

**BULLETIN MENSUEL**  
**DE LA**  
**SOCIÉTÉ LINNÉENNE DE LYON**

**Siège social : 33 rue Bossuet, F 69006 LYON**

Rédaction : P. BERTHET

**EXPOSITION**  
**DE MYCOLOGIE ET SCIENCES NATURELLES**

**Samedi 14 au lundi 16 octobre**

Mairie du 8<sup>e</sup> arrondissement, 12 avenue J. Mermoz

Les portes seront ouvertes le samedi de 14 h 30 à 19 heures,  
le dimanche et le lundi de 9 heures à 19 heures sans interruption.

Entrée gratuite pour les membres, sur présentation de la carte.

# Étude comparative du dynamisme de la spermatogenèse chez les Amphibiens par la méthode histoautoradiographique à la thymidine tritiée

*F. Neyrand de Leffemberg et J.-M. Exbrayat*

*Laboratoire de Biologie générale et Histologie, Université catholique de Lyon  
et Laboratoire d'Etude du Développement post-embryonnaire des Vertébrés inférieurs,  
25 rue du Plat, 69288 Lyon Cedex 02.*

Résumé. — La cinétique de la spermatogenèse des Amphibiens est liée à la position phylogénique de l'espèce et aux facteurs de l'environnement. L'injection de thymidine tritiée dans les testicules de représentants des trois Ordres d'Amphibiens (Gymnophiones, Urodèles et Anoures) montre qu'il existe une corrélation étroite entre le type de cycle et le climat d'une part et entre l'âge de la maturité sexuelle et la durée de la vie d'autre part. La durée de la méiose, caractéristique de chaque espèce, est liée à des facteurs génétiques et écologiques.

## **Comparative study of spermatogenesis in Amphibians, by help of tritiated thymidine histoautoradiography.**

Summary. — In Amphibians, kinetic of spermatogenesis is linked to phyletic position and environmental factors. By means of tritiated thymidine injections in testis of Gymnophiona, Urodela and Anura, we are able to show narrow correlations between cycle type and climate, and between sexual maturity age and life duration. Meiosis duration is species-specific, and it is linked to genetic and ecological factors.

### INTRODUCTION

Chez les Vertébrés, la différenciation des cellules germinales mâles est un processus hautement ordonné (LOFTS, 1974). 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, 1973).

Divers travaux ont par ailleurs montré que les Amphibiens (Gymnophiones, Urodèles et Anoures) présentent des cycles testiculaires saisonniers marqués (EXBRAYAT, 1992 ; EXBRAYAT et FLATIN, 1985 ; DELSOL *et al*, 1981).

Afin de se faire une idée plus précise de la durée de la spermatogenèse et de sa modulation par les facteurs externes, chez les Amphibiens, quelques auteurs ont utilisé une méthode dynamique nécessitant l'injection de thymidine tritiée ( $^3\text{HThy}$ ). Divers travaux ont été effectués chez des Anoures, des Urodèles et chez un Gymnophione. L'utilisation de  $^3\text{HThy}$  permet la mise en évidence de la phase de multiplication cellulaire avant et après la méiose ; elle permet également de déterminer la durée de la prophase méiotique de la spermiogenèse.

Nous proposons ici de faire une synthèse de ces travaux et de montrer l'apport de cette méthode à la détermination de la durée des diverses phases du cycle spermatogénique chez les Amphibiens, Classe de Vertébrés qui représente une transition entre la vie aquatique et la vie terrestre.

## I. MÉTHODE

### 1) L'HISTO AUTORADIOGRAPHIE

L'histoautoradiographie consiste à injecter un précurseur radioactif d'une substance que l'on désire localiser dans un organisme. Après un temps de contact plus ou moins long, l'organe contenant théoriquement la substance est prélevé puis traité par l'histologie. Les coupes déparaffinées et hydratées sont recouvertes d'une émulsion photographique qui sera impressionnée par la substance radio-active, pendant une phase de contact en chambre noire qui durera quelques jours à quelques semaines. Après révélation et fixation de l'émulsion, des grains d'argent apparaîtront au niveau de la substance radio-active, ce qui permettra sa localisation (GABE, 1968).

Cette méthode a été utilisée pour étudier la dynamique spermatogénétique. Pour cela, les auteurs se sont intéressés à l'instant où, dans les cellules concernées par la division réductionnelle de la méiose, la duplication de l'ADN (phase S) démarre. Le traceur radio-actif choisi a été, dans tous les cas, la thymidine tritiée ( $^3\text{HThy}$ ), nucléotide spécifique de l'ADN, rendu radioactif par la présence d'atomes de tritium.

### 2) LA SPERMATOGÉNÈSE

Rappelons que la spermatogenèse démarre par une phase de multiplication des spermatogonies primaires. Elle est suivie par une phase d'accroissement des spermatogonies secondaires qui se différencient en spermatoctes de premier ordre. Ces derniers entrent en méiose. Après une première prophase complexe divisée en plusieurs stades, ces cellules entrent en division réductionnelle au cours de laquelle le nombre de chromosome diminue de moitié. Ceci conduit à la formation de quatre spermatoctes secondaires à partir d'un seul spermatoctes primaire. C'est au cours de cette première division que la quantité d'ADN double. Cette phase a été appelée « phase préméiotique S » (CALLAN et TAYLOR, 1968) ou encore « phase méiotique S » (MONESI, 1962). Une deuxième division, équationnelle, conduit alors à la formation de spermatoctes qui se différencient en spermatozoïdes au cours de la phase de spermiogenèse. Globalement, l'incorporation de  $^3\text{HThy}$  pourra se faire à deux instants : avant la division des spermatogonies primaires et avant la division réductionnelle des spermatoctes primaires.

L'utilisation de la méthode histoautoradiographique chez plusieurs espèces permet de comparer la durée de la phase S et la durée totale de la spermatogénèse.

Une seule injection de <sup>3</sup>HThy, permet de suivre les cellules germinales à évolution lente. Avec une série d'injections quotidiennes il est possible de suivre les cellules à évolution rapide, en quantifiant les derniers maxima de chaque étape. Sachant que les cellules marquées les plus évoluées sont en phase de synthèse d'ADN au moment de l'administration du marqueur, le repérage de ces cellules chez plusieurs animaux va permettre d'établir une vitesse spermatogénétique moyenne.

Si l'on admet que la fréquence d'un événement qui ne retourne pas à un stade antérieur reflète la durée relative de cet événement, les fréquences des différents stades spermatogénétiques pris à un moment précis de l'expérimentation peuvent refléter la durée de chaque stade particulier. Ce qui revient à dire que les phases méiotiques les plus rarement rencontrées, telles que les anaphases I ou II, durent peu de temps. Par contre les phases rencontrées communément, telles que la prophase méiotique sont achevées en un temps plus long.

## II. LES CYCLES DE REPRODUCTION DES AMPHIBIENS

Les Amphibiens peuvent présenter trois sortes de cycles : les cycles à spermatogénèse discontinue, potentiellement continue ou continue. De nombreux travaux ont porté sur les cycles de reproduction des Anoures et des Urodèles. Peu d'entre eux, par contre, sont consacrés aux Gymnophiones.

### 1) CYCLES DE REPRODUCTION CHEZ LES GYMNOPHIONES

Quelques espèces seulement ont fait l'objet d'études. Chez les Gymnophiones, chaque testicule est constitué de plusieurs lobes eux-mêmes divisés en lobules à l'intérieur desquels se déroule la spermatogénèse (photo 1). Les lobules comportent des cellules de Sertoli géantes entre lesquelles se développent les cellules germinales.

De manière générale, les cycles de reproduction des Gymnophiones mâles comportent donc une phase d'activité et une phase de repos sexuel (type discontinu). (*Ichthyophis glutinosus* de Sri Lanka, SARASIN et SARASIN, 1887-1890 ; *Ichthyophis sp.*, *Ichthyophis beddomei*, de Mysore en Inde, SESHACHAR, 1936, BHATTA, 1986 ; *Dermophis mexicanus* du Guatemala, WAKE, 1980 ; *Gymnopsis multiplicata*, WAKE, 1968, 1995).

Chez *Typhlonectes compressicaudus*, la seule espèce étudiée par histoautoradiographie, les testicules présentent des spermatogonies en juin ; elles se multiplient et se différencient en juillet et août. A partir de cette période, toutes les catégories germinales sont représentées, et des mesures quantitatives effectuées sur coupes histologiques ont pu montrer que le stock de cellules germinales demeurerait constant jusqu'en décembre, période où démarre la reproduction. Entre décembre et avril-mai, la quantité de cellules germinales diminue dans les testicules, par suite de l'évacuation des spermatozoïdes dont le stock est reconstitué au fur et à mesure qu'ils sont éliminés (EXBRAYAT, 1986, 1993). Pour préciser la dynamique des cellules

germinales chez cette espèce, plusieurs animaux ont reçu une injection de  $^3\text{HThy}$ . Ils ont été examinés entre 24 heures et 6 semaines après l'injection. Chez un animal injecté en juin et 24 heures après l'injection, les testicules ne présentent que des spermatogonies et des spermatocytes primaires. Le marquage caractéristique de la phase S est visible au niveau des spermatogonies secondaires et des spermatocytes primaires. Il y a donc eu incorporation de  $^3\text{HThy}$ , reflet de la synthèse d'ADN. Chez des animaux injectés en octobre, aucune cellule germinale n'est marquée, même six semaines après l'injection, bien que toutes les catégories soient représentées. Les cellules germinales sont donc bien stockées avant la période de reproduction. Enfin, chez les animaux injectés en décembre, donc au début de la période de reproduction, un nouvel aspect de la cinétique spermatogénétique a pu être mis en évidence. Une semaine après l'injection, aucun marquage n'est révélé. Deux semaines après, quelques spermatocytes II, des spermatides et des spermatozoïdes de stades différents présentent un marquage. Trois semaines après l'injection, des spermatides âgés et des spermatozoïdes sont marqués. Après quatre semaines, seuls quelques spermatozoïdes sont révélés par des précipités de grains d'argent.

Ces résultats ont permis de préciser la cinétique de la spermatogenèse et du cycle sexuel de *Typhlonectes compressicaudus*. En juin-juillet, la spermatogenèse permet la reconstitution du stock de cellules germinales. Durant la période de repos sexuel, ces dernières sont réellement stockées puisque aucune incorporation de nucléotide n'a été observée. Au moment de la reproduction, à partir de décembre, une nouvelle spermatogenèse permet

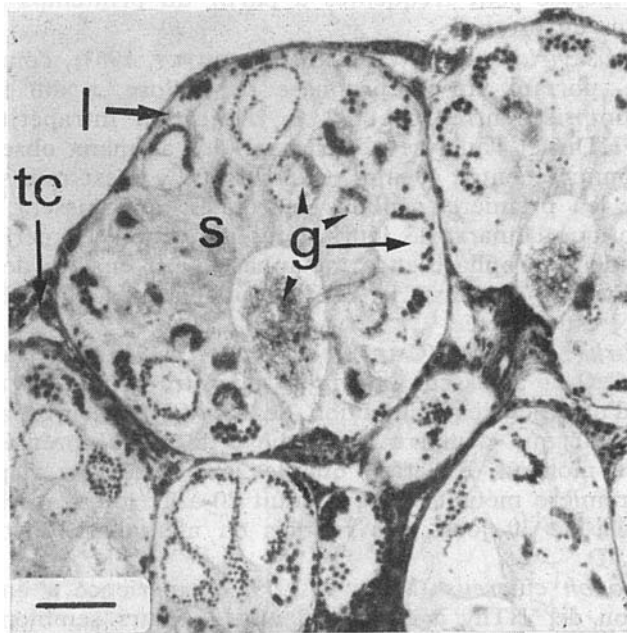


Photo 1 : Coupe transversale de lobe de testicule chez *Typhlonectes compressicaudus*, Amphibien Gymnophione. L'échelle indique 180  $\mu\text{m}$ . l : lobe ; s : cellules de Sertoli géantes ; g : groupe de cellules germinales ; tc : tissu conjonctif.

le remplacement des spermatozoïdes évacués. Il n'est cependant pas possible, *a priori*, de préciser si cette deuxième spermatogenèse nécessite une nouvelle multiplication des spermatogonies. Cependant, la confrontation des observations histologiques et des marquages radio-actifs laisse supposer qu'une telle multiplication n'a pas eu lieu. En effet, l'étude quantitative montre que le nombre total de cellules germinales diminue progressivement pendant cette période.

Les résultats de l'étude histoautoradiographique donnent quelques indications sur la durée de la spermatogenèse, en décembre. La durée minimale est vraisemblablement comprise entre une et deux semaines après la deuxième division de méiose. En effet, la  $^3\text{HThy}$  n'est pas encore incorporée par les cellules germinales une semaine après le marquage, mais deux semaines suivant l'injection, elle est incorporée dans l'ADN des cellules postméiotiques. Ces résultats laissent supposer que la phase de différenciation des spermatocytes II peut être différée.

## 2) CYCLES DE REPRODUCTION CHEZ LES URODÈLES

Chez les Urodèles, les cellules de chaque catégorie germinale sont rassemblées en cystes contenus dans des lobules connectés à un canal évacuateur. Au printemps, les spermatozoïdes des régions postérieures des testicules s'échappent des lobules ; le testicule est donc vidé et occupé par des cellules en dégénérescence. Dans les régions antérieures, une autre spermatogenèse se réalise. Les tritons dont quelques espèces ont été étudiées par histoautoradiographie présentent un cycle discontinu au cours duquel les phases de méiose sont fréquentes à partir du printemps alors qu'elles sont inexistantes en hiver.

Chez *Triturus viridescens* (WIMBER et PRENTSKY, 1963), l'étude histoautoradiographique, portant sur la prophase de méiose, a été menée à une température comprise entre 20 et 22 °C. L'injection intrapéritonéale a été de 10  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{HThy}$  et l'analyse a porté sur des animaux observés pendant une période comprise entre 40 mn et 26 jours. Ce n'est que 4 jours après l'injection que les premières cellules marquées apparaissent. La synthèse d'ADN préméiotique démarre 13 jours après l'injection. La période comprise entre le début de la prophase et la métaphase I est ensuite de 11 jours. La prophase (2<sup>e</sup> division) démarre le 12<sup>e</sup> jour au cours de laquelle une faible synthèse d'ADN est détectée.

Chez *Triturus vulgaris* (CALLAN et TAYLOR, 1968), les animaux sont maintenus à 16 °C et subissent une injection intrapéritonéale de 20  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{HThy}$  suivie d'une deuxième injection de 20  $\mu\text{Ci}$  24 heures après. Il faut 9 à 10 jours pour que démarre la synthèse de l'ADN préméiotique. C'est seulement à ce moment, en effet, que les spermatocytes (leptotène) sont marqués. La première métaphase se produit 20 à 21 jours après la fin de la phase S. Au-delà de 30 jours, les cellules en métaphase II ont incorporé la  $^3\text{HThy}$  (Tab. I).

Chez *Plethodon cinereus* (MORGAN, 1979), l'expérience a été effectuée à 20 °C. L'injection de  $^3\text{HThy}$  a été de 25  $\mu\text{Ci}$ . 26 jours semblent nécessaires entre la phase S (spermatocytes I) et la fin de la méiose. Entre le 26<sup>e</sup> et le 37<sup>e</sup> jour, les cellules marquées les plus évoluées sont de jeunes spermatides. Cependant, l'absence de ségrégation de marquage dans les cellules, 37 jours

après l'injection (en effet, toutes les cellules ont incorporé la  $^3\text{HThy}$ ) indique que ces cellules étaient en phase S au moment de l'injection ; si on soustrait les 26 jours nécessaires à la méiose, ceci suggère que la phase S dure au moins onze jours (Tab. I).

### 3) CYCLES DE REPRODUCTION CHEZ LES ANOURES

Chez les Anoures, chaque testicule est formé d'un seul lobe composé de tubes séminifères à l'intérieur desquels les cellules de même stade germinal sont regroupées en cystes.

#### a) Cycles à spermatogenèse continue

Dans ce cas, la spermatogenèse se réalise par petites divisions et différenciations successives. Dans un même tube séminifère, on trouve

Espèce	T°	phase S	méiose	spermat.
<i>Triturus vulgaris</i>	16 °C	20-21 j	9 j-10 j	> 30 j
<i>Triturus viridescens</i>	20-22 °C	13 j	12 j	
<i>Plethodon cinereus</i>	20 °C	26 j	11 j	
<i>Phrynobatrachus calcaratus</i>	30 °C	2 h	1 h-24 h	8 j
<i>Ptychadena maccartyensis</i>	30 °C	24 h	4 h-24 h	> 8 j
<i>Bufo regularis</i>	30 °C	8 j	2 h-8 j	21 j
<i>Xenopus laevis</i>	18 °C	23 j	6 j-7 j	37 j
<i>Rana esculenta</i>				
avril	20 °C	7 j-10 j	2 h-4 h	21 j
juil.	20 °C	1 h-12 j	1 h-2 h	
juil.	30 °C	1 j-8 j	1 h-2 h	12 j
nov.	0 °C	8 j	24 h	
<i>Rana lessonae</i>				
avril	20 °C	7 j-10 j	2 h-4 h	> 21 j
juil.	20 °C	1 h-12 j		
juil.	30 °C	1 j-8 j	1 h-15 h	12-14 j
nov.	0 °C	8 j	24 h	

Tableau I : Durées de la phase S, de la méiose et de la spermatogenèse chez quelques espèces d'Amphibiens ayant subi l'injection de thymidine tritiée.

plusieurs amas de catégories cellulaires différentes. Pendant toute l'année, des spermatozoïdes sont observés sur les cellules de Sertoli et dans la lumière des tubes séminifères et des canaux évacuateurs, ce qui suggère que leur évacuation est continue. Toutes les étapes de la spermatogenèse sont ainsi présentes simultanément dans un même tube séminifère, la formation de 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 leavis* (KALT, 1976) et dans les testicules de quatre Batraciens africains : *Bufo regularis*, *Phrynobatrachus calcaratus*, *Ptychadena maccartyensis* et *Ptychadena oxyrhynchus*, chez lesquels l'influence de la température sur le dynamisme de la spermatogénèse a été déterminé (GUEYDAN-BACONNIER, 1980, PUJOL, 1985, GUEYDAN-BACONNIER *et al*, 1984, DELSOL *et al*, 1981).

Chez *Xenopus leavis* (KALT, 1976), les animaux ont été maintenus à 18 °C. Ils ont reçu une injection intrapéritonéale de 10  $\mu$ Ci de  $^3$ HThy, puis ils ont été sacrifiés 1 à 45 jours après, afin de déterminer la durée de la prophase préméiotique et de la spermatogenèse ; la durée de vie de chaque stade a également été calculée. Pour cela, une injection quotidienne de 5  $\mu$ Ci de  $^3$ HThy a été effectuée. A 18 °C, les cellules qui évoluent le plus rapidement sont les spermatocytes au stade leptotène qui sont marqués 4 jours après l'injection ; ce n'est que le 5<sup>e</sup> jour qu'apparaissent les cellules au stade zygotène. La première division de méiose est observée 23 jours après l'injection et les premiers spermatides 24 jours après l'injection mais ce n'est qu'au 37<sup>e</sup> jour que des spermatozoïdes marqués sont observés (Tab. I).

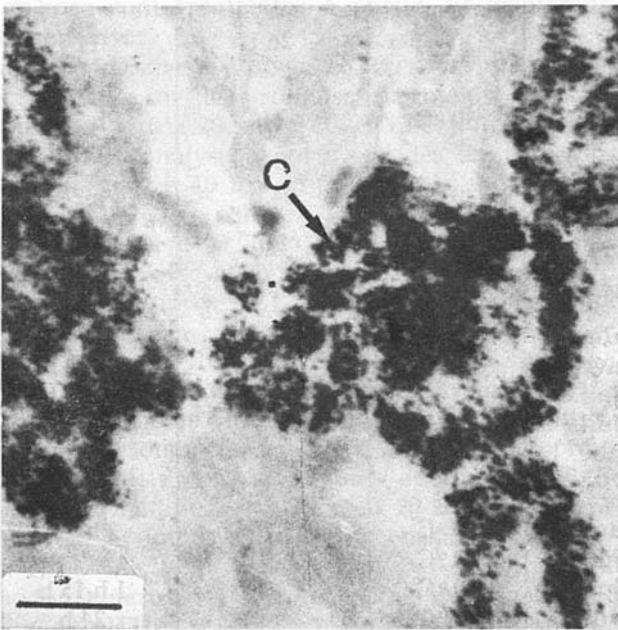


Photo 2 : Mise en évidence par histoautoradiographie des spermatocytes de premier ordre chez *Bufo regularis*, Amphibien Anoure à cycle continu. L'échelle indique 20  $\mu$ m. c : spermatocytes de premier ordre.

Les divisions méiotiques ont lieu dans un délai de 24 heures et la spermiogénèse se fait en 12 jours. La phase S dure environ 6,3 jours. Cette durée relative de la phase S a été calculée en prenant le nombre de stades préméiotiques E par rapport au nombre de spermatogonies secondaires.

Chez *Bufo regularis* (photo 2), la durée de la spermatogénèse est de trois semaines à 30 °C. Les spermatogonies en phase S sont marquées 15 mn après l'injection, les spermatocytes I, deux heures après, les spermatocytes II huit jours après ; des spermatides et des spermatozoïdes sont marqués 21 jours après le début de l'expérience (Tab. I). L'évolution des taux de marquage permet d'évaluer approximativement la durée minimale des étapes spermatogénétiques. La division mitotique des spermatogonies II est effectuée en 24 heures, l'évolution des spermatogonies (phase S) en spermatocytes I peut s'effectuer en moins de deux heures. Une phase de latence de 14 jours a été constatée pour la majorité des spermatocytes I, puis l'évolution de quelques spermatocytes I en spermatocyte II s'effectue en huit jours. La transformation de spermatocytes II en spermatozoïdes demande 15 jours. En faisant la somme des durées minimales de chaque étape, on obtient une durée totale minimale de 21 jours pour la spermatogénèse chez les animaux à maturation rapide. L'étude par histoautoradiographie permet de préciser que, chez tous les animaux et quel que soit le mois auquel a été effectuée l'expérimentation, des spermatogonies entrent en multiplication, mais une partie seulement d'entre elles s'engage dans la spermatogénèse.

Chez *Phrynobatrachus calcaratus*, 15 minutes après l'injection, la <sup>3</sup>HThy a été incorporée dans des spermatogonies préméiotiques S et quelques spermatocytes I, dans tous les testicules étudiés. 8 jours après l'injection, les premiers spermatozoïdes marqués apparaissent dans quelques testicules et 14 jours après l'injection, tous les spermatozoïdes sont marqués dans tous les testicules étudiés (Tab. I). Chez cette espèce, l'évolution des spermatogonies préméiotiques S en spermatocytes I s'effectue donc en quinze minutes et celle des spermatocytes I en spermatocytes II s'effectue en deux heures. Le marquage des spermatogonies I s'observe 24 heures après l'injection, comme chez *Bufo regularis*, mais n'apparaît plus huit jours après l'injection. Dès la seizième heure, on observe quelques spermatides marquées mais il faut attendre huit jours pour observer des spermatozoïdes marqués. La spermatogénèse de *Phrynobatrachus* peut donc se réaliser en un minimum de huit jours.

Chez *Ptychadena maccartyensis*, la spermatogénèse est beaucoup moins rapide que chez les deux autres Anoures tropicaux. Chez cette espèce, le stade spermatocyte II n'est pas dépassé huit jours après l'injection. L'incorporation de <sup>3</sup>HThy aux premiers stades spermatogénétiques n'est révélée que deux heures après l'injection. Des spermatocytes II sont marqués 24 heures après l'injection. La cinétique spermatogénétique de cette espèce, maintenue à 30 °C, se rapproche de celle d'un Anoure à cycle potentiellement continu tels que *Rana esculenta* et *Rana lessonae* (voir *infra*).

#### b) Cycles à spermatogénèse potentiellement continue.

C'est GALGANO (1934) qui, le premier a défini ce type de cycle. LOFTS (1964) l'a étudié chez *Rana esculenta*. Chez les espèces qui présentent un tel cycle, les tubes séminifères présentent, en hiver, quelques spermatogonies en division. Généralement, les gamètes ainsi formés dégèrent au stade spermatocyte

mais peuvent parfois évoluer jusqu'au stade des spermatozoïdes ; au printemps (avril-mai), le nombre de spermatozoïdes augmente, en juin, la fécondation a lieu ; en août et septembre, une nouvelle spermatogenèse se réalise complètement. Cependant, cette dernière peut être bloquée par un abaissement de température. Il n'existe donc pas de vraie période de repos du testicule. Ce cycle dépend des facteurs externes et notamment de la température. Chaque stade spermatogénétique a une tolérance thermique cellulaire propre (CEI, 1949). L'hygrométrie et la nourriture sont également des facteurs importants.

Chez *Rana esculenta*, une élévation de température pendant l'hiver conduit à une spermatogenèse complète. Aux autres périodes, la spermatogenèse est arrêtée par un abaissement de température (LOFTS, 1974, DELSOL *et al*, 1981). RASTOGI (1976) a pu montrer que l'arrêt de la spermatogenèse de *Rana esculenta* en hiver était en relation avec les basses températures. La reprise de la gamétogenèse est observée lorsque la température est à nouveau favorable. Le maintien de cette fourchette de température (15 à 25 °C) représente également le facteur thermique optimal pour une spermatogenèse active. A des températures inférieures à 10 °C, la vitesse de la spermatogenèse diminue ; on constate un retard au niveau de l'évolution des spermatogonies en spermatocytes primaire (RASTOGI *et al*, 1983). Donc température et photopériode ont une influence importante sur l'activité spermatogénétique de *Rana esculenta*.

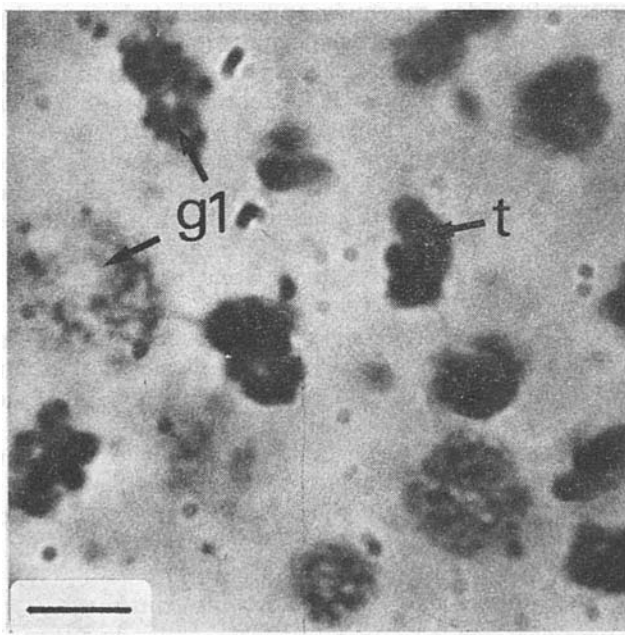


Photo 3 : Mise en évidence par histoautoradiographie des spermatogonies en phase préméiotique S chez *Rana lessonae*, Amphibien Anoure à cycle potentiellement continu. L'échelle indique 20  $\mu$ m. gl : spermatogonies en phase S ; t : jeunes spermatozoïdes (non marqués).

*Rana esculenta* et *Rana lessonae* possèdent, en France, un cycle potentiellement continu caractérisé par quelques divisions spermatogoniales en hiver et une spermatogenèse complète en avril-mai (GUYETANT, 1986). Après la mise en évidence de l'existence d'un complexe regroupant *Rana lessonae*, *Rana ridibunda* et *Rana esculenta*, leur hybride (BERGER, 1964, 1976), il était intéressant de comparer la cinétique spermatogénétique entre les deux espèces *Rana lessonae* et *Rana esculenta* et d'essayer de mettre en évidence si l'incidence saisonnière dépendait de facteurs génétiques ou de facteurs écologiques (incidence thermique) ou des deux combinés (NEYRAND DE LEFFEMBERG, 1988 ; NEYRAND DE LEFFEMBERG et EXBRAYAT, 1987, 1991).

Pour cela des animaux capturés en Dombes (France) à différentes périodes de l'année, ont subi une injection de  $^3\text{HThy}$  puis ont été sacrifiés après des durées variables. Les périodes de l'année et les températures choisies ont été novembre (0 °C), janvier (10 °C), avril (20 °C), mai (22 °C), juillet (5 °C, 20 °C et 30 °C).

A 0 °C (en novembre de cette année-là), chez les deux espèces, les spermatocytes II représentent, 8 jours après l'injection, le stade spermatogénétique marqué le plus évolué (photo 3). A 10 °C (en janvier), le stade spermatocyte I représente le stade marqué le plus avancé, même 14 jours après la mise en expérience. A 20 °C (avril), les spermatocytes II sont marqués 6 heures après l'injection. Chez *Rana esculenta*, en juillet, à la même température (20 °C), la  $^3\text{HThy}$  a été incorporée dans les spermatocytes II une heure seulement après l'injection et des spermatides sont marquées dès le 14<sup>e</sup> jour après la mise en expérience (Tab. I). En jouant sur les variations de température, en juillet, on a pu montrer l'importance de cette dernière sur le bon déroulement de la spermatogenèse. A 5 °C, il y a blocage au stade spermatocyte I ; à 30 °C, il y a accélération de la spermatogenèse puisque des spermatides sont marqués dès le 10<sup>e</sup> jour suivant l'injection, comme en mai, période de reproduction.

La cinétique globale de la spermatogenèse s'avère plus rapide à 22 °C en mai (période de reproduction) chez *Rana esculenta*. A 30 °C, en juillet, elle s'avère à peu près identique chez les deux espèces.

Pour affiner l'analyse de la cinétique spermatogénétique, deux indices chiffrés ont été définis pour chaque temps d'expérimentation donné, chez l'animal qui présente le stade spermatogénétique marqué le plus évolué :

— la fréquence du marquage total (Ft) :

$$Ft = \frac{\text{Nb total de cellules germinales marquées}}{\text{Nb total de cellules germinales}}$$

— l'indice d'incorporation de chaque stade spermatogénétique (Ii) :

$$Ii = \frac{\text{Nb total de cellules germinales marquées d'une catég.}}{\text{Nb total de cellules de chaque catégorie}}$$

Ces deux indices ont été définis, par une analyse quantitative, pour chaque animal sur trente champs optiques (intégrateur de Zeiss) dispersés dans la partie moyenne du testicule (220 cystes par animal). Cette étude a

été effectuée sur des animaux capturés en avril (20 °C), en juillet (5 °C, 20 °C et 30 °C).

1) Chez *Rana esculenta*, en avril, tous les stades de la spermatogenèse ont été marqués, une heure seulement après l'injection. Chez *Rana lessonae*, le marquage est alors limité aux spermatocytes II. La fréquence de marquage (Ft) devient égale chez les deux espèces, trois semaines après le début de l'expérimentation. L'examen des valeurs de Ii laisse supposer qu'il existe des différences dans les modalités de la spermatogenèse chez les deux espèces. Chez *Rana lessonae*, toutes les spermatogonies se divisent entre la huitième et la quinzième heure suivant l'injection, l'élaboration des spermatocytes II demande donc moins de huit heures. Tous les spermatocytes II sont néoformés entre le septième et le dixième jour après l'injection mais dégèrent ensuite. Chez *Rana esculenta*, le démarrage de la spermatogenèse paraît plus rapide ; huit heures après l'injection, les spermatogonies I ne sont plus marqués alors que les catégories supérieures ont déjà incorporé le traceur radio-actif. La spermiogenèse démarre entre le septième et le dixième jour et les spermatozoïdes sont formés en moins de 21 jours (Tab. I).

Il se pourrait que, chez *Rana esculenta*, en avril à 20 °C, la première phase de multiplication des spermatogonies conduite directement à la formation des spermatozoïdes. Chez *Rana lessonae*, il existerait plusieurs phases de multiplication qui n'aboutiraient pas toutes à la formation de spermatozoïdes. Le mois d'avril semble être une période de reproduction vraie pour *Rana esculenta* et de pré-reproduction pour *Rana lessonae*.

2) En juillet, à 30 °C (température obtenue artificiellement), après la reproduction, *Rana esculenta* présente deux fois plus de cellules germinales marquées que *Rana lessonae*, dès la première heure qui suit l'injection. A la fin de l'expérimentation (12 jours), les Ft des deux espèces sont comparables. A 20 °C, dans les conditions naturelles, l'examen des Ft montre des cinétiques identiques.

Si l'on compare les valeurs de Ii chez les animaux faisant l'objet de l'expérimentation de juillet, dans les conditions naturelles (20 °C) cet indice est maximal pour les spermatogonies chez *Rana esculenta* par rapport à *Rana lessonae*. Cependant, la méiose est bloquée chez les deux espèces. Une élévation de température (30 °C) favorise la formation des spermatides chez *Rana lessonae* et la différenciation des spermatides en spermatozoïdes chez *Rana esculenta*. La cinétique est donc globalement plus rapide chez cette dernière espèce.

3) La comparaison des cinétiques spermatogénétiques chez des individus des deux espèces étudiés en avril à 20 °C, et en juillet, à 20 °C et 30 °C donne des renseignements intéressants.

A 20 °C, en effet, c'est seulement en avril que la spermatogenèse est complète chez les deux espèces. En juillet, période de post-reproduction, une température de 20 °C (un peu basse pour la saison) bloque la spermatogenèse chez les deux espèces. Par contre une élévation de température (30 °C) démasque les cinétiques des spermatogenèses des deux espèces. Dans ce cas, l'analyse fine (examen des Ii) montre que la spermatogenèse est toujours plus rapide chez *Rana esculenta*.

La physiologie est différente chez les deux espèces. En avril, la première phase de multiplication des spermatogonies conduisait directement à la

formation des spermatozoïdes chez *Rana esculenta* alors que chez *Rana lessonae* plusieurs phases de multiplication n'aboutissent pas toutes à la formation des spermatozoïdes donc une phase de préspermatogénèse semble exister. L'expérimentation menée en juillet confirme la différence existant entre les cinétiques.

## CONCLUSIONS

L'utilisation de la méthode histoautoradiographique pour l'étude des testicules des Amphibiens montre que les modalités de la synthèse de l'ADN sont disparates au cours de la spermatogénèse. Cette méthode permet de préciser les effets de certains facteurs écologiques ; elle permet également d'apprécier la durée des différentes phases de la spermatogénèse.

### 1 — EFFETS DES FACTEURS ÉCOLOGIQUES

De manière générale, il semble exister des corrélations étroites entre le type de cycle et le climat. D'autres facteurs cependant pourraient intervenir. GAVAUD (1975) a fait remarquer que l'ensemble du métabolisme de l'animal intervient dans la régulation de la spermatogénèse. En effet, c'est en rapport avec la maturité sexuelle, la durée de vie de l'espèce que s'ajoutent les facteurs de l'environnement (température, photopériode et précipitations). Ce n'est donc pas seulement en fonction de la seule position phylétique que s'expliquent les disparités de la vitesse spermatogénétique. Des espèces proches peuvent présenter des cycles continus ou discontinus. *Rana iberica* et *Rana latastei*, par exemple, ont un cycle potentiellement continu bien que ces espèces soient très proches de *Rana temporaria* qui, elle, possède un cycle discontinu. De même, chez les espèces *Rana ridibunda* et *Discoglossus pictus*, les mâles des populations d'Afrique du Nord ont un cycle continu alors que ceux qui vivent dans le sud de la France ont un cycle discontinu (GALGANO, 1934, KEHL, 1944).

Chez les endothermes (Mammifères), la durée de la spermatogénèse est constante et les facteurs du milieu n'interviennent qu'en modifiant son rendement (ORTAVANT, 1956).

Les ectothermes sont très sensibles aux fluctuations de l'environnement. La température modifie la durée de la spermatogénèse des Poissons (EGAMI et HYODO-TAGUCHI, 1967 ; BILLARD, 1968) ; chez les Reptiles, la spermatogénèse ne peut s'effectuer que dans des limites précises de température (LICHT, 1966, LICHT et BASU, 1967). Les Anoures, Urodèles et Gymnophiones montrent un cycle testiculaire saisonnier marqué. Chez les animaux à cycle potentiellement continu, la température joue un rôle important dans la synchronisation des différentes phases du cycle sexuel. La photopériode a moins d'influence, sauf dans le cas de *Rana esculenta* où elle modifie l'activité spermatogénétique (RASTOGI *et al*, 1978) ; les précipitations influencent les modalités de la ponte. Une combinaison de température et de photopériode critiques est nécessaire à la régulation et au maintien d'une spermatogénèse active : en effet, aucun de ces deux facteurs n'est effectif en l'absence de l'autre.

Dans les régions où vivent les trois Anoures africains étudiés, *Phrynobatrachus calcaratus*, *Ptychadena maccartyensis*, *Bufo regularis* et

chez le Gymnophione *Typhlonectes compressicaudus*, la température varie peu et ne peut donc être un facteur déterminant du cycle sexuel. Cependant, par son aspect tropical, elle pourrait être responsable du caractère continu de la reproduction (sauf chez *Typhlonectes compressicaudus*). Dans les pays tropicaux, la constante thermique est généralement accompagnée de grandes variations de la pluviométrie. Cette dernière a des répercussions tant sur l'existence de lieux possibles de ponte (mares temporaires ou savanes inondées) que sur la quantité de nourriture disponible. Par ailleurs, la présence d'organes de réserve et notamment de corps adipeux tamponne, dans certains cas, les fluctuations saisonnières de la quantité de nourriture disponible. Ces organes pourraient ainsi permettre le déroulement continu de la gamétogenèse (PUJOL, 1985, NEYRAND DE LEFFEMBERG, non publié, EXBRAYAT, 1988). Les variations saisonnières de la pluviosité semblent cependant sans effet sur la dynamique des différentes catégories de cellules spermatogénétiques. Il semblerait que chez les animaux à cycle continu le testicule aurait une courte période de repos au cours de laquelle il se comporterait comme organe de réserve de cellules germinales. Cette constatation est également valable dans le cas de *Typhlonectes compressicaudus*.

Chez les Urodèles étudiés, tous à cycle discontinu, la température joue aussi un rôle. Ceci est vraisemblablement en relation avec les variations saisonnières marquées auxquelles ces animaux sont soumis.

Chez ces espèces, et notamment chez *Triturus viridescens*, les spermatocytes, déjà marqués en fin de phase S, entrent en métaphase en 12 jours. Bien que méiotiquement inactif à cette période de l'année (l'expérimentation a été menée en février, en Caroline du Nord, Etats-Unis), ces animaux ont pu entrer en méiose lorsqu'ils étaient maintenus à 20 ou 22 °C.

## 2 — DURÉE DES PHASES DE LA SPERMATOGÉNÈSE

La durée de la méiose est un des aspects les plus variables du processus de la gamétogenèse. Cette durée dépend des facteurs environnants, de la quantité d'ADN, du niveau de ploïdie de l'organisme et du génotype. La durée de la méiose est donc caractéristique des espèces. Elle est le résultat du complexe « génotype-nucléotype-environnement ». Tous ces facteurs doivent être égaux chez les espèces étudiées si l'on veut établir une relation satisfaisante entre la « C value » (quantité d'ADN nucléaire pour des animaux d'une même classe) et la durée de la méiose des Amphibiens. Afin que ces données soient strictement comparables, elles doivent être converties à la même température. Une augmentation de température au-dessus de la limite thermique à laquelle les organismes peuvent survivre diminue en effet la durée de la méiose. BENETT (1977) a proposé une relation linéaire entre la durée méiotique et la « C value ». Il arrive à la conclusion que, à une température de 20 °C, la méiose durerait environ 15 jours chez *Triturus vulgaris*, 14 jours chez *T. viridescens* et 26 jours chez *Plethodon cinereus*. La longue méiose de *Plethodon* pourrait être attribuée à la présence d'un « stade diffus » spécifique, défini par MORGAN (1979), situé, pendant la prophase, entre le pachytène et le diplotène et durant 8 jours. Si, chez cette même espèce, les spermatocytes passaient directement du stade pachytène

au stade zygotène, la méiose durerait 18 jours seulement et serait donc proche de celle des deux *Triturus*.

Les trois espèces d'Urodèles étudiées sont des espèces terricoles. La Salamandre au dos rouge (*Plethodon cinereus*) habite les forêts de l'Est des Etats-Unis et sa maturité sexuelle est atteinte deux années après la métamorphose. Le triton ponctué ou triton lisse *Triturus vulgaris* a son aire de répartition à travers une grande partie de l'Europe dans les plaines. Il est sexuellement mature à l'âge de trois à quatre ans, pour une durée de vie de 28 ans. *Triturus viridescens* peut acquérir la maturité sexuelle à l'état larvaire (NOLE, 1931), ce qui laisserait supposer que sa méiose est plus rapide par rapport aux deux autres espèces étudiées. La durée de vie de *Plethodon* n'a pas été déterminée. On sait seulement que la durée de vie moyenne des salamandres est beaucoup plus longue que celle des Anoures (DUELLMAN et TRUEB, 1986). Cette durée de vie supérieure pourrait expliquer une méiose plus longue chez les Urodèles.

Chez les trois Anoures africains étudiés, la spermatogenèse dure 7 jours chez *Phrynobatrachus calcaratus*, un peu plus de 7 jours chez *Ptychadena maccartyensis* et plus de 15 jours chez *Bufo regularis*. Cette différence de maturation des étapes spermatogénétiques n'est pas liée à la température qui est constante donc peu perturbante, ni aux grandes variations pluviométriques mais s'explique par les importantes différences biologiques entre ces trois espèces de Ranidae.

*Phrynobatrachus calcaratus* est un animal de petite taille (15 mm de longueur), de faible poids (0,3 g), sa durée de vie est courte (environ un an) et il atteint la maturité sexuelle à quatre mois (GUEYDAN-BACONNIER, 1980). *Ptychadena maccartyensis* a une taille moyenne (4,5 cm), un poids moyen (6,5 g) et il peut vivre trois à quatre ans. Sa maturité sexuelle est atteinte 9 mois après la métamorphose (BARBAULT et TREFAUT-RODRIGUES, 1978). *Bufo regularis* est de grande taille (7,8 cm), de poids élevé (43 g) et sa longévité est supérieure à 10 ans.

Donc la spermatogenèse plus rapide de *Phrynobatrachus* pourrait être en rapport avec sa vie relativement courte alors que la spermatogenèse plus lente de *Bufo regularis* serait en rapport avec sa grande longévité. Chez *Ptychadena*, la durée du processus spermatogénétique est intermédiaire entre celui des deux autres espèces, tout en paraissant également lié à sa longévité (GUEYDAN-BACONNIER *et al*, 1984).

Chez *Xenopus laevis*, dont la taille et la longévité sont comparables à celles de *Bufo regularis*, la maturité sexuelle est atteinte en un ou deux ans (les spermatozoïdes sont formés quatre mois après la métamorphose). La durée de vie de l'animal est de 15 ans mais la spermatogenèse est d'une durée de 37 jours à 18 °C. La lenteur de cette spermatogenèse par rapport à celle de *Bufo regularis* s'expliquerait par la différence de température à laquelle vivent les deux espèces. *Xenopus laevis* vit à une température naturelle de l'ordre de 30 °C et l'expérimentation a été conduite à 18 °C, ce qui a certainement ralenti la spermatogenèse. L'effet d'une température régulière modulée par les précipitations et le biotope, ne peut pas être démontrée dans une expérimentation conduite à 18 °C au laboratoire. Cette expérimentation a cependant montré que l'activité spermatogénétique observée se manifeste, à n'importe quel moment, par la variation du nombre

total de cellules entrant en différenciation et non par un ralentissement ou un arrêt total de la différenciation.

Chez *Rana esculenta* et *Rana lessonae*, les durées de la méiose et de la phase S ne varient pas quelles que soient les périodes de l'année et les températures externe. Néanmoins, le démarrage de la spermatogenèse est plus rapide chez *Rana esculenta* (reproduction en avril) que chez *Rana lessonae* (la reproduction peut être observée en mai). La spermatogenèse démarrant plus rapidement chez *Rana esculenta* pourrait être l'une des causes du léger décalage de la période de reproduction observée entre les deux espèces. Par ailleurs, la méiose ne se déroule pas de la même manière chez des populations pures de *Rana esculenta* et des populations où cette espèce cohabite avec *Rana lessonae* (DUBOIS, 1977, 1978). En effet, *Rana lessonae* hiberne exclusivement sur terre alors que *Rana esculenta* reste dans l'eau (TUNNER et HEPPICH, 1989). En juillet, période de post-reproduction, l'expérimentation menée à 30 °C a permis de retrouver le léger décalage de la durée de la spermatogenèse existant entre les deux espèces du complexe.

*Rana esculenta* et *Rana lessonae* n'ont donc pas des vitesses spermatogénétiques identiques, la spermiogenèse étant bloquée en juillet, seule l'utilisation d'une température élevée obtenue artificiellement (30 °C) permet de démasquer des différences physiologiques existant entre les deux membres du complexe. Il existe vraisemblablement des différences génétiques au niveau de la cinétique spermatogénétique et de sa régulation chez *Rana esculenta* et *Rana lessonae*. Cependant, ces différences concernant l'élaboration des gamètes ne gênent en rien l'hybridation. Il est en effet connu que des individus appartenant à l'espèce *R. lessonae* peuvent se croiser avec des *R. esculenta* (DUBOIS, 1977, 1978).

Bien qu'une température élevée possède un effet accélérateur sur la spermatogenèse, la capacité de différenciation des gamètes paraît sensible à la période de l'expérimentation. On peut ainsi expliquer les différences trouvées chez toutes les espèces étudiées, quel que soit leur type de cycle, lorsqu'elles sont maintenues à des températures similaires mais dont l'injection de <sup>3</sup>HThy a été effectuée à des saisons différentes.

Chez *Xenopus laevis*, la phase S se déroule avant la métamorphose, les spermatozoïdes apparaissent le mois suivant la métamorphose (KALT, 1976). Chez *Rana esculenta*, les spermatozoïdes sont formés 45 jours après la métamorphose lorsque la température atteint 15 à 20 °C, conditions optimales pour maintenir une spermatogenèse active (RASTOGI *et al.*, 1983).

Les variations quantitatives d'ADN révélées par les Amphibiens pourraient résulter des variations du volume cellulaire. Ces dernières pourraient avoir suivi une voie différente chez les Urodèles et chez les Anoures en raison de divers phénomènes d'adaptation. Cette corrélation entre phénomène d'adaptation écologique quantitative d'ADN a été admise par SZARKI (1970).

En ce qui concerne les Gymnophiones, une seule étude a été effectuée chez *Typhlonectes compressicaudus*. L'injection de <sup>3</sup>HThy a pu cependant confirmer l'existence d'une longue période de stockage des cellules germinales consécutivement à une spermatogenèse vraisemblablement rapide.

En conclusion, la méthode histoautoradiographique permet l'analyse fine de la cinétique spermatogénétique. Elle permet de détecter les différences souvent sensibles qui existent entre des espèces très proches. Cette méthode permet également de préciser l'influence des facteurs externes. La spermato-

genèse des Amphibiens relève d'une physiologie complexe dans laquelle sont impliqués des facteurs génétiques et environnementaux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARBAULT M. et TREFAUT-RODRIGUES M., 1978. — Observations sur la reproduction et la dynamique des populations de quelques Anoures tropicaux. 16 *Ptychadena mac-carthyensis* et *Ptychadena oxyrhynchus*. *La terre et la vie*, 32 (3) : 441-452.
- BENNETT H. D., 1977. — The time and duration of meiosis. *Phil. Trans. R. soc. London*, 277 : 201-205.
- BERGER L., 1964. — Is *Rana esculenta lessonae camerona* a distinct species ? *Acta Zool.*, 22 : 45-61.
- BERGER L., 1976. — Hybrids of B 2 generations of Europaea water frogs (*Rana esculenta* complex). *Acta Zool.*, 33 : 201-214.
- BHATTA G. K., 1986. — Some aspects of reproduction in the Apodan Amphibian *Ichthyophis*. *PhD*, Un. Karnatak, India, 219 p.
- BILLARD R., 1968. — Influence de la température sur la durée et l'efficacité de la spermatogénèse du guppy *Poecilia reticulata*. *C. r. Acad. Sci., Paris*, 266 : 2 287-2 290.
- CALLAN H. G. et TAYLOR J. H., 1968. — A radioautographic study of the time course of male meiosis in the newt *Triturus vulgaris*. *J. cell Sci.*, 3 : 615-626.
- CEI G. H., 1949. — El ciclo sexual y el predominio de la spermatogenesis orual continua en batracios chaquenos. *Acta Zool. Littoana* : 527-544.
- 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.
- DUBOIS A., 1977. — Les problèmes de l'espèce chez les Amphibiens Anoures. *Mém. Soc. Zool. Fr.*, 39 (2) : 173-284.
- DUBOIS A., 1978. — Les principaux stades de développement significatifs en écologie et en génétique des populations des Amphibiens Anoures. *La terre et la vie*, 32 (3) : 453-459.
- DUELLMAN W. E., TRUEB L., 1986. — *Biology of Amphibians*. Mc Graw-Hill Ed., 670 p.
- EGAMI N. et HYODO-TAGUCHI Y., 1967. — An autoradiographic examination of rate of spermatogenesis at different temperatures in the fish *Oryzias latipes*. *Exp. cell Res.*, 47 : 665-667.
- EXBRAYAT J.-M., 1986. — Le testicule de *Typhlonectes compressicaudus* : structure, ultra-structure, croissance et cycle de reproduction. *Mém. Soc. Zool. Fr.*, 43 : 121-132.
- EXBRAYAT J.-M., 1988. — Variations pondérales des organes de réserve (corps adipeux et foie) chez *Typhlonectes compressicaudus*, Amphibien Apode vivipare, au cours des alternances saisonnières et des cycles de reproduction. *Ann. Sci. nat., Zool.*, 13<sup>e</sup> sér., 9 : 45-53.
- EXBRAYAT J.-M., 1992. — Appareils génitaux et reproduction chez les Amphibiens Gymnophiones. *Bull. Soc. zool. Fr.*, 117 (3) : 291-296.
- EXBRAYAT J.-M., 1993. — Quelques aspects de la biologie de la reproduction chez *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron, 1841), Amphibien Gymnophione. *Cah. Univ. cathol. Lyon*, 263 pp.
- EXBRAYAT J.-M. et FLATIN J., 1985. — Les cycles sexuels chez les Amphibiens Apodes. Influence des variations saisonnières. *Bull. Soc. zool. Fr.*, 110 (3) : 301-305.
- GABE M., 1968. — *Techniques histologiques*, Masson Ed., 113 p.
- GALGANO M., 1934. — L'influenza della temperatura sulla spermatogenesi della *Rana esculenta*. *Mon. zool. ital.*, 46 : 273-275.
- GAVAUD J., 1975. — Etude expérimentale du rôle des facteurs externes sur la spermatogénèse et l'activité endocrine du testicule de *Nectophrynoides occidentalis*. *Publ. Lab. Zool. E.N.S.*, 6 : 1-99.
- GUEYDAN-BACONNIER M., 1980. — Le cycle sexuel chez les mâles et chez les femelles de *Phrynobatrachus calcaratus* (Peters, 1863), Batracien Anoure tropical. *Thèse Doct. Spéc., Univ. Paris VI*, 150 pp.
- GUEYDAN-BACONNIER M., NEYRAND DE LEFFEMBERG F., PUJOL P., DELSOL M. et FLATIN J., 1984. — Etude comparative du dynamisme de la spermatogénèse chez trois batraciens tropicaux par histoautoradiographie. *Ann. Sci. nat., Zool.*, 13<sup>e</sup> sér., 6 : 191-196.
- GUYETANT R., 1986. — Les Amphibiens de France. *Rev. Fr. aquariol.*, 13<sup>e</sup> année. 1-2 : 61 p.
- KALT M. R., 1973. — Ultrastructural observations of the germ line of *Xenopus laevis*. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 138 : 41.

- KALT M.R., 1976. — Morphology and kinetics of spermatogenesis in *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.* 195 : 393-408.
- KEHL R., 1944. — Etude de quelques problèmes d'endocrinologie génétique chez un batracien nord-africain (*Discoglossa*) et certains reptiles sud-algériens. Unité des processus hormonaux dans le domaine sexuel chez les Vertébrés. *Rev. Can. Biol.*, 3 : 163 p.
- LICHT P., 1963. — The relation between preferent body temperatures and testicular heat sensitivity in lizards. *Copeia*, 1963 : 428-436.
- LICHT P. and BASU S.L., 1967. — Influence of temperature on lizard testes. *Nature*, 213 : 672-674.
- LOFTS B., 1964. — Seasonal changes in the functional activity of the interstitial and spermatogenic tissues of the green frog *Rana esculenta*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 4 : 550-562.
- LOFTS B., 1974. — Reproduction in Physiology of the Amphibia II. Lofts Ed. : 107-218.
- MONESI V., 1962. — Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *J. Cell Biol.*, 14 : 1-18.
- MORGAN G.T., 1979. — The time course of male meiosis in the red-backed salamander *Plethodon cinereus*. *J. Cell Sci.*, 38 : 345-356.
- NEYRAND DE LEFFEMBERG F., 1988. — Etude comparative de la vitesse de la spermatogenèse de *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 EXBRAYAT J.-M., 1987. — Quelques aspects de la cinétique de la spermatogenèse dans le complexe *Rana esculenta* 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.
- NOBLE G.K., 1931. — *The biology of the Amphibia*. Dover publ., Inc., 577 p.
- ORTAVANT R., 1956. — Autoradiographie des cellules germinales du testicule de bélier. Durée des phénomènes de la spermatogenèse. *Acta anat. microsc., Morph. exp.*, 45 : 1-10.
- PUJOL P., 1985. — Quelques aspects de la reproduction du crapaud *Bufo regularis* Reuss, 1834. *Dipl. E.P.H.E.*, 88 p. texte, Pl. et Tabl.
- RASTOGI R.K., 1976. — Seasonal cycle in anuran testis : the endocrine and environmental controls. *Boll. Zool.*, 43 : 151-172.
- RASTOGI R.K., IELA L., DEL RIO G., DI MEGLIO M., RUSSO A. et CHIEFFI G., 1978. — Environmental influence on testicular activity in the green frog *Rana esculenta*. *J. exp. zool.*, 20 (1) : 49-53.
- SARASIN R. and SARASIN P., 1887-1890. — Zur Entwicklungsgeschichte und Anatomie der ceylonesischen Blindwühle *Ichthyophis glutinosus* L. in : *Ergebnisse naturwissenschaftlicher Forschungen aus Ceylon*. C.W. Kreidel's Verlag, Wiesbaden., 2 : 153-253.
- SESHACHAR B.R., 1936. — The spermatogenesis of *Ichthyophis glutinosus* (Linn.) I. The spermatogonia and their divisions. *Z. Zellforsch. Mikr. Anat.*, 24 : 662-706.
- SZARKI H., 1970. — Changes in the amount of DNA in cell nuclei during vertebrate evolution. *Nature*, 226 : 651-652.
- TUNNER H.G. and HEPPICH S., 1989. — The hybridogenetic *Rana esculenta* of the Neusiedlersee region (Central Europe). Aspects of life history and distribution of clones. *First World Congress of Herp.*, Canterbury, art. S 20.
- WAKE M.H., 1968. — Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. Part II. The kidneys and urogenital ducts. *Acta Anat.*, 75 : 321-358.
- WAKE M.H., 1980. — Reproduction, growth and population structure of the central american Caecilian *Dermophis mexicanus*. *Herpetologia*, 36 (3) : 244-256.
- WAKE M.H., 1995. — The spermatogenic cycle of *Dermophis mexicanus* (Amphibia : Gymnophiona). *J. Herp.*, 29 (1) : 119-122.
- WINBER D.E. and PRENSKY W., 1963. — Autoradiography with meiotic chromosomes of the male newt *Triturus viridescens* using <sup>3</sup>H thymidin. *Genetics*, 48 : 1731-1738.