Le poids maximal moyen du testicule est de 0,14g durant l'été de l'année 2003 alors que celui des ovaires est égal à 5,93g enregistré au printemps 2004. La masse des gonades croît en fonction de la masse du corps de l'animal chez les mâles et les femelles. En fonction du sexe et des saisons de l'année, le poids moyen du corps de l'animal atteint une valeur maximale.

L'étude actuelle portant sur des investigations histologiques et immunohistochimiques ont permis donc de mettre en évidence l'évolution du cycle sexuel de reproduction chez *Bufo mauritanicus* sachant bien que le nombre des individus mâles et femelles de cette espèce et la fréquence de leur échantillonnage sont insuffisants pour décrire de manière définitive le développement sexuel de cet amphibien anoure. Néanmoins, ces études ont permis de souligner la présence des différents stades spermatogénétiques et ovogénétiques au cours du cycle annuel de reproduction de l'espèce étudiée. Il en ressort alors par le biais de cette étude que le cycle de reproduction de *Bufo mauritanicus* est de type continu. Ces méthodes sont particulièrement précises et permettent la mise en évidence de la distribution des différentes catégories cellulaires dans les testicules et les ovaires à différentes périodes du cycle.



Chez les individus mâles de *Bufo mauritanicus*, l'étude histologique des testicules indique la présence permanente de toutes les catégories cellulaires de la lignée spermatique et que les spermatozoïdes sont ainsi présents pendant toute l'année, ancrés dans les cellules de Sertoli prêts à être libérés dans la lumière du tube séminifère et que les variations saisonnières de pluviométrie et de température sont sans effet sur ces différentes catégories spermatogénétiques.

La formation des spermatozoïdes se fait toute l'année avec une période plus active au moment de la reproduction. L'étude cinétique d'un tel type de cycle a été effectuée chez *Xenopus laevis* (Kalt, 1976). Pierantoni *et al* (2002) ont noté que le testicule des amphibiens est considéré comme un modèle pour étudier la progression des cellules germinales pendant la spermatogenèse. Ainsi, le cycle spermatogénétique paraît remarquablement continu suivant la définition donnée par certains auteurs (Witschi, 1924 ; Cei, 1949), c'est-à-dire une spermatogenèse qui se poursuit toute l'année.

Le suivi de l'état spermatogénétique au cours du cycle annuel de reproduction est réalisé dans cette étude selon une approche quantitative des testicules gauches de 12 animaux portant sur l'évolution du nombre moyen de spermatozoïdes en faisceaux, la variation de la surface moyenne testiculaire et l'évolution du nombre moyen des tubes séminifères. Le nombre de tubes séminifères est constant et comparable chez tous les animaux étudiés, quel que soit la période de prélèvement. L'analyse de la variance pour ces différents paramètres montre l'existence d'une différence hautement significative.

En effet, malgré la continuité du cycle, le nombre moyen de spermatozoïdes en faisceaux subit des variations au cours du cycle annuel pour atteindre un maximum en août, alors qu'il est minimal en avril, c'est-à-dire juste après la période de reproduction, selon les observations effectuées sur le terrain (présence des pontes).

La présente étude a révélé que le cycle de reproduction de *Bufo mauritanicus* est en fonction de la saison printanière au moment où les températures de l'année deviennent douces et clémentes (Kisserli et Exbrayat, 2006). Il semble bien que cette période est privilégiée pour la reproduction. Chez les espèces à cycles continus, la gamétogenèse est constante tout au long de l'année. Lorsque les facteurs externes (température, pluviométrie) sont favorables, la reproduction est déclenchée.

La dynamique du cycle ovogénétique chez *Bufo mauritanicus* selon des critères de classification bien étudiés et choisis met en évidence un répertoire de follicules ovariens en

fonction des grandes phases de prévitellogenèse et de vitellogenèse. Cinq stades de développement des ovocytes et follicules ont été définis chez la femelle de cette espèce.

Les études histochimiques ont révélé la présence des lipides au niveau des organes de reproduction mâles et femelles de *Bufo mauritanicus*. D'une part, leur mise en évidence concernait les cellules de Leydig au niveau des gonades mâles alors que chez les femelles, les lipides paraissent inféodés au niveau des cellules de la granulosa, voire de la thèque de l'ovocyte du stade III.

L'étude immunohistochimique présente un intérêt particulier dans la mise en évidence d'un réel tissu endocrine au sein des organes de reproduction de *Bufo mauritanicus*. Dans les gonades femelles de cette espèce, les cellules folliculeuses et de la thèque conjonctive du follicule jouent un rôle déterminant pour la stéroïdogenèse du fait qu'au niveau des stades prévitellogéniques et vitellogéniques, le  $17\beta$ -oestradiol est localisé seulement dans ce type de cellules folliculaires. Chez *Typhlonectes compressicauda*, Amphibien Gymnophione, la localisation de cette hormone a été observée au niveau des cellules folliculaires juste avant l'ovulation (Exbrayat et Morel, 1997).

Dans cette étude, la glande pituitaire n'a pas fait l'objet d'un travail détaillé du fait que le nombre d'échantillonnage était à cela insuffisant pour mieux apprécier l'expression et le rôle endocrinien dans le développement sexuel de *Bufo mauritanicus*. Il serait donc intéressant à l'avenir de mettre en évidence sur une gamme importante en individus de cette espèce, d'une part, une évaluation du coefficient d'occupation spermatogénétique afin de suivre le dynamisme de l'activité spermatogénétique proprement dite tout au long de l'année et d'autre part, les corrélations entre l'activité hypophysaire et l'évolution des follicules ovariens et du cycle spermatogénétique en fonction du cycle annuel de reproduction.

Vu également que cette espèce présente un intérêt agronomique, il est donc nécessaire de prévoir une étude sur son niveau trophique et les interactions qu'elle présente avec le milieu auquel cette espèce est inféodée pour mettre en relief certaines caractéristiques et l'importance du régime alimentaire de ce crapaud au cours du développement sexuel et cerner ainsi son comportement reproductif.

L'apport de ces études histologiques et immunohistochimiques à la biologie de la reproduction de *Bufo mauritanicus* a permis de mettre en évidence une évolution continue du cycle de reproduction. En effet, les observations menées au niveau des testicules et ovaires de

cet amphibien anoure ont montré que les lignées spermatogénétiques et ovogénétiques sont présentes quelques que soit la période de prélèvement en fonction du cycle annuel de reproduction.

Il serait également important et nécessaire de mettre en place une station d'élevage dans les mêmes conditions que le milieu naturel, pour mieux apprivoiser cette espèce dans le but d'approfondir et d'apporter de nouvelles connaissances sur la biologie de la reproduction de *Bufo mauritanicus*.

## *Références bibliographiques*

- Arends, M. J., Morris, R. G. et Wyllie, A. H. 1990 - Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136: 593-608.
- Badhuri, J.L. 1953 – A study of the urogenital system of salientia. *Zool. Soc. Bengal. Calcutta.* 6 (1) : 1-75.
- Bagnouls, F. et Gaussen, H. 1953 - Saison sèche et indice xérothermique. *Bull. soc. Hist. Nat., Toulouse*, pp 193-239.
- Barbault, R. 1974 - Le régime alimentaire des amphibiens de la savane de Lamto (côte d'Ivoire). *Bull. I.F.A.N. T.XXXVI, sér. A, n°4*, pp 953-972.
- Barth, L.G. et Barth, L.J. 1954 – *The Energetics of Development*. Columbia Univ Press , New York, 117 p.
- Basu, S.L. 1962 – Impact of some endo and exogenous factors on the spermatogenesis of common india toad *Bufo melanostictus* Schneider. *Proc. Zool. Soc. India*, 15.
- Basu, S.L. 1968 – Effects of testosterone and estrogen on spermatogenesis in *Rana hexadactyla* Lesson. *J. Exp. Zool.*, 169: 133-139.
- Basu, S.L. et Mondal, A. 1961 - The normal spermatogenetic cycle of the common Indian frog, *Rana tigrina* Daud. *Folia Biologica*, V. 9, pp.135-142.
- Benessaiah, N. et Belhaj, M. 1998 – Aspects socio-économiques des zones humides méditerranéennes. MedWet. Convention sur les zones humides, Tunisie, 167p.
- Benhalla, M. 1997 – La zone humide de Beni-Bélaïd (wilaya de Jijel). Synthèse des études et proposition d'un avant projet de plan de gestion. Direction générale des forêts, Direction de la flore et de la faune, Projet MedWet 2, Algérie, 27p.
- Berchiche, T. 1997 – Etude socio-économique d'une zone humide algérienne : cas du site de Béni-Bélaïd (Jijel). 115p.
- Bern, H.A. et Nicoll, C.S. 1969 – The taxonomic specificity of prolactins. Progress in Endocrinology, *Excerpta Medica*, Amsterdam, 433-439.
- Bernardini, C., Podini, P., Maci, R. et Carnatini, M. 1990 – Spermiogenesis in *Xenopus laevis* : from late spermatids to spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 26: 347-355.
- Beyo, R.S., Divya, L. et Smita, M. 2008 – Stages in follicle cell/oocyte interface during vitellogenesis in caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii*: a transmission electron-microscopic study. *Cell. Tissue. Res.*, 331: 519-528.
- Billard, R., Solari, A. et Escaffre, A.M. 1974 – Méthode d'analyse quantitative de la spermatogénèse des poissons Téléostéens. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 14(1): 87-104.

- Bons, J. 1973 – Reptiles du sud marocain récoltés en 1971 et 1972 par les chercheurs de la CRP 249. Etude de certains milieux du Maroc et de leur évolution récente. I. Travaux de la CRP 249. C.N.R.S., 1231 – 1238.
- Boumezbeur, A. et Ameur, N. 2003- Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar. Réserve naturelle du Lac de Beni-Belaid, Wilaya de Jijel. Direction générale des forêts, 7 p.
- Bramucci, M., Miano, A., Gobbetti, A., Zerani, M., Quassinti, L., Maccari, E., Murri, O. et Amici, D. 1997 - Different modulation of steroidogenesis and prostaglandin production in frog ovary in vitro by ACE and ANG II. *Am. J. Physiol.* 273: 2089 - 2096.
- Brummett, A.R. et Dumont, J.N. 1977 – Intracellular transport of vitellogenin in *Xenopus laevis* oocytes: an autoradiographic study. *Dev. Biol.* 60: 482 – 486.
- Burgos, H.M. and Fawcett, D.W. 1956 – An electron microscope study of spermatid differentiation in the toad, *Bufo arenarum* Hensel. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 223 - 240.
- Canosa, L.F. et Ceballos, N.R. 2002 - Seasonal changes in testicular steroidogenesis in the toad *Bufo arenarum* H. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125: 426 – 434.
- Canosa, L.F., Pozzi, A.G., Somoza, G.M. et Ceballos, N.R. 2002 – Effects of mammalian GnRH on testicular steroidogenesis in the toad *Bufo arenarum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 127: 174 -180.
- Canosa, L.F., Pozzi, A.G., Rosembli, C. et Ceballos, N.R. 2003 – Steroid production in toads. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 85: 227 - 233.
- Cei, G. 1942 – Prime osservazioni sui fattori che regolano il ciclo spermatogenetico periodica nella *Rana temporaria* L.: e ereditarie influenze ambientali. *Monit. Zool. Ital.*, 53 : 131-151
- Cei, G. 1944 – Analisi biogeografica e ricerche biologiche sperimentali sul ciclo sessuale annuo della *Rana rossa* d'Europa. *Monit. Zool. Ital.*, 54.
- Cei, J.M. 1949 – El ciclo sexual y el predominio de la spermatogenesis anual continua en batracios chaquenos. *Acta. Zool. Lilloana*, 7 : 527-544.
- Cei, J.M. 1965 – Ciclos gametogenicos continuos y discontinuos en Anuros neotropicales. Acta III Congreso, Latino-Americano de Zool., Santiago de Chile, Investigaciones. Zool. Chil.
- Champy, C. 1913 – Recherches sur la spermatogenèse des batraciens et les éléments accessoires du testicule. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 52: 13-304.
- Champy, C. 1923 – La spermatogenèse chez *Discoglossus pictus* (otth). Comparaison avec celles des autres Discoglossidés et des vertébrés en général. *Arch. Zool. Gen.* 62: 1-52.

- Champy, C. et Coujard, R. 1939 – Observations cytologiques et biologiques sur la spermatogenèse de quelques batraciens et les caractères sexuels secondaires. *Arch. Zool.* 8I, 78.
- Chieffi, G. et Lupo, C. 1963 – Identification of sex hormones in the ovarian extracts of *Torpedo marmorata* and *Bufo vulgaris*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 3: 149-152.
- Chieffi, G., Pierantoni, R. et Fasano, S. 1991 – Immunoreactive GnRH in hypothalamic and extrahypothalamic areas. *Int. Rev. Cytol.* 127: 1-55.
- Chillasse, L., Dakki, M. et Thevenot, M. 2002 – Régime alimentaire de deux espèces de Bufonidae (*Bufo bufo spinosus* et *Bufo mauritanicus*) au lac Aguelmam Azegza (Maroc). *Alytes*, Vol. 20, n° 1-2, pp. 44-54.
- Chun, S. Y., Billig, H., Tilly, J. L., Furuta, I., Tsafiriri, A. et Hsueh, A. J. 1994 - Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, 135: 1845-53.
- Chun, S. Y., Eisenhauer, K. M., Minami, S., Billig, H., Perlas, E. et Hsueh, A. J. 1996 - Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*, 137: 1447-1456.
- Combarrous, Y. 1991 – Les gonadotropines : structure – synthèse – fonctions. In « *La reproduction chez les mammifères et l'homme* » : Thibault, C et Levasseur, M.C. (Eds). Ellipses, INRA, Paris, pp 53-68.
- Dagnélie, P. 1975 - Théorie et méthodes statistiques: applications agronomiques. Ed. Les Presses Agronomiques de Gembloux, Vol. 2, Belgique, 463 p.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., W., G., Hotz, M. A., Lassota, P. et Traganos, F. 1992 - Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13: 795-808.
- De Belair, G., Houhamdi, M., Abbachi, H. et Samraoui, B. 1997 – Béni-Bélaïd, Wilaya de Jijel, un projet de réserve naturelle, 21p.
- Delgado, M.J., Gutiérrez, P. et Alonso-Bedate, M. 1989 - Seasonal cycles in testicular activity in the frog, *Rana perezi*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73: 1–11.
- Del Pino, E.M. 1989 – Modifications of oogenesis and development in marsupial frogs. *Development.* 107: 169-187.
- Del Pino, E.M., Steibeisser, H., Hofmann, A., Dreyer, C., Campos, M. et Trendelenburg, M.F. 1986 – Oogenesis in the egg-brooding frog *Gastrotheca riobambae* produces large oocytes with fewer nucleoli and low RNA content in comparison to *Xenopus laevis*. *Differentiation.* 32: 24-33.

- Delsol, M. 1995 – Appareil génital femelle – Anatomie – histologie – cycle annuel et déterminisme du cycle. In «*Traité de zoologie* » T. XIV, fasc. I A : Grassé, P.P. et Delsol, M. (Eds). Masson, Paris, pp 1231-1242.
- Delsol, M., Gueydan-Baconnier, M., Neyrand de Leffemberg, F. et Pujol, P. 1980 – Cycle spermatogénétique continu chez des Batraciens tropicaux. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 105 (1) : 232-233.
- Delsol, M., Flatin, J., Gueydan-Baconnier, M., Neyrand de Leffemberg, F. et Pujol, P. 1981 – Action des facteurs externes sur les cycles de reproduction chez les Batraciens. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 106 (4) : 419-431.
- Delsol, M., Blond-Fayolle, C. et Flatin, J. 1995 – Appareil génital male, anatomie, histologie, déterminisme du cycle sexuel. In : Grassé, P.P. et Delsol, M. *Traité de Zoologie*, tome XIV, fasc. 1-A, Edit. Masson, Paris, pp 1187-1229.
- Desantis, S., Labate, M. et Corriero, A. 1998 - Immunohistochemical localization of FSH and LH in the pituitary of male ruin lizards (*Podarcis sicula campestris* De Betta). *Eur. J. Histochem.* 42 : 77-84.
- Desoize, B. et Sen, S. 1992 - L'apoptose ou mort cellulaire programmée: Concepts, mécanismes et apports en cancérologie. *Bull. Cancer.* 79: 413-425.
- D'Istria, M., Delrio, G., Botte, V. et Chieffi, G. 1974 – Radioimmunoassay of testosterone, 17 $\beta$ -oestradiol and oestrone in the male and female plasma of *Rana esculenta* during sexual cycle. *Steroids. Lipids. Res.* 5: 42 - 48.
- Doerr-Schott, J. 1965a – L'hypophyse de crapaud: *Bufo vulgaris* Laur. Etude comparative aux microscopes optique et électronique. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 260: 283-286.
- Doerr-Schott, J. 1965b – Etude comparative de la cytologie et de l'ultrastructure de l'hypophyse distale de trois espèces d'Amphibiens Anoures : *Rana temporaria* L., *Bufo vulgaris* Laur., *Xenopus laevis* D. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 5 : 631-653.
- Doerr-Schott, J. 1976 – Immunohistochemical detection by light and electron microscopy of pituitary hormones in cold-blooded vertebrates. I. Fish and amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 28 : 487-512.
- Doerr-Schott, J. et Dubois, M.P. 1972 – Mise en évidence par immunofluorescence des cellules corticotropes de l'hypophyse des Amphibiens. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 18 : 587-588.
- Doerr-Schott, J. et Zuber-Vogeli, M. 1984 – Cytologie et immunocytologie de l'hypophyse de *Typhlonectes compressicauda*. *Soc. Zool. Fr.*, pp 77-79.



- Doerr-Schott, J., Follenius, E. et Porte, A. 1962 – Ultrastructure d'un type cellulaire cyanophile du lobe antérieur de l'hypophyse de la grenouille mâle *Rana temporaria* L., C.r. *Séanc. Acad. Sci.*, Paris, 254: 750 - 752.
- Doumandji, S.E. 1997 – Aperçu sur la richesse faunistique de la zone humide de Béni-Bélaïd (Jijel, Algérie), 22 p.
- Doumandji, S.E. et Doumandji-Mitiche, B. 1994 – Ornithologie appliquée à l'agronomie et à la sylviculture. Ed. Off. Publ. Univ., Alger, 124 p.
- Dreux, P. 1980 – Précis d'écologie. Ed. Presses Universitaires de France, Paris, 231 p.
- Driancourt, M.A., Gougeon, A., Royère, D. et Thibault, C. 1991 - La fonction ovarienne. In "La reproduction chez les mammifères et l'homme" (M. C. Levasseur, Ed.), Paris, pp. 273-298.
- Dubois, P.M. 1991 – L'appareil hypothalamo-hypophysaire: aspects morphologiques et fonctionnels. In « *La reproduction chez les mammifères et l'homme* » : Thibault, C. et Levasseur, M.C. (Eds). Ellipses, INRA, Paris, pp 14-42.
- Duellman, W.E. et Trueb, L. 1986 - Biology of Amphibians. Ed. McGraw Hill, New York, 670p.
- Dumont, J.N. 1972 – Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin): I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.*, 136: 153-180.
- Dumont, J.N. et Brummett, A.R. 1978 – Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. *J. Morphol.* 155: 73 - 98.
- Du Preez, L. H., Everson, G. J., Hecker, M., Carr, J. A., Giesy, J. P., Kendall, R. J., Smith, E.E., Van der Kraak, G. et Salomon, K. R. 2005 – Seasonal changes in testicular morphology in the african clawed frog, *Xenopus laevis*: a histometric analysis. *5<sup>th</sup> Wld Congress of Herpetology, Stellenbosch, South Africa. Abstracts*, 42.
- Elftman, H. 1963 – Sertoli cells and testis structure. *Am. J. Anat.* 113: 25-33.
- Emberger, L. 1971 – Travaux de botanique et d'écologie. Ed. Masson et Cie., Paris, 520 p.
- Exbrayat, J.M. 1983 - Premières observations sur le cycle annuel de l'ovaire de *Typhlonectes compressicauda* (Duméril et Biberon, 1841), Batracien Apode vivipare. *C. R. Acad. Sci*, Paris, 296 : 493-498.
- Exbrayat, J.M. 1986 – Quelques aspects de la biologie de la reproduction chez *Typhlonectes compressicauda* (Duméril et Bibron, 1841), Amphibien Apode. Thèse Doct. Etat ès Sci. nat., Univ, Paris VI, 308 p.

- Exbrayat, J.M. 1986a - Le testicule de *Typhlonectes compressicauda* : structure, ultrastructure, croissance et cycle de reproduction. *Mém. Soc. Zool. Fr.*, 43 : 121-132.
- Exbrayat, J.M. 1989 – The cytological modifications of the distal lobe of the hypophysis in *Typhlonectes compressicauda* (Duméril et Bibron, 1841), Amphibian Gymnophiona, during the cycles of seasonal activity. I. In adult males. *Biol. Struct. and Morph.*, 2(4) : 117-123.
- Exbrayat, J.M. 1992 – Reproduction et organe endocrines chez les femelles d'un amphibien gymnophione vivipare *Typhlonectes compressicauda*. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 64: 37-50.
- Exbrayat, J.M. 2000 – Méthodes classiques de visualisation du génome en microscopie photonique. Ed. Tec et Doc, Paris, 182 p.
- Exbrayat, J.M. 2003 - Apport de l'histologie à l'étude de quelques organes et de quelques aspects endocrines de la reproduction d'animaux rares issus de collections. *Rev. Fr. Histotechnol.*, vol. 16, n°1, pp 19-29.
- Exbrayat, J.M. 2006 – Oogenesis and folliculogenesis. In: Exbrayat JM(ed) Reproductive biology and phylogeny of gymnophiona. Vol. 5, Science Publishers, Enfield, New Hampshire, pp 275-290.
- Exbrayat, J.M. et Collenot, G. 1983 – Quelques aspects de l'évolution de l'ovaire de *Typhlonectes compressicauda* (Duméril et Bibron, 1841), batracien apode vivipare. Etude quantitative et histochimique des corps jaunes. *Reprod. Nutr. Dev.* 23 : 889 – 898.
- Exbrayat, J.M. et Delsol, M. 1985- Reproduction and growth of *Typhlonectes compressicauda*, a viviparous Gymnophiona. *Copela*, 4: 950-955.
- Exbrayat, J.M. et Morel, G. 1991 – The cytological modifications of the distal lobe of the hypophysis of *Typhlonectes compressicauda* (Duméril and Bibron, 1841), Amphibia Gymnophiona, during the cycles of seasonal activity. II. In adult females. *Biol. Struct. and Morph.* (3): 129-138.
- Exbrayat, J.M. et Morel, G. 1997 – Endocrine aspects of reproduction in female *Typhlonectes compressicauda* (Amphibia, Gymnophiona). Abstract of the third world congress of Herpetology. Prague, Czech Republic.
- Exbrayat, J.M., Flatin, J., Gueydan-Baconnier, M., Neyrand de Leffemberg, F. et Pujol, P. 1997 – Variété et souplesse des cycles sexuels et conquête du milieu terrestre par les amphibiens. In L'évolution biologique, science, histoire ou philosophie ?, Exbrayat, J.M. et Flatin, J. I.I.E.E., Vrin : 249-268.
- Exbrayat, J.M., Pujol, P. et Leclercq, B. 1998 – Quelques aspects des cycles sexuels et nycthémeraux chez les amphibiens. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 12: 113-124.

- Fasano, S., Chieffi, P., Cobellis, G. et Pierantoni, R. 1998 – Neuroendocrine and local control of the frog testis. In: Vaudry, H., Tonon, M.C., Roubos, E. et De Loof, A. (Eds), Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology. *Ann. NY Acad. Sci*, New York, pp 260-264.
- Favard, P. 1955 – Spermatogenèse de *Discoglossus pictus* oth. Etude cytologique. Maturation du spermatozoïde. 17: 369 – 394.
- Fernandez, S.N. et Ramos, I. 2003- Endocrinology of Reproduction. In. Reproductive Biology and phylogeny of Anura. Ed. Barrie, G.M. Jamieson, Vol.2, Science Publishers, Inc. USA, 395 p.
- Follett, B.K. et Redshaw, M.R. 1974 – The physiology of vitellogenesis. In: Physiology of the Amphibia. Vol. II Lofts, B. (Edit.), Academic Press: 219-308.
- Fortune, J.E. 1983 – Steroid production by *Xenopus* ovarian follicles at different developmental stages. *Developmental biology*. 99: 502-509.
- Fortune, J.E. et Tsang, P.C. 1981 – Production of androgen and estradiol - 17 $\beta$  by *Xenopus* ovaries treated with gonadotropins in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 43: 234-242.
- Frazzetta, T.H. 1975 – Complex adaptations in evolving populations. Ed. Sinauer, Sunderland, 270p.
- Gabe, M. 1968 – Techniques histologiques. Ed. Masson., 1113 p.
- Gabe, M. 1972 – Contribution à l'histologie du complexe hypothalamo-hypophysaire d'*Ichthyophis glutinosus* L. (Batracien Apode). *Acta. Anat.* (2): 253 - 269.
- Galgano, M. 1934 – L'influenza della temperatura sulla spermatogenesi della *Rana esculenta*. *Monit. Zool. Ital.*, Suppl. 82, 45.
- Galgano, M. 1936 – Intorno all'influenza del clima sulla espermatogenesi di *Rana esculenta*. *Arch. Ital. Anat. Embriol.* 35, 511-541.
- Galgano, M. 1952 – Saggio di classificazione delle varie modalita di svolgimento della spermatogenesi negli anfibi. *Archiv. Zool. Ital.*, 37 : 193-230.
- Gambino, J., Eckhardt, R.A. et Risley, M.S. 1981 – Nuclear matrices containing synaptonemal complexes from *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.*, 91: 63 a
- Garrett, W. M. et Guthrie, H. D. 1997 - Steroidogenic enzyme expression during preovulatory follicle maturation in pigs. *Biol. Reprod.* 56: 1424-31.
- Gavaud, J. 1975 – Etude expérimentale du rôle des facteurs externes sur la spermatogenèse et l'activité endocrine du testicule de *Nectophrynoides occidentalis* Angel. Publ. E.N.S. Laboratoire de Zool.
- Goin, C.J. et Goin, O.B. 1962 – Introduction to Herpetology. W.H. Freeman, San Francisco, 341 p.

- Gordon, I. 1994 - Laboratory production of cattle embryos. In "Biotechnology in agriculture", Ed. I. Gordon, Vol. 11, Cab International, Wallingford UK, 640 p.
- Grandi, G. et Chicca, M. 2004 - Early development of the pituitary gland in *Acipenser naccarii* (Chondrostei, Acipenseriformes): an immunocytochemical study. *Anatomy and Embryology*, Vol. 208 (4): 311-321.
- Grassé, P.P. 1986 – Appareil urogénital des Amphibiens. La spermatogenèse : In «*Traité de zoologie* » T. XIV., fasc. I B : Grassé, P.P. et Delsol, M. (Eds) Masson, Paris, pp 1-20.
- Guardabassi, A. et Blanchi, D. 1962 – La cytologie hypophysaire chez *Xenopus laevis* Daudin. *Z. Zellforsch.* 56 : 540- 551.
- Guarino, F.M., Di Fiore, M.M., Caputo, V., Angelini, F., Iela, L. et Rastogi, R.K. 1993 - Seasonal analysis of the reproductive cycle in tow wild populations of *Rana italica* Dubois, 1985. *Anim. Biol.* 2: 25–43.
- Gueydan-Baconnier, M. 1980 – Le cycle sexuel chez les mâles et les femelles de *Phrynobatrachus calcaratus* (Peters, 1863) Batracien Anoure tropical. Thèse Doct. Spéc., Univ. Paris, VI, 151 p.
- Gueydan-Baconnier M., Neyrand de Leffemberg, F. et Pujol, P. 1984a - Comparaison de la vitesse spermatogénétique entre trois batraciens tropicaux. *Bull. soc. Herp. Fr.*, 29 : 69-70.
- Gueydan-Baconnier M., Neyrand de Leffemberg, F. et Pujol, P. 1984b – Etude comparative du dynamisme de la spermatogenèse chez trois Batraciens tropicaux par autoradiographie. *Ann. Sci. nat., Zool.*, 13<sup>ème</sup> sér, 6 : 191-196.
- Guraya, S.S. 1976 – Recent advances in the morphology, histochemistry and biochemistry of steroid synthesizing cellular sites in nonmammalian vertebrate ovary. *Int. Rev. Cytol.* 44: 365-409.
- Guraya, S.S. 1979 – Recent advances in the morphology, cytochemistry and function of Balbiani vitelline body in animal oocytes. *Int. Rev. Cytol.* 59: 249-321.
- Guthrie, H. D., Welch, G. R., Cooper, B. S., Zakaria, A. D. et Johnson, L. A. 1994 - Flow cytometric determination of degraded deoxyribonucleic acid in granulosa cells to identify atretic follicles during preovulatory maturation in the pig. *Biol. Reprod.* 50: 1303-1311.
- Guthrie, H. D., Grimes, R. W., Cooper, B. S. et Hammond, J. M. 1995 - Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *J. Anim. Sci.*, 73: 2834-44.
- Guyetant, R. 1986 – Les Amphibiens de France. *Rev. Fr. Aquar.*, 13<sup>ème</sup> ann, 1 et 2, pp. 1-60.
- Hammouche, S. Gernigon-Spychalowicz, T., Khammar, F. et Exbrayat J.M. 2002 – Etude immunohistochimique des cellules gonadotropes chez le Lézard femelle *Uromastix acanthinura* au cours du cycle reproducteur. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 2002, 127(1): 49-55.

- Hammouche, S. Gernigon, T. et Exbrayat J.M. 2007 – Immunocytochemical localization and ultrastructural study of gonadotroph cells in the female desert lizard *Uromastyx acanthinura*. *Tissue and cell.*, 39: 13-25.
- Hausen, P. et Riebesell, M. 1991- The early development of *Xenopus laevis*. An atlas of the histology. Ed. Springer-verlag, Paris, 142 p.
- Hayashi, T., Hanaoka, Y. et Hayashi, H. 1992 – The complete amino acid sequence of the follitropin  $\beta$ -subunit of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88: 144-150.
- Hayashi, H., Hayashi, T. et Hanaoka, Y. 1992a – Amphibian lutropin and follitropin from the bullfrog *Rana catesbeiana* : complete amino acid sequence of the alpha subunit. *Eur. J. Biochem.* 203: 185-191.
- Hayashi, H., Hayashi, T. et Hanaoka, Y. 1992b - Amphibian lutropin from the bullfrog *Rana catesbeiana* : complete amino acid sequence of the  $\beta$  subunit. *Eur. J. Biochem.* 205: 105-110.
- Hazon, N. et Balment, R.J. 1997 - Endocrinology. In: physiology of fishes. David H. Evans Ed. CRC press, Boca Raton, 519 p.
- Hirshfield, A. N. 1991 - Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biol. Reprod.* 44: 1157-62.
- Holland, C.A. et Dumont, J.N. 1975 – Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) IV. Effects of gonadotropin, estrogen and starvation on endocytosis in developing oocytes. *Cell Tissue Res.* 162: 177 – 184.
- Horton, P. 1984 - The female anuran reproductive system in relation to reproductive mode. *Ph.D.* Thesis. Univ. Adelaide, South Australia.
- Houck, L.D. et Woodley, S.K. 1996 - Field studies of steroid hormones and male reproductive behaviour in amphibians. In: Heatwole, H. (Ed.), *Amphibian Biology. Social Behavior*, Vol. 2. Australia, pp. 677–703.
- Houck, L. D., Mendonca, M. T. Lynch, T. K. et Scott, D.E. 1996 - Courtship behavior and Plasma levels of androgens and corticosterone in male marbled salamanders, *Ambystoma opacum* (Ambystomatidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* 104: 243-252.
- Houssay, B.A. 1954 – Hormonal regulation of the sexual function of the male toad. *Acta. Physiol. Latino Amer.*, 4(1) : 1- 41.
- Ishii, S. et Itoh, M. 1992 - Amplexus induces surge of luteinizing hormone in male toads, *Bufo japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86: 34–41.
- Itoh, M. et Ishii, S. 1990 – Changes in plasma levels of gonadotropins and sex steroids in the toad, *Bufo japonicus*, in association with behaviour during breeding season. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80 : 451-464.

- Itoh, M., Inoue, M. et Ishii, S. 1990 - Annual cycle of pituitary and plasma gonadotropins and sex steroids in a wild population of the toad, *Bufo japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78: 242 - 253.
- Jegou, B. 1993 – The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int. Rev. Cytol.*, 147: 25-96.
- Joly, J. 1971 – Les cycles sexuels de *Salamandra salamandra* L. I- Cycle sexuel des mâles. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.*, 13 (3): 451-504.
- Kalt, M.R. 1976 – Morphology and kinetics of spermatogenesis in *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.*, 195: 393-408.
- Kalt, M.R. 1977 - Cytoplasmic inclusions in *Xenopus* spermatogenic cells. Ultrastructural and cytochemical analysis of the action of antimetabolic agents on subcellular elements. *J. Cell. Sci.* 28: 15 - 28.
- Kanamadai, R.D. et Saidapur, S.K. 1982 – Pattern of ovarian activity in the Indian toad *Bufo melanostictus* (Schn). *Proc. Natl. Sci. Acad, India*, B 48: 307 – 316.
- Kano, Y., Nakano, T., Kumakura, M., Wasa, T., Suzuki, M., Yamauchi, K. et Tanaka, S. 2005 – Seasonal expression of LH $\beta$  and FSH $\beta$  in the male newt pituitary gonadotrophs. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 141: 248-258.
- Kao, Y.H., Alexander, P.S., Yang, V.V.C. et Yu, J.Y.L. 1993 - Annual patterns of testicular development and activity in the Chinese bullfrog (*Rana rugulosa* Wiegmann). *Zool. Sci.* 10: 337–351.
- Karaiskou, A., Dupré, A., Haccard, O. et Jesus, C. 2001 - From progesterone to active Cdc2 in *Xenopus* oocytes: a puzzling signalling pathway. *Biology of the Cell.* 93: 35–46.
- Kayser, C. 1963- Physiologie, les grandes fonctions. Ed. Médicales Flammarion, T.III, Paris, 1210 p.
- Kim, K.H., Im, W.B., Choi, H.H., Ishii, S. et Kwon, H.B. 1998 – Seasonal fluctuations in pituitary gland and plasma levels of gonadotropic hormones in *Rana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109: 13-23.
- Kime, D.E. et Hews, E.A. 1978 - Androgen biosynthesis in vitro by testes from Amphibia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 35: 280 – 288.
- Kisserli, O. et Exbrayat, J.M. 2006 - Premières données sur le cycle de reproduction des mâles de *Bufo mauritanicus* (Schlegel, 1841) dans la zone humide de Beni-Belaid (Jijel, Algérie). *Bull.Soc.Herp.Fr.*, 120 : 5-13.

- Kobayashi, T., Sakai, N., Adachi, S., Asahina, K., Iwasawa, H. et Nagahama, Y. 1993 – 17 $\alpha$ , 20 $\alpha$  – dyhydroxy-4-pregnen-3-one is the naturally occurring spermiation-inducing hormone in the testis of a frog *Rana nigromaculata*. *Endocrinology*, 133: 321-327.
- Kwon, H.B. et Ahn, R.S. 1994 – Relative roles of theca and granulosa cells in ovarian follicular steroidogenesis in the amphibian, *Rana nigromaculata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94: 207 – 204.
- Lamotte, M. et Lescure, J. 1977 – Tendances adaptatives à l'affranchissement du milieu aquatique chez les Amphibiens Anoures. *La Terre et la Vie*, 31 : 225-312.
- Le Garff, B. 1991- Les amphibiens et les reptiles dans leur milieu. Ed. Bordas, Paris, 243 p.
- Licht, P. 1973 - Induction of spermiation in anurans by mammalian pituitary gonadotropins and their subunits. *Gen. Comp. Endocrinol.* 20: 522–529.
- Licht, P., McCreery, B.R., Barnes, R. et Pang, R. 1983 – Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, sex steroids, and corticosterone in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50: 124 - 145.
- Lofts, B, 1964 - Seasonal changes in the functional activity of the interstitial and spermatogenic tissues of the green frog, *Rana esculenta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* V. 4, p. 550-562.
- Lofts, B. 1974 – Reproduction. *Physiology of the Amphibian*. Ed. Acad. Press. Vol. II, New York, pp 107-218.
- Maller, J. L. 2003 - Signal transduction. Fishing at the cell surface. *Science.* 300: 594-595.
- Malonza, P. K. et Measey, G. J. 2005 - "Life history of an African caecilian: *Boulengerula taitanus* Loveridge 1935 (Amphibia Gymnophiona Caeciilidae)." *Tropical Zoology*, (18): 49-66.
- Masui, Y. 1967 – Relative roles of the pituitary, follicle cells and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.*, 166: 365-376.
- Masui, Y. 1985 – Meiotic arrest in animal oocytes. In *Biology of fertilization*. Ed. Academic Press. Vol. 1, Orlando, pp 189-219.
- Masui, Y. et Markert, C. L. 1971 - Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177: 129 - 45.
- Maxson, W. S., Haney, A. F. et Schomberg, D. W. 1985 - Steroidogenesis in porcine atretic follicles: loss of aromatase activity in isolated granulosa and theca. *Biol. Reprod.* 33: 495-501.
- Mendonça, M.T., Licht, P., Ryan, M.J. et Barnes, R. 1985 – Changes in hormone levels in relation to breeding behaviour in male bullfrogs (*Rana catesbeiana*) at the individual and population levels. *Gen. Comp. Endocrinol.* 58: 270-279.

- Miki, M., Shimotani, T. et Nozaki, M. 2005 - Distribution of immunoreactivities for adenohipophysial hormones in the pituitary gland of the polypteriform fish, *Polypterus endlicheri*. *Zool. Sci.*, 22: 1123-1130.
- Mondal, A. et Basu, S.L. 1960 – Spermatogenetic cycle in *Bufo melanostictus* Schneider. *Ind. Jour. Physiol. All. Sci.*, 14, 2.
- Monnet, J.M. et Cherry, M.I. 2002 - Sexual size dimorphism in anurans. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 269: 2301-2307.
- Moore, F.L. 1987 – Regulation of reproductive behaviors. In: D.O. Norris and Jones, R.E. (Eds), *Hormones and reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*. Plenum Press, New York, pp. 505-522.
- Nagahama, Y. 1986 - Testis. In: Pang, P.K.T., Schreibman, M.P. and Gorbman, A. (eds). *Vertebrate's endocrinology: fundamentals and biomedical implications*, vol I. Academic, New York, pp 399–437.
- Neyrand de Leffemberg, F. 1988 – Etude comparative de la vitesse spermatogénétique chez *Rana esculenta* et *Rana lessonae* en avril, à 20°C, par la méthode histoautoradiographique. *Bull. Soc.Herp. Fr.*, 46 : 31-36.
- Neyrand de Leffemberg, F. et Pujol, P. 1984 - Etude comparative des cycles de reproduction de trois anoures africains: *Bufo regularis*, *Ptychadena macCarthyensis* et *Ptychadena oxyrhynchus*. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 32 : 36 - 40.
- Neyrand de Leffemberg, F. et Exbrayat J.M. 1987 – Quelques aspects de la cinétique de la spermatogenèse dans le complexe *Rana esculenta* (Anura, Ranidae) en fonction de la température. *Bull. Soc.Herp.Fr.*, 41 : 17- 20.
- Neyrand de Leffemberg, F. et Exbrayat J.M. 1991 – Influence de la température sur la cinétique de la spermatogenèse chez *Rana esculenta* et *Rana lessonae* en juillet. *Bull. Soc.Herp.Fr.*, 57 : 31- 40.
- Neyrand de Leffemberg, F. et Exbrayat, J.M. 1995 - Etude comparative du dynamisme de la spermatogenèse chez les Amphibiens par la méthode histoautoradiographique à la thymidine tritiée. *Bull. Soc. Linn. Lyon*, 64(8) :356-372.
- Norris, D.O. et Lopez, K.H. 2005 - Anatomy of the amphibian endocrine system. In Heatwole H (ed.). *Amphibian Biology*, Vol. 6, Endocrinology. Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton, NSW, Australia. pp. 2021-2044.
- Obert, H.J. 1976 – Spermatogenesis in the yellow-bellied toad (*Bombina variegata variegata* L.) during the seasonal activity period and in correlation with the mating call activity (Discoglossidae, Anura). *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, 90(5): 908 – 924.



- Oliveira, C., Zanetoni, C. et Zieri, R. 2002 – Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Revista Chilena de Anatomia*. 20 (3) : 263-268.
- Oliveira, C., Vicentini, C.A. et Taboga, S.R. 2003 – Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). *Caryologia*, 56(1): 75-83.
- Parvinen, M., Vihko, K.M. et Toppari, J. 1986 - Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. *Int. Rev. Cytol.* 104: 115–151.
- Perez, J. 2005 - Régulation des complexes mitotiques APC/CDC20 et APC/CDH1 dans les extraits d'ovocytes de Xénopes. Diplôme de l'E.P.H.E., 125 p.
- Pierantoni, R., Iela, L., d'Istria, M., Fasano, S., Rastogi, R.K. et Delrio, G. 1984 - Seasonal testosterone profile and testicular responsiveness to pituitary factors and gonadotrophin releasing hormone during two different phases of the sexual cycle of the frog (*Rana esculenta*). *J. Endocrinol.* 102: 387–392.
- Pierantoni, R., Cobellis, G., Meccariello, R., Palmiero, C., Fienga, G., Minucci, S. et Fasano, S. 2002 - The amphibian testis as model to study germ cell progression during spermatogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132 :131-139.
- Pierce, J.G. et Parsons, T.F. 1981 – Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 465 - 495.
- Polzonetti-Magni, A.M., Mosconi, G., Carnevali, O., Yamamoto, K., Hanaoka, Y. et Kikuyama, S. 1998- Gonadotropin and reproductive function in the anuran amphibian, *Rana esculenta*. *Biol. Reprod.* 58: 88-93.
- Pudney, J. 1998 - Leydig and Sertoli cells, nonmammalian. In: Knobil, E. and Neill, J.D. (eds). *Encyclopedia of reproduction*. Vol. 2. Academic, New York, pp 1008–1020.
- Pujol, P. 1985 – Quelques aspects de la reproduction du crapaud *Bufo regularis* Reuss, 1834. Diplôme de l'E.P.H.E., Lyon, 125 p.
- Pujol, P. 1987 – Quelques observations sur le cycle de reproduction des femelles du crapaud *Bufo regularis* (Reuss, 1834) au Togo. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 41 : 21- 23.
- Pujol, P. et Exbrayat, J.M. 1996 – Variations du tissu interstitiel du testicule et de l'hypophyse chez *Bufo regularis* mâle au cours du cycle sexuel. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 95 : 53-66.
- Pujol, P. et Exbrayat, J.M. 1998 – Preliminary studies of pituitary gland yearly cycle in *Bufo regularis* female (Amphibia, Anura). Ed. Le Bourget du lac, S.E.H., France, pp 371-376.
- Pujol, P. et Exbrayat, J.M. 2000 – Mise en évidence de l'homogénéité des testicules multilobés de deux amphibiens par des méthodes morphométriques. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 95 : 505-518.

- Pujol, P. et Exbrayat, J.M. 2002 – Quelques aspects de la biologie de la reproduction et des cycles sexuels chez *Bufo regularis* Reuss (1834), amphibien anoure. *Bull. mens. Soc. Linn. Lyon*, 71(1) : 12-52.
- Ramade, F. 2003 – Eléments d'écologie. Ecologie fondamentale. Ed. Dunod, Paris, 690 p.
- Raquet, M., Measey, G.J. et Exbrayat, J.M. 2006 – Premières observations histologiques de l'ovaire de *Boulengerula taitanus* Loveridge, 1935, Amphibien Gymnophione. *Rev. Fr. Histotechnol.*, 19, n° 1, pp 9-15.
- Raquet, M., Measey, J. et Exbrayat, J.M. 2007 - Reproductive cycle of female in *Boulengerula taitanus* (Loveridge, 1935), an oviparous Gymnophionan amphibian Gymnophiona. *14th Europ. Congress Herp.*, Porto (Portugal). *Abstract*.
- Rasar, M.A. et Hammes, S.R. 2006 – The physiology of the *Xenopus laevis* ovary. Ed. Humana Press Inc. *Cell Biology and Signal Transduction*, Totowa, NJ, pp 17-30.
- Rastogi, R.K., Iela, L., Saxena, P.K. et Chieffi, G. 1976 - The control of spermatogenesis in the green frog, *Rana esculenta*. *J. Exp. Zool.*, 196: 151–166.
- Rastogi, R.K., Iela, L., Delrio, G. et Bagnara, J.T. 1986 - Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. II. The male. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62: 23–35.
- Rastogi, R.K., Iela, L., Delrio, G., Di Meglio, M., Russo, A. et ChieY, G. 1987 – Environmental influence on testicular activity in the green frog, *Rana esculenta*. *J. Exp. Zool.*, 206: 49-64.
- Rastogi, R.K., Bagnara, J.T., Iela, L. et Krasovich, M.A. 1988 – Reproduction in the mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. *J. Morphol*, 197 (3): 277-302.
- Rastogi, R.K., Iela, L., di Meglio, M., Di Fiore, M.M., D'Aniello, B., Pinelli, C. and Fiorentino, M. 2005 - Hormonal regulation of reproductive cycles in Amphibians. In *Amphibian Biology*. Ed. H Heatwole, vol VI, Sydney, pp. 2045–2177.
- Redshaw, M.R. 1972 – The hormonal control of the amphibian ovary. *Zoologist*, 12: 289-306.
- Rosemblit, C., Pozzi, A.G. et Ceballos, N.R. 2006 - Relationship between steroidogenesis and spermiation in *Rana catesbeiana* and *Leptodactylus ocellatus*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology*. Vol. 176 (6). 559-566.
- Russell, L.D. et Steinberger, A. 1989 – Sertoli cells in culture: views from the perspectives of an in vivo and an in vitro. *Biol. Reprod.* 41: 571-577.
- Saint-Girons, H. 1976 - Different types of sexual cycles in male European vipers. *C R Acad Sci. Hebd. Seances., Acad. Sci. D.* 282 (10): 1017-1019.

- Saito, A., Kano, Y., Suzuki, M., Tomura, H., Takeda, J. et Tanaka, S. 2002 – Sequence analysis and expressional regulation of messenger RNAs encoding  $\beta$ -subunits of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Biol. Reprod.* 66 : 1299-1309.
- Salami-Cadoux, M.L. 1979 – Cycles et épidémiologie de Polystomatidae parasites de l'amphibien *Bufo regularis* au Togo. Thèse Doct. Etat, mention Science, Perpignan, 394 p.
- Salthe, S.N. 1969 – Reproductive modes and the number and the sizes of ova in the urodeles. *Am. Midl. Nat.* 81: 467-490.
- Salthe, S.N. et Duellman, W.E. 1973 – Quantitative constraints associated with reproductive mode in anurans. In J. Vial (ed). *Evolutionary biology of the Anurans*, univ of Missouri Press, Columbia, 229 – 249.
- Sanchez, S.S. et Villecco, E.I. 2003 - Oogenesis. In: *Reproductive biology and Phylogeny of anura*. Ed. Barrie G.M. Jamieson, Vol 2. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, pp 27-71.
- Sandoz, D. 1970 – Etude cytochimique des polysaccharides au cours de la spermatogénèse d'un amphibien anoure : Le discoglosse *Discoglossus pictus* (otth.). *J. Microsc.* 9: 243 - 262.
- Sandoz, D. 1974 – Modifications in the nuclear envelope during spermiogenesis of *Discoglossus pictus* (Anura, Amphibia). *J. Submicr. Cytol.* (6): 399 – 419.
- Sandoz, D. 1975 – Development of the neck region and ring during spermiogenesis of *Discoglossus pictus* (Anura, Amphibia). In: Afzelius, B.A. (Eds). *The functional anatomy of the spermatozoon*. Pergamon Press, Oxford, pp. 237 – 247.
- Santos, L.R.S. et Oliveira, C. 2007 – Morfometria testicular durante o ciclo reproductivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(1), 64-70.
- Santos, L.R.S. et Oliveira, C. 2008 – Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Micron*, Volume 39, Issue 8, 1266-1270.
- Scheltinga, D.M. et Jamieson, B.G.M. 2003 – Spermatogenesis and the mature spermatozoon: form, function and phylogenetic implications. In “ *Reproductive Biology and phylogeny of Anura* ”: Jamieson, B.G.M. (Ed.). Science Publishers, Enfield, pp 119-251.
- Schuetz, A.W. 1972 - Induction of Structural Alterations in the preovulatory amphibian ovarian follicle by hormones. *Biology of reproduction*, 6: 67-77.
- Seltzer, P. 1946 – Le climat de l'Algérie. *Trav. Inst. Météo. Phys.*, globe de l'Algérie, 219 p.
- Sheng, Y., Tiberi, M., Booth, R.A., Ma, C. et Liu, X.J. 2001 – Regulation of *Xenopus* oocyte meiosis arrest by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Curr. Biol.* 11: 405 - 416.

- Shine, R. 1979 – Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. *Copeia*, 297-306.
- Skinner, M.K. 2005 – Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human. Reprod.* 11: 461-471.
- Smith, L.D., Ecker, R.E. et Subtelny, S. 1968 – In vitro induction of physiological maturation in *Rana pipiens* oocytes removed from their ovarian follicles. *Dev. Biol.* 17: 627 – 643.
- Solari, A. 1973 - Etude quantitative d'organes ou de tissus. I. Méthodes d'estimation des volumes. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 13(2) : 247-265.
- Specker, J.L. et Moore, F.L. 1980 – Annual cycle of plasma androgens and testicular composition in the rough-skinned newt, *Taricha granulosa*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 42: 297-303.
- Spengel, J.W. 1876 - Das urogenitalsystem der Amphibien. I. Theil. Der anatomische Bau des urogenitalsystems. *Arb. Zool. Zoot. Inst, Wurzburg*, 3 : 51 - 114.
- Stewart, P. 1969 – Quotient pluviométrique et dégradation biosphérique. Quelques réflexions. *Bull. Doc. Hist. Nat. Agro.*, pp 24 – 25.
- Suwa, K. et Yamashita, M. 2007- Regulatory mechanisms of oocyte maturation and ovulation. P.J. Babin et al (eds.), *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*, 323 – 347.
- Takamune, K., Teshima, K. et Maeda, M.A. 1995 - Characteristic features of preleptotene spermatocytes in *Xenopus laevis*: increase in the nuclear volume and first appearance of flattened vesicles in these cells. *J. Exp. Zool.* 15, 273(3): 264 - 70.
- Tanaka, S. et Takikawa, H. 1984 – Amphibian and reptilian gonadotropin : Biological activity. *Gunma. Symp. Endocrinol.*, 21: 37 - 61.
- Thibault, C. et Levasseur, M. 2001 - La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA, Paris, 900 p.
- Thireau, M. et Marolle, E. 1968 - Morphologie externe et interne du crapaud africain *Bufo regularis* Reuss 1834. Publ. Univ., Abidjan, 75 p.
- Tilly, J. L. 1996 - Apoptosis and ovarian function. *Rev. Reprod.*, 1: 162 - 172.
- Tilly, J. L., et Hsueh, A. J. 1993 - Microscale autoradiographic method for the qualitative and quantitative analysis of apoptotic DNA fragmentation. *J. Cell. Physiol.*, 154: 519 - 526.
- Tilly, J. L., et Tilly, K. I. 1995 - Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology*, 136: 242 - 252.
- Tilly, J. L., Billig, H., Kowalski, K. I. et Hsueh, A. J. 1992 - Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat

- ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol. Endocrinol.*, 6: 1942 - 1950.
- Tyler, M.J. 1976 – Frogs. Collins, Sydney, 256 p.
- Tyler, M.J. 2003 – The gross anatomy of the reproductive system. In: Reproductive Biology and Phylogeny of Anura. Ed. Barrie G.M. Jamieson, 452p.
- Uribe, M.C.A. 2001 – Reproductive systems of caudate amphibians. In: Dutta HM, Datta Munshi JS (eds) Vertebrate functional morphology. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, pp 267- 294.
- Uribe, M.C.A. 2003 – Ovary and oogenesis. In: Sever, D.M. (Ed). Reproductive biology and phylogeny of Urodela. Vol 1. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, pp 135 - 150.
- Vaissaire, J.P. 1977 - Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire. Ed. Maloine, Paris, 450 p.
- Van Gansen, P. 1986 - Ovogenèse des Amphibiens. In. Traité de Zoologie. Ed. Masson. Grassé, P.P. T.XIV, Fasc. IB, Paris, pp 21-55.
- Van Gansen, P. et Schram, A. 1972 – Evolution of the nucleoli during oogenesis in *Xenopus laevis* studied by electron microscopy. *J. Cell Sci.* 10: 339-367.
- Van Oordt, P.G.W.J. 1956 – Regulation of the spermatogenic cycle in the common frog *Rana temporaria*. Thesis Utrecht. G.W. Vander wiel and C°. Arnheim, 1-116.
- Van Oordt, P.G.W.J. 1960 - The influence of the internal and external factors in the regulation of the spermatogenic cycle in amphibia. *Zool.Soc.London. Symp.* 2: 29–52.
- Van Oordt, P.G.W.J. 1961 – The gonadotrophin-producing and other cell types in the distal lobe of the pituitary of the common frog, *Rana temporaria*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1: 364-374.
- Van Sonderen, A.G.J. 1958 – Die relatie Tussen milt en Gonade. Drukken H.J. Koersen en ZN, Amsterdam
- Van Voorhis, B.J. 1999 – Follicular development. In: Knobil, E. Nill, J.D. (Ed.). Encyclopedia of reproduction. Vol. 2. *Academic Press*, San Diego, pp. 376-389.
- Van Wyk, J. H., Hurter, E., Pool, E. J. et Leslie, A. J. 2005 - Seasonal variation in reproductive activity in natural *Xenopus laevis* populations in the Western Cape Province, South Africa. *5<sup>th</sup> Wld Congress of Herpetology, Stellenbosch, South Africa. Abstracts*, 103.
- Villecco, E.I., Aybar, M.J., Sanchèz, S.S. et Sanchèz Riera, A.N. 1996 – Heterologous gap junctions between oocyte and follicle cells in *Bufo arenarum*: hormonal effects on their permeability and potential role in meiotic arrest. *J. Exp. Zool.*, 276: 76-85.

- Villecco, E.I., Aybar, M.J., Sanchèz Riera, A.N. et Sanchèz, S.S. 1999 - Comparative study of vitellogenesis in the anuran amphibians *Ceratophrys cranwelli* (Leptodactylidae) and *Bufo arenarum* (Bufonidae). *Zygote*, 7: 11-19.
- Villecco, E.I., Aybar, M.J., Genta, S.B., Sanchèz, S.S. et Sanchèz Riera, A.N. 2000 – Effect of gap junction uncoupling in full *Bufo arenarum* ovarian follicles: participation of Camp in meiotic arrest. *Zygote*, 8: 171-179.
- Villecco, E.I., Genta, S.B., Sánchez Riera, A.N. et Sánchez, S.S. 2002 - Ultrastructural characteristics of the follicle cell-oocyte interface in the oogenesis of *Ceratophrys cranwelli*. *Zygote*, 10: 163-173.
- Wada, M., Wingfield, J.C. et Gorbman, A. 1976 - Correlation between blood levels of androgens and sexual behaviour in male leopard frogs, *Rana pipiens*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 29: 72–77.
- Wake, M.H. 1968 – Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. Part I: the gonads and fat bodies. *J. Morph.*, 126: 291-332.
- Wake, M.H. 1980 - Reproduction, growth and population structure of the Central American Caecilian *Dermophis mexicanus*. *J. Herpetol.*, 36: 244-256.
- Wake, M.H. 1992 – Reproduction in caecilians. In: Reproductive Biology of South American Vertebrates. W.C. Hamlett, ed. Acad. Press, New York, pp. 112-120.
- Wallace, R.A. 1985 – Vitellogenesis and oocyte growth: Non- mammalian vertebrates. In *Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis*, Vol. I (Ed. L. Browder), New York, pp. 127 – 177.
- Wallace, R.A. et Bergink, G.W. 1974 – Amphibian vitellogenin: properties, hormonal regulation of hepatic synthesis and ovarian uptake, and conversion to yolk proteins. *Amer. Zool.* 14: 1159-1175.
- Weiserbs, A. et Jacob, J.P. 2005 - Amphibiens et Reptiles de la Région de Bruxelles-Capitale. Aves asbl et Institut Bruxellois pour la Gestion de l'Environnement. Bruxelles, 107 p.
- Wetzel, D.M. et Kelley, D.B. 1983 – Androgen and gonadotropin effects on male mate calls in South African clawed frogs, *Xenopus laevis*. *Hormones and behavior.* 17: 388 – 404.
- Whittier, J.M. et Crews, D. 1987 - Seasonal Reproduction: Patterns and Control. In: Norris, O. & Jones, R. E. eds. *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*. New York, pp. 283-301.
- Wingstrands, K.G. 1966 – The pituitary gland. Ed. G.W. Harris et B.T. Donovan., pp. 58-87.
- Witschi, E. 1924 – Die Entwicklung der Keimzellen der *Rana temporaria* L. I. Urkeimzellen und Spermatogenese. *Zeit. J. Zellen Gewel.* Abt. B, 1, 523.

- Woodley, S.K. 1994 – Plasma androgen levels, spermatogenesis, and secondary sexual characteristics in two species of Plethodontid salamanders with dissociated reproductive patterns. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96: 206 - 214.
- Xavier, F. 1986 – La reproduction de *Nectophrynoides*. In *Traité de Zoologie*.T. XIV, fasc. 1-B, Grassé, P.P et Delsol, M. Ed. Masson, Paris, pp 497-513.
- Xavier, F., Zuber-Vogeli, M. et Le Quang Trong, Y. 1970 – Recherches sur l'activité endocrine de l'ovaire de *Nectophrynoides occidentalis* Angel (Amphibien Anoure vivipare). I. Etude histochimique. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 15 : 425-431.
- Yamashita, M. 2000 - Toward modeling of a general mechanism of MPF formation during oocyte maturation in vertebrates. *Zool. Sci.* 17: 841– 851.
- Zahl, P.A. 1935 – Cytological changes in frog pituitary considered in reference to sexual precocity. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 33 : 56-58.
- Zuber-Vogeli, M. 1966 – Les variations cytologiques de l'hypophyse distale du mâle de *Nectophrynoides occidentalis* au cours du cycle annuel. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 7 : 492-499.
- Zuber-Vogeli, M. 1968 – Les variations cytologiques de l'hypophyse distale des femelles de *Nectophrynoides occidentalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 11 : 495-514.
- Zuber-Vogeli, M. et Doerr-Schott, J. 1981 – Description morphologique et cytologique de l'hypophyse de *Typhlonectes compressicauda* (Duméril et Biberon, 1841), Amphibien Gymnophione de Guyane française. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 292 : 503-506.
- Zuber-Vogeli, M. et Lemire, M. 1982 – L'ultrastructure de différentes cellules de l'adénohypophyse du Lézard saharien *Uromastix acanthinura* Bell 1825 (Sauria, Agamidae). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 46: 333-344.
- Zug, G.R., Vitt, L.J. et Caldwell, J.P. 2001 - *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*- Ed. Academic Press Inc, San Diego, USA, 720 p.

## *Annexes*



Annexe 1 : Immunohistochimie par amplification à la streptavidine-biotine et révélation à l'aide de la peroxydase

Mode opératoire

Rincer les coupes déparaffinées et hydratées au PBS

Enlever l'excès de PBS au moyen d'un papier Joseph

Entourer les coupes d'une résine hydrophobe (DAKO-pen)

Incuber 5 min dans le mélange PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,3%

Rincer au PBS

Incuber les lames 10 min dans PBS / BSA

Appliquer l'anticorps primaire : une heure à température ambiante

Rincer au PBS 3 x 10 min

Appliquer l'anticorps secondaire biotinylé : une heure à température ambiante

Rincer au PBS 3 x 10 min

Appliquer le complexe Streptavidine-péroxydase : une heure à température ambiante

Rincer au PBS 3 x 10 min

Ajouter le substrat chromogène : 10 min à température ambiante

Rincer à l'eau distillée

Contre colorer à l'hématoxyline : 1 min à température ambiante

Rincer à l'eau courante

Rincer à l'eau distillée

Monter au Crystal mount (Biomeda)

Laisser polymériser une heure à 60° C

Observation au microscope photonique

Annexe 2 : Valeurs du poids du corps en fonction des classes de longueurs enregistrées chez les individus mâles de *Bufo mauritanicus*

Paramètres	Longueur (cm)	Poids du corps (g)
Classes de longueur		
Classe 1 : [5 – 6,5]	5,4	11,2
	5,7	16,49
Classe 2 : [6,5 - 8]	7,35	55,48
	7,3	33,4
	7	39,9
	6,9	28,71
Classe 3 : [8 – 9,50]	8,17	73,17
	8,50	59,63
	8,70	58,50
	8,1	43,9
	8,80	80,32
Classe 4 : [9,50 - 11]	10,20	116,50

## **ملخص :**

يهتم هذا البحث العلمي بدراسة خصائص تكاثر ضفدع برمائي ال (*Bufo mauritanicus* (Schlegel, 1841) متواجد بإفريقيا الشمالية من عائلة ال Bufonidae.

لقد درسنا بطريقة معمقة بيولوجيا تكاثر هذا النوع الذي يعيش في المنطقة الرطبة لبني بلعيد الواقعة شرق مدينة جيجل. أجريت الدراسة على عشيرة متكونة من 12 ذكرا و 27 أنثى و التي أخذت بطريقة عشوائية خلال السنتين 2003 و 2004.

الطرق المستعملة هي الدراسة الكلاسيكية للأنسجة، كيمياء الأنسجة التي من خلالها نتعرف على مختلف أنواع السكريات و تحديد كمية الخلايا الجرثومية بمختلف الطرق . بالإضافة إلى تقنيات الكيمياء المناعية للأنسجة و التي تستعمل للتعرف على الهرمونات الجنسية .

تم تحديد 05 مراحل لتطور البيوض و الجريبات عند أنثى هذا النوع.

تم تعريف الخصائص الهرمونية لأعضاء التناسل . خلايا لايدغ على مستوى الخصية و الجريبات المبيضية تعمل على إنتاج الدهون أما الهرمونات الستيرويدية (  $17 \beta$ -oestradiol ) التي لها دور في تنظيم دورة المبيض قد تم البحث عنها بواسطة مقاطع مبيضية.

**كلمات المفاتيح :** بيولوجيا التكاثر، الكيمياء المناعية للأنسجة، الهرمونات الجنسية، خلايا لايدغ، الخصية، الجريبات المبيضية.

## **Résumé :**

Ce travail de recherche a été consacré à l'étude des modalités de la reproduction du crapaud de Maurétanie, *Bufo mauritanicus* (Schlegel, 1841) un Amphibien Anoure d'Afrique du Nord de la famille des Bufonidae. Nous avons étudié de manière exhaustive la biologie de la reproduction de cette espèce vivant dans la zone humide de Béni-Belaïd, située à l'est de Jijel. L'étude a porté sur une population comportant 12 mâles et 27 femelles prélevés de manière aléatoire en 2003 et 2004. Les techniques utilisées sont celles de l'histologie classique, de l'histochimie permettant la mise en évidence de divers types de glucides et la quantification des cellules germinales par diverses méthodes. Les techniques immunohistochimiques sont également utilisées pour la mise en évidence d'hormones sexuelles. Cinq stades de développement des ovocytes et follicules chez la femelle de *Bufo mauritanicus* ont été décrits. Les aspects hormonaux des gonades sont mis en évidence. Pour cela, les lipides sont détectés dans les cellules de Leydig des testicules et dans les follicules ovariens. Les hormones stéroïdes ( $17 \beta$ -oestradiol) impliquées dans la régulation du cycle ovarien ont ensuite été recherchées sur les coupes d'ovaires.

**Mots clés :** *Bufo mauritanicus*, biologie de la reproduction, immunohistochimie, hormones sexuelles, cellules de Leydig, testicules, follicules ovariens.

## **Summary :**

This research has been devoted to the study of methods of toad reproduction, *Bufo mauritanicus* (Schlegel, 1841) an anuran amphibians from North Africa to the family Bufonidae. We have exhaustively studied the reproductive biology of this species living in wetland Beni-Belaïd, located east of Jijel. The study focused on a population comprising 12 males and 27 females randomly collected in 2003 and 2004. The techniques used are those of the traditional histology, histochemistry of allowing the identification of various types of glucids and quantification of germ cells by various methods. The immunohistochemical techniques are also used for the identification of sex hormones. Five developmental stages of oocytes and follicles in the female of *Bufo mauritanicus* have been described.

The gonadal hormonal aspects are highlighted. For this, lipids were detected in the Leydig cells of testes and ovarian follicles. Steroid hormones ( $17 \beta$ -oestradiol) involved in regulating the ovarian cycle were then searched on the sections of ovaries.

**Keywords:** reproductive biology, immunohistochemistry, sex hormones, Leydig cells, testis, ovarian follicles.