

BULLETIN MENSUEL
DE LA
SOCIÉTÉ LINNÉENNE
DE LYON

SOCIÉTÉ DE SCIENCES NATURELLES, RECONNUE D'UTILITÉ PUBLIQUE



33 rue Bossuet, F 69006 LYON

SOMMAIRE

- MACQUERON G. ET J.-L. — Compte rendu du voyage de la section Botanique en Toscane du 8 au 15 avril 2001 4
- PUJOL P. ET EXBRAYAT J.-M. — Quelques aspects de la biologie de la reproduction et des cycles sexuels chez *Bufo regularis* Reuss (1934), amphibien anoure 12

CONTENTS

- PUJOL P. & EXBRAYAT J.-M. — Some aspects of reproductive biology and sexual cycles in *Bufo regularis* Reuss (1934), amphibian, anura 12

Quelques aspects de la biologie de la reproduction et des cycles sexuels chez *Bufo regularis* Reuss (1834), amphibien anoure

Paulette Pujol et Jean-Marie Exbrayat

Laboratoire de Biologie générale, Université catholique de Lyon et Laboratoire de Reproduction et Développement des Vertébrés, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 25 rue du Plat, 69288 Lyon Cedex 02.

Résumé : Le travail porte sur l'étude d'une population de *Bufo regularis*, amphibien anoure africain ubiquiste. Les animaux étudiés proviennent de Lomé (Togo) où ils sont soumis à des variations saisonnières marquées. Les cycles des organes génitaux mâles et femelles sont de type continu. La reproduction est déclenchée lorsque la pluviométrie augmente. Un mode de régulation endocrine chez les mâles et les femelles est proposé.

Some aspects of reproductive biology and sexual cycles in *Bufo regularis* Reuss (1834), amphibia, anura

Summary : This work concerns the study of a *Bufo regularis* population. *Bufo regularis* is an anuran amphibian living in Africa. Animals are coming from Lome (Togo). They are submitted to strong seasonal variations. Males and females have continuous sexual cycles. Breeding starts when rain is increasing. An endocrine regulation mode is proposed in males and in females.

I - INTRODUCTION

Les cycles de reproduction des amphibiens ont été étudiés chez de nombreuses espèces appartenant aux trois ordres (voir bibliographie in NEYRAND DE LEFFEMBERG et EXBRAYAT, 1995 ; EXBRAYAT *et al*, 1997, 1998). Les cycles des mâles ont été en général plus étudiés que ceux des femelles. Chez les anoures trois types de cycles ont été mis en évidence (GALGANO, 1952, DELSOL *et al*, 1981, 1995). Dans les cycles à spermatogenèse discontinue et à spermatogenèse potentiellement continue, que l'on trouve chez les espèces des pays tempérés, la spermatogenèse est soumise aux variations de température, de pluviométrie ou d'abondance de nourriture. Dans les cycles à spermatogenèse continue, décrits chez des espèces tropicales, toutes les étapes de la spermatogenèse sont présentes en même temps et pendant toute l'année dans les tubes séminifères. Chez les femelles des espèces dont le mâle possède un cycle discontinu, le cycle ovogénétique est synchrone à celui du mâle. L'ovogenèse des espèces chez lesquelles le mâle à une 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 même permanentes.

Si les cycles sexuels discontinus et leur régulation endocrine ont été particulièrement bien étudiés, tant chez les mâles que chez les femelles, l'étude détaillée des gonades et des organes endocrines de régulation des espèces à cycle continu n'ont pas fait l'objet d'études approfondies, notamment chez les femelles. Nous avons entrepris, voici plusieurs années, l'étude exhaustive des cycles sexuels chez l'espèce africaine *Bufo regularis* Reuss, 1834, en envisageant successivement l'étude des organes urogénitaux mâles et femelles et les variations pouvant exister au niveau des organes endocrines de régulation : hypophyse, cellules de Leydig chez les mâles, follicules ovariens chez les femelles. Nous présentons ici une synthèse détaillée de ces travaux qui ont fait partiellement l'objet de plusieurs publications (PUJOL, 1985, 1987 ; PUJOL et EXBRAYAT, 1987, 1996 ; NEYRAND DE LEFFEMBERG et PUJOL, 1984 ; DELSOL *et al.*, 1980, 1981). Peu de travaux portent, en effet sur la reproduction de cette espèce, pourtant fréquente sur le continent africain. Notons cependant les travaux d'ABDELMAGUID et SABRY (1987) portant sur la spermatogenèse d'une population provenant d'Alexandrie (Egypte).

Bufo regularis Reuss, 1834 (figure 1) est un amphibien anoure largement réparti en Afrique, en particulier en Afrique de l'Ouest, du Centre et du Nord-Est (HULSELMANS 1970, SALAMI-CADOUX 1979). Il s'agit d'une espèce monotypique dont les analyses biologiques ont fait apparaître un polymorphisme extrême (GUTMAN, 1967, 1972). Une grande tolérance écologique et un caractère anthropophile lui confèrent des comportements reproducteurs adaptés aux différentes stations et à leur particularités climatiques. Le travail porte sur les cycles sexuels mâle et femelle d'une population originaire de Lomé (Togo). Les cycles de reproduction, sont comme chez tous les vertébrés, soumis au contrôle de l'hypophyse.

II - DONNÉES GÉNÉRALES

1 - L'espèce *Bufo regularis*

Signalée une première fois en Egypte par GEOFFROY SAINT HILAIRE (1809), *Bufo regularis* est récolté dans ce même pays et décrit par Reuss en 1834. Ce dernier le définit ainsi : « *Bufo corpore globuloso, verrucoso, supra cineris maculis bruneis varia forma sed symmetricis brachiis et cruribus vittalis ; palmis fissis, plantis palmatis* ». Dans le genre *Bufo*, l'espèce *regularis* est la plus commune en Afrique occidentale. D'après LOVERIDGE (1957), l'espèce serait présente sur l'ensemble du continent africain, sauf au Maroc et en Tunisie.

Plus récemment, l'unité de l'espèce a été remise en question. De nombreuses sous-espèces ont été décrites, sur la base de disparités morphologiques liées essentiellement à une grande dispersion géographique de l'espèce. POYNTON (1964), à la suite d'une étude du genre *Bufo* en Afrique du Sud, suggère la création d'un groupe *regularis*. De nombreux auteurs étudient les relations taxinomiques du groupe avec l'espèce *maculatus*, de plus petite taille et coexistant dans la plupart des collections de l'Ouest africain. Une solution est apportée par HULSELMANS (1970). Les résultats basés sur une étude morphologique systématique des données biométriques très nombreuses portant sur un matériel africain considérable en provenance de 15 musées ont permis une distinction nette entre *Bufo regularis* et *Bufo maculatus*.

En Afrique de l'Ouest, du Centre au Nord-Est, l'espèce *regularis* présente, d'après HULSELMANS (1970), les caractères suivants : une forte taille, une tête large au museau très obtus, des glandes parotides bien développées, lisses mais poreuses, un tympan relativement grand, des verrues grosses et rondes sur tout le dos, cinq paires de taches sombres dorsales et bien délimitées, des glandes rictales fusionnées et fortement développées, des verrues basses et fusionnées sur la face inférieure des avant-bras, des bandes sombres transversales sur les membres postérieurs. Les mâles ont des callosités nuptiales bien développées sur les trois premiers doigts, une peau sombre sous le menton, des verrues très épineuses et un sac vocal à deux ouvertures. HULSELMANS (1970) confirme également le niveau spécifique des caractères tympaniques de la clé de PARKER (1936).

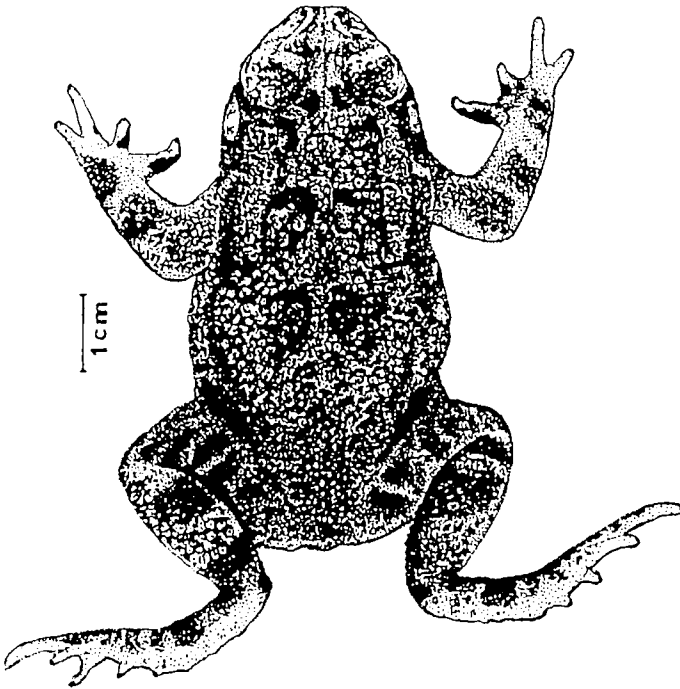


Fig. 1 : *Bufo regularis* mâle (vue dorsale)

Depuis une trentaine d'années, les herpétologistes ont affirmé la réalité d'un groupe *regularis*, tout en apportant des données plus précises sur ce que l'on appelle aujourd'hui l'espèce *regularis*. BOGART (1968, 1972) analyse les caryotypes de dix espèces africaines appartenant au genre *Bufo* et rassemble sept d'entre elles dans un groupe *regularis* assez semblable à celui de POYNTON (1964). A la suite de tests d'hybridation, BLAIR (1972) exclut *Bufo maculatus* et *Bufo peretti* du groupe *regularis*, leur isolement génétique étant complet. GUTTMANN (1967, 1972) analyse par électrophorèse les hémoglobines et les transferrines du sang de *Bufo regularis* et observe un extrême polymorphisme de ces deux molécules. Low (1968, 1972) retrouve, au niveau de l'étude chromatographique du venin, le grand polymorphisme biochi-

mique de l'espèce *regularis*. L'étude des caractères ostéologiques (MARTIN, 1972) et l'étude des amines et des polypeptides de la peau (CEI *et al.* 1972) conduisent, au contraire, à une grande uniformité de l'espèce. TANDY et KEITH (1972) traitent statistiquement l'ensemble des travaux cités ci-dessus en leur adjoignant une étude des chants nuptiaux : pour eux, huit espèces constituent le groupe *regularis*. Des tests de précipitations sérologiques réalisée par CEI (1973) sur des crapauds de l'espèce *regularis* provenant d'Algérie, d'Angola et d'Afrique du Sud suggèrent l'existence d'un processus de spéciation très récent ou même actuel.

Il apparaît donc que parmi les populations de *Bufo regularis*, la fréquence des caractères, donc des gènes, varie géographiquement de manière non corrélée. Dans une optique d'isolement génétique et de processus de spéciation, quel est le rôle tenu par chacun d'entre eux ? La différenciation des espèces suivra-t-elle, par exemple, la différenciation du chant nuptial considéré comme un mécanisme d'isolement pré-reproducteur par certains auteurs (TANDY et KEITH, 1972) ?

Dans l'état actuel des connaissances et malgré de fortes et multiples disparités, ces populations de crapaud *Bufo regularis* dispersées du Sénégal à l'Egypte et de l'Algérie à l'Ouganda ne peuvent être distinguées. Cette large distribution géographique (LAMOTTE, 1966, SCHIOTZ, 1969, HULSELMANS, 1970) met en évidence sa grande tolérance écologique.

2 - Le biotope

LAMOTTE (1966) a observé cette espèce en zone soudano-guinéenne, en forêt humide et en savane relativement sèche, à condition que celles-ci soient défrichées ou cultivées. Ces biotopes humides facilitent ainsi le déplacement des crapauds. Dans une étude des peuplements d'amphibiens de la savane de Lamto (Côte d'Ivoire), BARBAULT (1976) observe que *Bufo regularis* représente un peu plus de 30% du peuplement annuel de la savane brûlée et moins de 4 % des effectifs en savane non brûlée où la densité du tapis végétal entrave ses mouvements. Cette espèce est une forme colonisatrice qui envahit chaque année, dès les premières pluies d'orage de février-mars, le plateau de la savane qui a brûlé en janvier et qui est encore inhospitalier aux autres espèces d'amphibiens. TANDY et KEITH (1972) confirment le caractère savanicole et anthropophile de l'espèce, ainsi que son adaptation à des pluviométries annuelles variant de 2601 mm à 70 mm, c'est-à-dire jusqu'au désert. Si, en Afrique de l'Ouest, *Bufo regularis* cohabite avec un petit nombre d'espèces du genre *Bufo* qui ont une écologie plus stricte, xérophile ou forestière, il est, par contre, en forte situation de sympatrie avec l'espèce *Bufo maculosus*, aux préférences hydriques toutefois plus marquées (PERRET, 1966, TANDY et KEITH, 1972, LAURENT, 1972, BARBAULT, 1976).

Des observations de *Bufo regularis* ont été réalisées au Togo par SALAMI-CADOUX (1979) dans les forêts défrichées, aux abords des routes et des chemins, dans des zones cultivées, dans le voisinage des maisons et même dans les agglomérations où les animaux s'aventuraient fréquemment. Des captures ont été effectuées de façon continue à Lomé et dans la région de Kpalimé : ces deux stations distantes d'une centaine de kilomètres ont été choisies pour leur contraste climatique. Lomé, situé en zone côtière avec une pluviométrie annuelle moyenne de 952 mm appartient à la zone la plus sèche du pays. Kpalimé, situé sur les premiers contreforts du Mont Togo, avec une pluviométrie annuelle moyenne de 1569 mm, appartient à la zone la plus humide du pays. Dans l'une comme dans l'autre région, *Bufo regularis* partage son

biotope avec *Bufo maculatus* à l'exclusion de tout autre *Bufo*. *Bufo maculatus* décrit par HULSELMANS (1970) demeure toutefois un crapaud rare dans la région sèche de Lomé ; il est, par contre, d'une relative abondance dans la région de Kpalimé où la pluviométrie s'intensifie.

3 – Les facteurs climatiques

L'influence des facteurs externes étant déterminante sur le cycle de reproduction des amphibiens (DELSOL *et al*, 1981, EXBRAYAT *et al*, 1997, 1998), il est nécessaire de connaître le cadre de vie des animaux objets de nos travaux, c'est-à-dire Lomé au Togo.

Le Togo se situe en Afrique occidentale équatoriale, immédiatement à l'est du méridien de Greenwich, entre le sixième et le onzième parallèle de l'hémisphère nord. Il s'ouvre sur le Golfe de Guinée et est encadré au nord par le Burkina Faso, à l'ouest par le Ghana et à l'est par le Bénin. Il constitue une bande parallèle au littoral dont la largeur varie entre 80 et 120 km et qui s'étend du nord au sud sur 600 km. Dans l'ensemble, le Togo est constitué de plaines et de plateaux : une plaine côtière au sud et une plaine au nord, séparées par une région de plateaux variant de 150 à 500 m d'altitude. Ces plateaux sont eux-mêmes limités à l'ouest et au nord par une petite chaîne montagneuse qui culmine en sa partie méridionale aux Monts du Togo.

Situé entre deux blocs forestiers, ce pays présente, sur le plan climatique, une originalité remarquable en Afrique de l'Ouest, à savoir la juxtaposition de deux types de climats. Au Togo du centre et du nord règne un climat tropical comportant une seule saison des pluies, au Togo du sud, on rencontre un climat subéquatorial avec deux saisons des pluies. Ces deux types de climats sont dus à l'intersection de différents facteurs que connaît d'ailleurs toute l'Afrique de l'Ouest. Les vents alizés (nord-est) voient leurs zones d'influence modifiées par les déplacements nord-sud et vice-versa du Front Inter-Tropical (F.I.T.) qui se développe entre la masse d'air humide due aux basses pressions équatoriales, et les masses d'air sec, dues aux hautes pressions tropicales. En hiver, le F.I.T. est refoulé vers le sud. Souffle alors l'Harmattan, nom local de l'alizé, un vent sec du nord-est, le « vent de la désolation » (LAMOUROUX, 1969). Quand le F.I.T. est refoulé vers le nord, la mousson se superpose à des phénomènes zonaux qui agissent sur des régions disposées en anneaux autour de la Terre et parallèles à l'équateur. Le vent de mousson, alizé dévié du sud-ouest, est un rouleau d'air chaud et humide, toujours en-deçà du F.I.T. La disposition des côtes en Afrique de l'Ouest modifie l'action de la mousson qui devient alors un phénomène zonal et qui s'accompagne de précipitations dont le maximum coïncide avec le passage du soleil au zénith, soit vers le 21 mars et le 21 septembre pour les zones équatoriales qui comportent ainsi deux saisons des pluies, soit vers le 21 juin pour les zones tropicales qui ont ainsi une seule saison des pluies.

Lomé est situé sur le littoral au climat équatorial ou subéquatorial. Toutefois, l'orientation des côtes modère la mousson qui y défile parallèlement sans déverser son humidité. Par un effet de microrugosité, les alluvions de la Volta qui coule au sud-ouest protègent également la région de cette mousson océanique. A ceci s'ajoute, le long du littoral, un refroidissement des masses océaniques, dû à une remontée des eaux froides (upwellings) en été, c'est-à-dire pendant la saison des pluies ; l'évaporation s'en trouve ralentie et les précipitations zénithales sont diminuées.

Ainsi ces fluctuations locales dues à l'orientation du littoral et au refroidissement des masses océaniques font de la côte togolaise la région la plus sèche du pays ; elle reçoit, en effet, moins de 1000 mm de pluie par an, bien que son rythme pluviométrique comporte deux saisons des pluies.

A ces importantes variations pluviométriques, correspondent curieusement de faibles variations thermiques. On observe une remarquable constance des températures. Pour la période 1941-1956, par exemple, on note de très faibles écarts des moyennes mensuelles par rapport à la moyenne annuelle (26,5 °C) ; le mois d'août est le plus froid avec 24,5 °C et le mois de mars le plus chaud avec 28,1 °C. A l'intérieur même des relevés mensuels, on retrouve également une faible variation des écarts entre les températures maximales et minimales (4,7 °C en juillet et 8,2 °C en décembre). Ainsi, aux mois les moins chauds, correspondent les plus faibles variations entre les températures maximales et les températures minimales ; vice-versa, aux mois les plus chauds correspondent les plus grands écarts de températures, mais tout ceci étant dans des limites très étroites, compte tenu de la régularité de toutes les valeurs.

Cette constance de la température autorise, en première approximation, à considérer comme « écologiquement sec » les mois où la pluviométrie est inférieure ou égale à 55 mm. Les moyennes annuelles pluviométriques (1941-1956) pour Lomé révèlent en général sept mois écologiquement secs : novembre à février et juillet à septembre. Ces deux blocs correspondent respectivement à la grande saison sèche et à la petite saison sèche, elles-mêmes séparées par la petite et la grande saison des pluies.

4 - La reproduction

. Comportement reproducteur

De nombreux auteurs ont observé sur le terrain ou, parfois, au laboratoire, le comportement reproducteur et le développement de *Bufo regularis*. Parallèlement aux captures de 1976-1977, des observations faites sur le terrain à Lomé et dans la région de Kpalimé ont permis d'étudier les modalités du comportement reproducteur et l'enregistrement sonore des chants nuptiaux. Ce dernier critère ne présentant aucune disparité significative entre les animaux de Lomé et ceux de Kpalimé ne laisse donc supposer aucune disparité d'espèce entre ces deux populations (SALAMI-CADOUX, 1979). Les observations effectuées par SALAMI-CADOUX, soit sur le terrain, en relevant la présence éventuelles des têtards, soit à la suite de dissections de l'appareil génital femelle ont donné plusieurs renseignements.

En zone sèche à Lomé, à la fin de l'année 1976, les crapauds ont été rares, une sécheresse frappant cette région à cette époque ; cette situation s'est prolongée jusqu'en octobre 1977, date à laquelle l'arrivée de la petite saison des pluies a permis les grands rassemblements des crapauds chantants (figure 2). Ces rassemblements ont été suivis de pontes massives, se métamorphosant en une importante collection de jeunes individus qui se disperseront. Toutefois, une faible partie de la population a pu se reproduire à différents moments tout au long de l'année, rencontrant localement des points d'eau occasionnels : égouts de drainage d'un lotissement bien arrosé, mare temporaire alimentée par une rupture de canalisation d'eau souterraine ou bacs remplis en permanence d'eau et placés à dessein dans le jardin botanique de l'université. De juin 1976 à juin 1977, 96,7 % des femelles matures (155 sujets mesurant plus de 9 cm de longueur) étaient en cours ou en fin d'ovogenèse, ce qui suggère

re une activité ovarienne continue. Le taux de femelles en fin d'ovogenèse est maximal en mars 1977, au terme d'une période de 9 mois de déficit hydrique important.

Dans la région de Kpalimé, dans la zone la plus humide du Togo, les captures de crapauds furent faciles et nombreuses de septembre 1975 à mars 1976 et, parallèlement, la présence de têtards fut quasi permanente durant cette période qui correspond à la saison sèche. Puis le retour de la saison des pluies raréfia les crapauds de septembre 1976 à juillet 1977, les biotopes s'étant asséchés pour la première fois. Les dissections de la population femelle de cette période (127 sujets) avec un taux de 98,4 % d'individus en cours ou en fin d'ovogenèse montrèrent qu'il n'y avait pas de phase de repos génital, ce qui suggère un processus continu. Le pourcentage de femelles en fin d'ovogenèse est maximal en février et mars, une grande partie de la population n'ayant pu se reproduire par manque d'eau.

Les observations faites parallèlement à Lomé et dans la région de Kpalimé traduisent deux situations. En zone humide, les retours à l'eau sont fréquents, les rassemblements de crapauds peu importants ; la période de reproduction est très longue et n'est interrompue que par les fortes pluies alors que, dans la zone sèche, elle est au contraire très brève et massive dès le retour des pluies. L'importance numérique des rassemblements reproducteurs est directement liée au nombre de mois écologiquement secs. Une augmentation du nombre de mois très pluvieux arrête également la reproduction de ces crapauds.

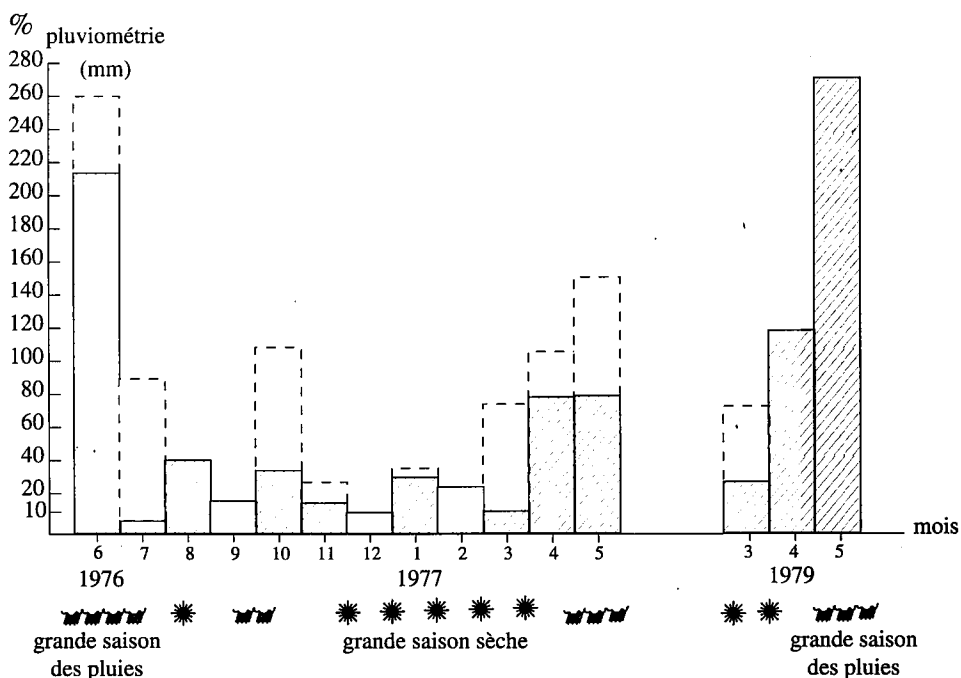


Fig. 2 : variations pluviométriques annuelles à Lomé (Togo)

Dans d'autres pays africains, de nombreux auteurs ont signalé, sous des formes apparemment contradictoires, le caractère saisonnier du comportement reproducteur de *Bufo regularis* observé au Togo. Des exemples de reproduction brève ont été observés en Egypte le long du Nil par SEETZEN (1855), dans les Monts Nimba par GUIBÉ et LAMOTTE (1958), au Soudan par CLOUDSEY-THOMSON (1967), en Côte d'Ivoire par BARBAULT (1976). Une reproduction continue est suggérée par les observations de FLOWER (1933) en Egypte, d'INGER' (1968) dans le Parc National de la Garamba, au nord du Zaïre. Une reproduction étalée avec pics généralement situés en début ou en fin de saison des pluies est retenue par plusieurs auteurs, en particulier par SANDERSON (1936) au Cameroun, par WINSTON (1955) et par TANDY et KEITH (1972) au Nigeria. Ces auteurs signalent des chants nuptiaux pendant pratiquement toute l'année. Une reproduction longue liée à la saison sèche est décrite en Sierra Leone par MENZIÈS (1963). Ainsi, la littérature apporte de nombreux modes de reproduction pour *Bufo regularis*, de même que ses diverses populations africaines offrent de multiples disparités. Ces variations sont dues à des réactions d'adaptation aux différents biotopes rencontrés qui font de *Bufo regularis* Reuss l'espèce de *Bufo* la plus répandue dans tout le continent africain, sa tolérance écologique étant très grande.

. Développement

La ponte de *Bufo regularis* est déclenchée par le contact des animaux avec le milieu aquatique qui est généralement stagnant et herbeux. La fécondation est externe. Chaque couple de crapauds fournit plusieurs milliers d'œufs. Ceux-ci flottent, immobilisés par l'environnement. Ils éclosent en moins d'une semaine, en donnant de très abondants têtards grégaires, regroupés aux endroits où la profondeur de l'eau est très faible et n'excède guère leur propre épaisseur ; ils seront donc une proie facile pour les prédateurs.

WINSTON (1955) a déclenché expérimentalement au Niger des amplexus de *Bufo regularis* identifiés selon la clé de BOULENGER (1980). Dans une eau à 30°C, il obtient des têtards en 24 heures et des métamorphoses au bout de 122 ou de 143 jours suivant la nourriture : colonies de *Bulimus* ou petits crustacés additionnés de muscle cardiaque. Des têtards de *Bufo regularis* Reuss, capturés en Guinée, près du Mont Nimba, et en Côte d'Ivoire, sont décrits à différents stades (LAMOTTE et ZUBER-VOGELI, 1954) et comparés à ceux récoltés par STORTECCI (1936) en Tripolitaine. Malgré l'éloignement de ces stations et les différences de leurs biotopes, leurs échantillonnages de têtards sont comparables, exception faite pour quelques individus dont la série interne des dents de la lèvre inférieure est divisée en deux. Les crapauds venant de se métamorphoser ont un corps mesurant entre 9 et 11 mm. WEBB (1958) observe au Niger chez *Bufo regularis* un développement d'œufs fertilisés semblable à celui de *Rana temporaria* en Europe, excepté la rapidité avec laquelle ce développement s'effectue, ceci étant lié au climat plus chaud. Les œufs mesurent 1,5 à 2 mm de diamètre ; au bout de 24 h, ils sont au stade neurula âgée et les têtards éclosent à la neuvième semaine, la métamorphose étant terminée au cours de la dixième semaine. En Egypte, SEADRA et MICHAEL (1961) décrivent les différents stades (66) de développement larvaire de *Bufo regularis* en laboratoire à 25°C. Le têtard commence à nager au bout de 2 jours ; les membres antérieurs font irruption au bout de 38 jours et la queue a complètement disparu au bout de 46 jours.

Poursuivant une étude de la peau et des glandes cutanées de *Bufo regularis*, LE QUANG TRONG (1973) observe une métamorphose au bout de 71 jours en laboratoire

à 20-23° C. Cet auteur définit également cinq stades de développement larvaire par analogie aux stades définis par TAYLOR et KOLLOSS (1946) chez *Rana pipiens*. Cette classification est reprise par SALAMI-CADOUX (1979) dans son élevage de têtards de *Bufo regularis*. Au sein d'un même lot ou fratrie, elle observe *in vitro* de très grandes variations dans les vitesses de croissance et de développement des divers individus et également dans leurs mesures biométriques. Elle en conclut que l'âge physiologique d'un têtard n'est pas strictement lié à l'âge chronologique, anomalie probablement induite par les conditions mêmes de la captivité. La métamorphose la plus rapide obtenue en élevage à la température du laboratoire (24 à 32° C) est observée en 29 jours. Certains individus, par contre, ne terminent leur métamorphose qu'au bout de 45 jours, voire au-delà, jusqu'à 200 jours. Il est peu vraisemblable qu'une telle longévité soit possible pour des têtards dans la nature, vu leur fragilité face aux prédateurs et aux germes pathogènes ; toutefois, nous ignorons la durée maximale de leur développement en milieu naturel.

. Maturité sexuelle

Pendant la période de sortie des pattes et de la régression de la queue, l'animal ne se nourrit plus et vit à la frontière des milieux aquatiques et terrestres. L'anoure va alors commencer la deuxième partie de sa vie, la partie terrestre. Les *Bufo* vivront maintenant en forêt secondarisée, savane ou zone d'habitation. Afin de permettre une meilleure comparaison entre les travaux des embryologistes, des zoologistes et des écologistes, DUBOIS (1978) suggère l'emploi du terme plus général de « jeunes » regroupant les stades « imago », « juvénile » et « subadulte » utilisés par les différents auteurs. Il retient le terme d'imago pour les animaux encore grégaires qui viennent de se métamorphoser et qui n'ont encore ni sensiblement grandi ni quitté le lieu de leur métamorphose. Il oppose la nomenclature « jeunes » à celle « d'adultes », eux-mêmes divisés en « adultes reproducteurs » et « non reproducteurs », ceci pour les mâles comme pour les femelles ; nous retiendrons ces termes dans ce qui suit.

La croissance, de type continu, est marquée par un événement majeur : l'apparition de la maturité sexuelle. Pour le moment, les observations sur le terrain n'ont pas permis d'évaluer le temps nécessaire à cette acquisition, ni d'ailleurs la longévité des animaux, tributaire en outre de l'activité des prédateurs. Pour les mâles, la présence de caractères sexuels secondaires ou l'émission de chants nuptiaux permettront de les considérer comme reproducteurs et leur absence comme non reproducteurs. Pour les femelles, la dissection de l'appareil sexuel est nécessaire : les ovaires remplis d'ovocytes mûrs et les oviductes élargis désignent les femelles adultes reproductrices.

Après examen des individus de Lomé et de Kpalimé, SALAMI-CADOUX (1979) montre que, dans ces deux stations, la maturité sexuelle s'affirme à partir d'une longueur museau-orifice cloacal de 8 cm pour les mâles et 9,5 cm pour les femelles, ceci dans la mesure où les échantillonnages l'ont permis.

Bien que donnant des indications imprécises, la taille des animaux reste le critère employé si ce n'est pour estimer l'âge des individus, du moins pour constituer des lots d'animaux semblables, c'est-à-dire supposés du même âge et donc comparables en tant que reproducteurs. Pour l'évaluation de l'âge individuel, une méthode plus rigoureuse est apportée par la squelette-chronologie. Ainsi, pour *Bufo pentoni*, BARBAULT *et al* (1979) déterminent par histologie osseuse une longévité de quatre ans dans la nature et une maturité sexuelle acquise vers l'âge de deux ans.

III - LES ANIMAUX ÉTUDIÉS

Le matériel a été obtenu grâce au Professeur Lamotte, alors directeur du Laboratoire de Zoologie de l'Ecole Normale Supérieure à Paris, et grâce à Madame Salami-Cadoux qui nous ont fait bénéficier d'une collection d'animaux prélevés sur le terrain.

Les animaux sont originaires de la côte togolaise (Lomé). Les conditions climatiques sont de type sub-équatorial avec deux saisons des pluies (LAMOUROUX 1969). Les animaux ont été capturés de nuit, à la main ; ils se laissent assez facilement saisir si on s'approche d'eux avec beaucoup de lenteur. Les captures ont été réalisées soit sur le campus universitaire et ses environs, soit aux sorties nord et nord-est de la ville où existent des mares temporaires et permanentes. Des animaux adultes, mâles et femelles, ont été ramassés chaque mois, de juin 1976 à mai 1977, exception faite pour le mois d'avril où la récolte n'a pu être effectuée. Une deuxième série de ramassages a été réalisée entre mars et mai 1979. Dès leur capture, les animaux ont été fixés dans du liquide de Bouin, puis conservés dans l'alcool à 70°.

IV - CARACTERISTIQUES LIEES AU SEXE

Avant d'étudier de manière approfondie les cycles mâle et femelle, il s'est avéré indispensable de réaliser une étude biométrique portant sur les principaux caractères morphologiques et sur les organes génitaux des animaux.

1 - Données biométriques concernant les mâles

Plusieurs paramètres ont été appréciés afin de caractériser les mâles : 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 : $2 \times \text{masse du testicule gauche (g)} / \text{masse du corps (g)}$; la masse des corps adipo-lymphoïdes (g).

On constate qu'à une même longueur de corps correspondent des masses pouvant être très différentes. Par exemple, 8 animaux dont les masses varient entre 33 g et 58 g mesurent 8,5 cm de longueur. Cette variabilité individuelle et le nombre d'animaux étudiés chaque mois (4) nous ont conduits à envisager une étude des résultats en regroupant les animaux par classe. Le problème posé est le suivant : les précipitations mensuelles ont-elles une influence sur ces données biométriques ? Les classes A (saison sèche), B (saison humide) et C (saison pluvieuse) sont-elles homogènes ? La répartition des animaux mâles donne finalement 12 individus de classe A, 28 individus de classe B et 16 individus de classe C. Les différents paramètres moyens de chaque classe ont ensuite été comparés par le test de Snédécour (comparaison des variances) et par le test du χ^2 . Le test de Snédécour est accepté pour la longueur du corps, la masse du testicule gauche, le rapport gonado-somatique. Il est refusé pour la densité de l'animal et la masse des corps adipo-lymphoïdes et rejeté de fort peu pour la masse du corps. On peut remarquer que la responsabilité de rejet est due beaucoup plus aux écarts entre les valeurs de la dispersion dans les différents échantillons qu'à la dispersion des moyennes, ce qui fait que le test est, en fait, plus contraire à l'hypothèse d'une distribution gaussienne qu'à l'hypothèse d'un facteur spécifique agissant différemment dans les trois échantillons. Dans ces conditions, il paraît plus vraisemblable de supposer que les conditions pluviométriques n'ont

qu'une faible influence sur les grandeurs étudiées. Il semble y avoir cycle continu pour la longueur du corps, la masse du testicule, le rapport gonado-somatique, la masse des corps adipo-lymphoïdes. Pour la longueur du corps, le test de Snédécór est favorable à l'homogénéité des échantillons et cela est assez important puisque les animaux ont été choisis et non pris au hasard comme les autres variables. Les valeurs du χ^2 concluent à l'indépendance des variables par rapport à la saison, sauf pour le rapport gonado-somatique où l'indépendance est refusée de fort peu. Le tableau de χ^2 nous donne une indépendance de la densité par rapport à la longueur du corps et au rapport gonado-somatique. La densité est liée arithmétiquement à la longueur et la masse du corps. Lorsque l'on compare la densité de ces deux variables, on s'aperçoit que la densité est devenue indépendante de la longueur du corps, mais reste fortement liée à la masse du corps. Ceci montre que la relation de la masse du corps à la longueur du corps passe bien par l'intermédiaire de cette variable indépendante. Il semble donc que la densité ne serait pas une caractéristique générale de l'espèce mais un facteur spécifique pour chaque individu à une étape donnée.

Le rapport gonado-somatique est une remarquable constante par rapport à la longueur de l'animal, à la masse du corps, à la densité et à la masse du testicule. C'est une variable indépendante.

La masse du testicule ne dépend pas de la densité. Elle est fortement corrélée à la longueur et à la masse du corps. La liaison avec la longueur du corps était prévisible puisque le rapport gonado-somatique est une variable indépendante. Comme la masse du corps s'explique par la densité et la longueur du corps, on pourrait dire que la masse du testicule s'explique par la longueur du corps, outre le rapport gonado-somatique et la densité.

La masse du corps adipo-lymphoïde n'est liée ni à la masse du testicule, ni à la longueur du corps, ni au rapport gonado-somatique. Il semblerait varier en fonction de la densité : réduit chez les animaux à faible densité et très développé chez les animaux à forte densité.

Par rapport à la saison, le test de Snédécór et celui du χ^2 confirment une grande homogénéité des données biométriques. Face à cette variable, il est à noter toutefois une nette divergence des résultats pour la densité et une divergence plus faible pour la masse du corps.

2 - Données biométriques concernant les femelles

Plusieurs paramètres ont été appréciés afin de 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 : $2 \text{ masses de l'ovaire gauche (g)} / \text{masse du corps (g)}$; la masse des corps adipo-lymphoïdes (g).

Comme pour les mâles, on constate qu'à une même longueur de corps correspondent des masses pouvant être très différentes. Par exemple, 4 animaux dont les masses varient entre 59, 80, 83 et 92 g mesurent 9,7 cm de longueur. Cette variabilité individuelle et le nombre d'animaux étudiés chaque mois (5) nous ont conduits à envisager une étude des résultats en regroupant les animaux par classe. Le problème posé est le suivant : les précipitations mensuelles ont-elles une influence sur ces données biométriques ? Les classes A (saison sèche), B (saison humide) et C (saison pluvieuse) sont-elles homogènes ? Le test de Snédécór permet de comparer les classes A, B et C par l'intermédiaire de leurs variances. Comme pour l'étude statistique des données biométriques chez les mâles, le test du χ^2 est effectué ici pour chaque

variable par rapport à sa médiane, en fonction des classes pluviométriques, d'une part, et en fonction des différentes variables, d'autre part.

On note une grande dispersion des masses des corps adipo-lymphoïdes relativement à la moyenne, ce qui signifie que la distribution de ces masses n'est certainement pas gaussienne ; de même, le rapport gonado-somatique ne paraît pas non plus être une variable à distribution normale. Le test de Snédécour est refusé pour la longueur du corps, ce qui montre que le choix qui'a été fait des animaux n'est pas parfaitement assimilable à un tirage au sort effectué dans les mêmes conditions pour les trois échantillons. En effet, en saison humide, les lots de ramassage n'ont pas toujours permis de prélever un échantillonnage aussi rigoureux que nous l'aurions souhaité par rapport à la taille des animaux. Par contre, le test de Snédécour est accepté pour toutes les autres données biométriques par rapport à la saison. Rien ne nous incite donc ici à rejeter l'hypothèse de cycle continu pour toutes les données biométriques des *Bufo regularis* femelles. Le test du χ^2 confirme l'indépendance de toutes les variables par rapport à la saison, même pour la longueur du corps. Les résultats du χ^2 nous montrent une corrélation entre la masse du corps et la longueur. Ces résultats nous permettent également de retenir l'indépendance de la densité par rapport à la longueur du corps, de la masse des corps adipo-lymphoïdes et au rapport gonado-somatique ; par contre, la densité et la masse du corps sont fortement liées. La masse des ovaires est plus faible chez les animaux à faible densité et plus forte chez les animaux à forte densité. Mais on remarquera que la masse des ovaires croît proportionnellement plus que la masse du corps. En effet, le rapport gonado-somatique est lui-même lié à la masse du corps et augmente avec celui-ci ; il augmente également avec la longueur car il semble indépendant de la densité mais fortement corrélé à la masse des ovaires, comme il fallait s'y attendre.

Le test du χ^2 permet également de retenir l'identité des populations pour la masse du corps adipo-lymphoïde par rapport la longueur du corps, la masse du corps, la densité et la masse des ovaires. Par contre, curieusement, il semble que la masse des corps adipo-lymphoïdes varie en fonction inverse du rapport gonado-somatique : celui-ci ne serait pas une variable indépendante, alors que la masse des corps adipo-lymphoïdes peut être considérée comme telle.

Par rapport à la saison, le test de Snédécour et le test du χ^2 confirment une homogénéité. Il y a cycle continu des données biométriques tout au long de l'année pour *Bufo regularis* femelle. Chez cet animal, peuvent être retenues comme variables caractéristiques de l'individu et indépendantes de la saison la longueur du corps, la densité, la masse des corps adipo-lymphoïdes.

3 - Dimorphisme sexuel

Il est intéressant de comparer les données biométriques des mâles à celles des femelles afin de discerner si il existe un dimorphisme sexuel.

Les conclusions des études statistiques des données biométriques, tant chez les mâles que les femelles, ont montré que les conditions pluviométriques au cours de l'année de ramassage n'ont eu aucune incidence sur les différents paramètres des animaux de notre échantillonnage. La masse du corps adipo-lymphoïde paraît liée, chez les mâles, à la densité et, chez les femelles, au rapport gonado-somatique. La longueur du corps et la masse du corps sont corrélées dans les deux sexes. La masse des gonades croît en fonction de la masse du corps de l'animal chez les mâles et les femelles. Ces rapports longueur du corps - masse du corps - masse des gonades ne

sont pas sans suggérer la notion de « croissance continue » tout au long de la vie de l'animal, phénomène bien connu chez les amphibiens.

Chez la population de *Bufo regularis* étudiée et dans le cadre d'un classement des animaux en fonction des pluviométries mensuelles, le mâle et la femelle ont donc deux variables indépendantes communes, la longueur du corps et la densité ; et une variable indépendante différente pour chaque sexe, le rapport gonado-somatique chez les mâles et la masse des corps adipo-lymphoïdes chez les femelles.

L'ensemble des données biométriques collectées chez les mâles et chez les femelles a permis de déterminer un « animal-type » représentatif de chaque sexe, dont les caractéristiques sont le résultat de la moyenne de chaque valeur de l'échantillonnage. Leurs caractéristiques sont les suivantes :

Mâles : longueur : 8,5 cm ; masse du corps : 44,5 g ; densité : 72,8 ; rapport gonado-somatique : 2,7

Femelles : longueur : 9,5 cm ; masse du corps : 79,7 g ; densité : 93,3 ; rapport gonado-somatique : 180

Pour presque tous les paramètres étudiés, les données concernant le mâle-type sont inférieures à celles qui concernent la femelle-type. Comme nous l'avons vu, les animaux atteignent d'ailleurs leur maturité sexuelle à des tailles différentes : à 8 cm pour les mâles et à 9 cm pour les femelles. Le rapport gonado-somatique est supérieur chez la femelle, ceci est en relation directe avec la masse des gonades dont la moyenne générale est beaucoup plus élevée chez la femelle que chez le mâle (testicule : 59,2 mg ; ovaire : 15,2 g).

Les différences constatées dans les comparaisons des données biométriques et des animaux-types mâles et femelles nous permettent de parler de dimorphisme sexuel. Celui-ci peut être quantitativement étudié et comparé à celui d'autres espèces telles que les oiseaux, mais aussi tout particulièrement à celui d'autres amphibiens (GUEYDAN-BACONNIER, 1980). L'indice de dimorphisme lié à la masse du corps sera l'unité de travail. Il s'obtient par le calcul de la formule :

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

Pour *Bufo regularis* on observe, dans le cadre de cette étude sur une population de Lomé, le résultat suivant : 55,8 %. Cet indice est plus faible que ceux de *Phrynobatrachus calcaratus* (65,7 % ; GUEYDAN-BACONNIER, 1980), *Ptychadena maccarthyensis* (65 % ; NEYRAND DE LEFFEMBERG et PUJOL, 1984) ou *Ptychadena oxyrhynchus* (67,2 % ; NEYRAND DE LEFFEMBERG et PUJOL, 1984).

V - L'APPAREIL GENITAL MALE : STRUCTURE, CYCLE SEXUEL ET REGULATION ENDOCRINE

L'importance du lot d'animaux et la régularité des prélèvements ont permis de réaliser de nombreuses dissections dont les observations confirment et souvent complètent en l'affinant, la connaissance de cet appareil uro-génital. L'anatomie de *Bufo regularis* a fait l'objet de travaux déjà anciens (AL-HUSSAINI, 1939, AL-HUSSAINI et ROSHDY, 1959 ; WEBB, 1958 ; THIREAU et MAROLLE, 1968). Nous décrirons ici la structure de cet appareil urogénital et nous traiterons le problème de l'homogénéité des testicules.

1 - L'appareil urogénital mâle

L'appareil urogénital mâle de *Bufo regularis* est constitué, comme chez les autres anoures d'une paire de testicules prolongés par des canaux déférents qui traversent les reins puis rejoignent l'uretère primaire (canal de Wolff). Des corps adipo-lymphoïdes coiffent les testicules à leur extrémité antérieure où se situe l'organe de Bidder, structure caractéristique des Bufonidae (BHADURI, 1953).

Les reins des adultes sont constitués d'une paire de mésonéphros fonctionnels de forme allongée, légèrement convexes, parfois asymétriques par leur position et par leur taille (longueur moyenne : 1,9 cm). Situés de part et d'autre de la ligne médiane du corps, ils sont recouverts ventralement par les testicules auxquels ils sont rattachés par une fine lame de mésorchium.

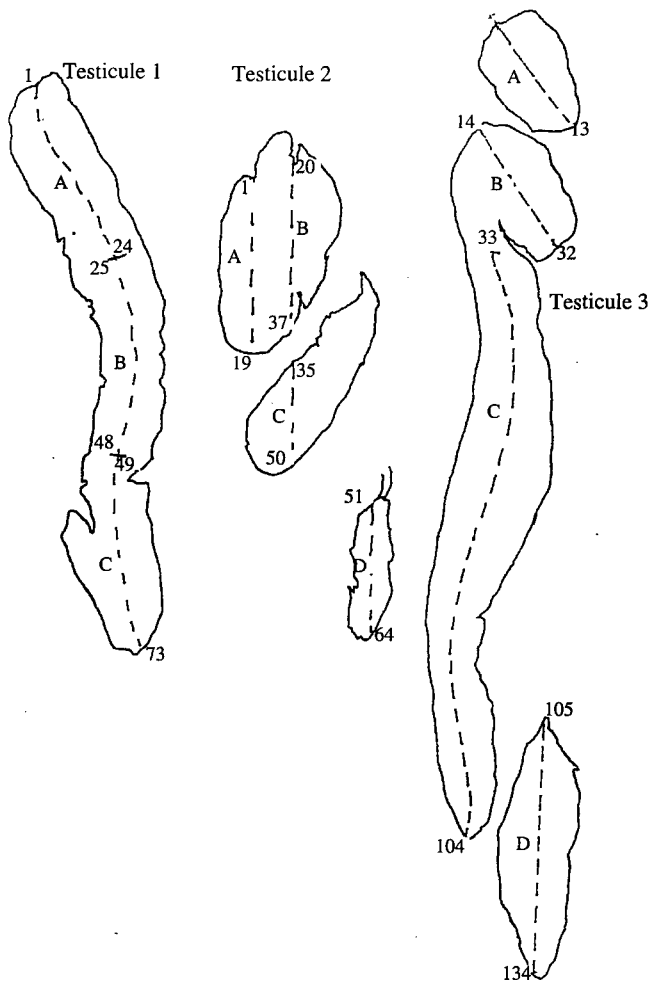


Fig. 3 : représentations par planimétrie de quelques testicules de *Bufo regularis*. La ligne pointillée représente le transect selon lequel les observations histologiques ont été effectuées. Pour chaque testicule les zones étudiées sont indiquées par les lettres A, B, C D. dans chaque zone, les chiffres indiquent les champs étudiés.

Contrairement à ceux des autres anoures, le testicule de *Bufo regularis* ne correspond pas à un organe ovale plus ou moins régulier mais à une bandelette souvent repliée sur elle-même qui donne une image de lobes évoquant la structure d'un ovaire d'anoure à l'état juvénile. Cette bandelette est parfois coupée en deux, voire trois tronçons, mais ceci toujours unilatéralement. Les testicules droit et gauche ne sont pas symétriques. La masse moyenne du testicule gauche évaluée à partir de 56 animaux est de 59,2 g (figure 3).

Chaque testicule est constitué de tubes séminifères entre lesquels se développent le tissu interstitiel, les vaisseaux sanguins, les canaux efférents et parfois des cellules oviformes. A l'intérieur de chaque tubule, les cellules de la lignée spermatique sont groupées en amas de même type, les cystes, eux-mêmes entourés d'une fine paroi (figure 4). Tout au long de l'année, chaque testicule contient des cystes représentatifs de tous les différents stades de la spermatogenèse. Comme il a été vu chez de nombreuses espèces d'amphibiens, on observe, outre les cellules caractéristiques des testicules, la présence d'ovocytes plus ou moins rudimentaires dans les tubules séminifères et parfois entre les tubules. Ils proviennent de la transformation oviforme des gonies primitives (CHAMPY, 1913). 34 % des 44 animaux capturés possèdent des cellules oviformes, tout au long de l'année excepté en juin, août et janvier.

Les tubules testiculaires débouchent dans des canaux évacuateurs dont l'épithélium est constitué de cellules cubiques. Ils se rejoignent dans les canaux efférents que l'on peut suivre à travers le mésorchium et les reins que les spermatozoïdes traversent donc avant d'être évacués par les canaux de Wolff. Ces derniers se renflent dans leur partie basale en deux ampoules, les vésicules séminales, avant de déboucher dans le cloaque. Les cordons du *rete testis* sont à l'origine de ces organes (PONSE, 1949). THIREAU et MAROLLE (1968) n'avaient pu reconnaître l'organe de Bidder par simple examen microscopique. Il nous a par contre été possible de le discerner à l'œil

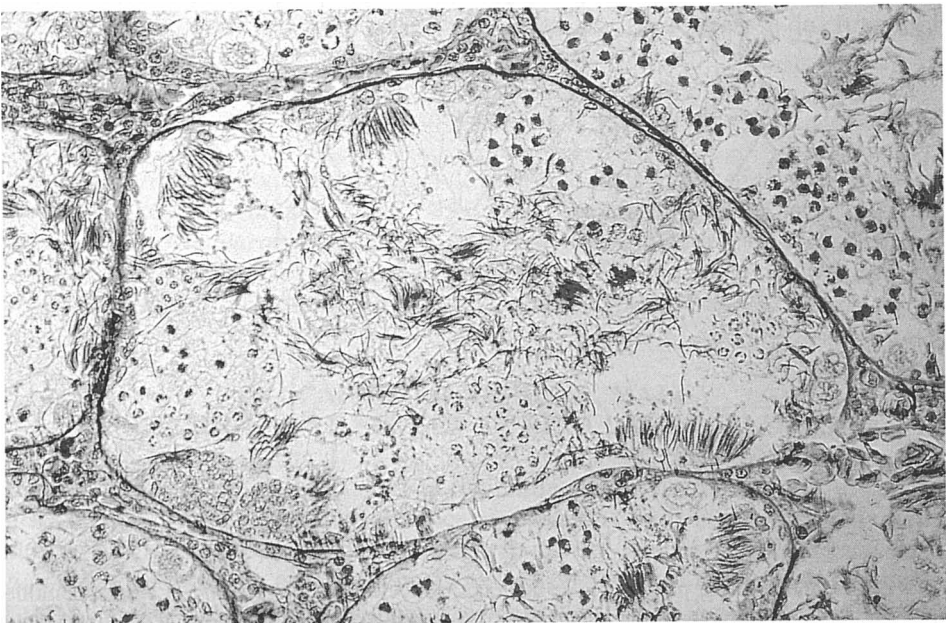


Fig. 4 : vue d'ensemble d'une coupe histologique de testicule. La barre indique 50 μ m.

nu chez 40 sujets. Dans d'autres cas, cette structure oviforme sera retrouvée par histologie à l'extrémité antérieure du testicule. Ainsi, l'organe de Bidder est toujours présent avec des variations individuelles mais il ne paraît pas présenter de cycle annuel.

Les corps adipo-lymphoïdes, décrits par THIREAU et MAROLLE (1968) et par SALAMI-CADOUX (1979), digités aux couleurs et volumes très variables coiffent l'organe de Bidder et les reins, puis s'étalent dans la cavité abdominale en s'insérant éventuellement entre les différents viscères.

2 - Méthode d'étude quantitative des testicules

L'étude quantitative porte sur les testicules gauches de 56 animaux et son but est de suivre l'état spermatogénétique tout au long des saisons. Après avoir noté la dissymétrie éventuelle existant entre les deux gonades, le testicule gauche est disséqué sous la loupe binoculaire. Il est ensuite dessiné à l'aide d'une chambre claire afin de pouvoir repérer son sens au cours du montage histologique. Il est ensuite pesé. On prélève également l'organe de Bidder lorsqu'il est visible. Le corps adipo-lymphoïde gauche est disséqué et pesé. Le rein gauche est prélevé et mesuré. Chaque testicule gauche est coupé sagittalement à 5 µm en cinq niveaux dans le sens antéro-postérieur. Les coupes sont colorées à l'hémalun-éosine ou à l'azan. Les différents stades de la lignée spermatique ont été décrites chez les anoues par de nombreux auteurs, notamment WITSCHI (1924), VAN OORDT (1956) et BASU (1968). Dans cette étude, nous avons adopté la classification employée chez l'anoure africain *Phrynobatrachus calcaratus* (GUEYDAN-BACONNIER, 1980). Les spermatogonies I sont de grandes cellules avec un noyau dissymétrique à plusieurs nucléoles situées contre la paroi des tubes séminifères ; elles sont entourées de cellules folliculaires à noyaux distincts qui, par la suite, s'étireront, formant la paroi des cystes. Les spermatogonies II issues des divisions successives des spermatogonies I sont de petite taille. Les spermatocytes I sont les cellules qui subissent la méiose dont les étapes sont souvent reconnaissables. Les spermatocytes II sont de taille plus petite. Les spermatides se présentent comme de petits noyaux très chromophiles aux formes d'abord arrondies puis allongées suivant leur évolution. Les spermatozoïdes d'abord ancrés sur les cellules de Sertoli en un faisceau très dense sont ensuite retrouvés libres dans la lumière tubulaire et dans les canaux évacuateurs. Aux catégories des cellules sexuelles s'ajoutent les cellules somatiques situées dans l'espace inter tubulaire ou dans l'espace extra tubulaire. Afin de suivre l'évolution spermatogénétique, deux études quantitatives ont été entreprises, l'une par planimétrie, l'autre par comptage cytologique.

Une première approche a été effectuée par projection des coupes transversales centrales de quatre testicules prélevés mensuellement ; les coupes sont colorées à l'azan. Le collagène apparaît en bleu et permet une distinction particulièrement nette des tubes séminifères. Les noyaux sont colorés en rouge orangé. Les coupes sont dessinées après projection sur du papier Canson à l'aide d'un appareil de projection (Ken-A-Vision, type 1000) au grossissement de 6,5. Le contenu de tous les tubes est répertorié selon le code suivant : 0 : tubes sans spermatozoïdes ; a : tubes possédant moins de 5 paquets de spermatozoïdes en faisceaux ; b : tubes ayant 6 à 10 paquets de spermatozoïdes en faisceau ; c : tubes dont les paquets de spermatozoïdes sont en couronne autour de la lumière ; d : tubes ayant plus de 10 paquets de spermatozoïdes en faisceau ; e : tubes contenant des spermatozoïdes libres. Le nombre n de tubes de

chaque catégorie est alors compté et leur somme donne le nombre total N de tubes de chaque coupe.

Les surfaces de testicules obtenues par projection sont de formes et de tailles variées. Aucune formule géométrique ne permettant de les calculer, on a été amené à les découper et les peser. Les masses de papier obtenues nous permettent de calculer les variations de surface sachant que 1,6 g de papier correspond à 1 dm² (papier Canson de 160 g/m²).

Bien que le plan de coupe ne soit pas identique pour chaque tube séminifère, on peut noter une nette variation du diamètre des tubes suivant les individus. On est donc amené à calculer une densité des tubes séminifères ou nombre de tubes séminifères par mm² de testicule pour chaque sujet (nombre total de tubes / surface). Il est évident que moins il y a des tubes au mm², plus ceux-ci sont gros et dilatés. Le pourcentage de tubes séminifères sans spermatozoïdes a été calculé. Plus il est faible, plus le testicule contient des spermatozoïdes et est éventuellement en phase de reproduction et inversement. Afin de suivre le dynamisme de l'activité spermatogénétique proprement dite tout au long de l'année, on a utilisé, pour chaque testicule, un coefficient d'occupation spermatogénétique. Pour l'établir, on regroupe les cinq catégories a, b, c, d, e en trois groupements a', b', et c' dont la répartition en spermatozoïdes pour chaque tube est la suivante. a' : moins de 5 paquets de spermatozoïdes en faisceaux ou peu de spermatozoïdes libres ; b' : de 6 à 10 groupes de spermatozoïdes en faisceaux ou quelques spermatozoïdes libres ; c' : plus de 10 groupes de spermatozoïdes en faisceaux ou de nombreux spermatozoïdes libres. A chacun de ces groupements, calculés en pourcentages, on attribue un coefficient croissant, à savoir x 1, x 2, x 3. D'où le coefficient d'occupation spermatogénétique : $a' \% + 2 b' \% + 3 c' \%$. Il s'échelonne de 0 à 300. Plus le coefficient est grand, plus l'activité spermatogénétique est importante et, inversement, plus le coefficient est faible, plus cette dernière est ralentie.

Une étude quantitative plus détaillée a été entreprise en microscopie photonique. Cette étude avait deux buts : en un premier temps, établir un échantillonnage rigoureux et représentatif qui, dans un deuxième temps, sera appliqué à l'étude du cycle sexuel. Une évaluation du pourcentage du volume de testicule occupé par chaque catégorie cellulaire est obtenue en appliquant la technique des numérations ponctuelles. Cette méthode d'analyse quantitative a été mise au point et employée pour l'étude de la spermatogenèse des poissons téléostéens par SOLARI (1973) et BILLARD *et al* (1974). Selon le principe de DELASSE, il y a équivalence entre la part de volume occupé par les cellules dans la coupe et la part de surface couverte par les sections de ces mêmes cellules sur la coupe. La méthode des numérations ponctuelles pour l'estimation des surfaces relatives consiste à superposer un réseau de points et à dénombrer les points sur la catégorie cellulaire à mesurer. Le réseau employé est l'oculaire intégrateur I commercialisé par Zeiss. Il est composé de 25 points régulièrement espacés et disposés en carré. Les types cellulaires retenus ont été définis précédemment. Cette estimation de la répartition des différents volumes cellulaires est effectuée pour l'homogénéité et l'échantillonnage, sur les testicules droits (coupes longitudinales) de quatre animaux. Nous avons utilisé pour cela des sujets capturés de trois mois en trois mois, soit respectivement en juin 1976, septembre 1976, décembre 1976 et mars 1977. Les champs d'observation de l'intégrateur de Zeiss sont situés sur des transects selon la méthode de l'échantillonnage continu (LEGAY et TOMASSONE, 1978). Pour le cycle sexuel mâle, la méthode est appliquée sur la lame centrale du testicule gauche (coupe transversale), à raison de quatre animaux par mois et ceci

pour tous les animaux de Lomé, soit 56 sujets. Pour chaque gonade, 35 champs contigus d'intégrateur de Zeiss sont étudiés, soit 875 points par testicule.

3 - Homogénéité des testicules

Parmi les amphibiens, certains genres, espèces, familles ou même certains ordres possèdent des testicules plurilobés. Cela semble la règle, parmi les Urodèles, chez les membres de la famille des Salamandridae où il est connu depuis longtemps que le nombre de lobes testiculaires augmente au fur et à mesure que l'animal vieillit (DELSOL *et al.*, 1995). C'est également la règle chez tous les Gymnophiones mâles chez qui, sauf rares exceptions, les testicules sont composés de plusieurs lobes situés les uns derrière les autres et de taille et de forme plus ou moins irrégulière selon les espèces. (WAKE, 1968). Parmi les anoures, *Bufo regularis* possède, contrairement aux 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).

L'une des méthodes permettant de comprendre les variations cycliques des gonades des mâles, consiste à quantifier le nombre de différents types de cellules germinales à plusieurs niveaux des testicules, en utilisant des méthodes de comptage afin de dresser un profil représentatif du testicule à un instant donné. C'est ce qui avait été fait précédemment chez *Bufo regularis* (DELSOL *et al.*, 1980, 1981 ; PUJOL, 1985) et *Typhlonectes compressicaudus* (EXBRAYAT et SENTIS, 1982 ; EXBRAYAT, 1986a et b). Cependant, l'utilisation de telles méthodes n'apporte des résultats concluants que dans le cas où l'ensemble du testicule présente une répartition à peu près homogène des cellules germinales. Ce n'est pas le cas, par exemple, chez les Salamandridae puisque les différentes zones des lobes des testicules évoluent non seulement en fonction de la période du cycle, mais aussi en fonction de l'âge de l'animal (DELSOL *et al.*, 1995).

Pour mener à bien une étude des cycles sexuels des mâles, l'une des méthodes consiste à quantifier sur coupes histologiques, le nombre de cellules germinales et apprécier ainsi les variations au cours de ces cycles. C'est une méthode fréquemment utilisée par notre équipe pour comprendre les cycles sexuels de plusieurs espèces d'amphibiens (DELSOL *et al.*, 1980, 1981 ; GUEYDAN-BACONNIER, 1980 ; GUEYDAN-BACONNIER *et al.*, 1984a ; NEYRAND DE LEFFEMBERG, 1988, NEYRAND DE LEFFEMBERG et EXBRAYAT, 1987, 1991 ; NEYRAND DE LEFFEMBERG et PUJOL, 1984 ; EXBRAYAT et SENTIS, 1982 ; EXBRAYAT, 1986a et b). Cependant, lorsque les animaux présentent des testicules plurilobés, est posé le choix du lobe ou de la partie de testicule qui pourra être utilisée pour représenter l'ensemble. Pour cela, le premier travail à effectuer est d'apprécier l'homogénéité ou, au contraire, l'hétérogénéité, de la gonade considérée.

De manière générale, il apparaît que l'une des meilleure méthode consiste à analyser la variance d'une série d'échantillons appartenant à un sous-ensemble (les lobes d'un testicule, par exemple) par rapport à l'ensemble des échantillons (représenté par le testicule entier). Cette étude peut paraître lourde *a priori*, mais elle représente une étape indispensable avant toute description du cycle. En effet, dans certains groupes, les urodèles Salamandridae, par exemple, chaque lobe de testicule n'est pas équivalent à celui qui lui est antérieur ou postérieur. Certaines espèces ont été particulièrement étudiées de ce point de vue comme *Triturus viridescens* (ADAMS, 1940), *Salamandra salamandra* (JOLY, 1971) chez qui on observe une augmentation du nombre de lobes au cours de la vie de l'animal et un déplacement de la spermatogé-

nèse dans le sens antéro-postérieur ce qui a pour conséquence directe une composition spermatogénétique très différente d'un lobe à l'autre, interdisant alors toute étude d'un seul lobe pour caractériser l'ensemble (voir synthèse bibliographique dans DELSOL *et al*, 1995).

Dans le cadre de ce travail, les testicules droits de quatre *Bufo regularis* fixés capturés en juin 1976, septembre 1976, décembre 1976 et mars 1977 sont pesés puis disséqués à la chambre claire et traités par histologie. Trois testicules sont observés dans leur totalité en coupes sagittales et un autre est observé également, dans sa totalité en coupes transversales. Les observations ont été effectuées dans tous les cas sur la lame centrale de chaque série de coupes de gonade, selon la méthode des numérations ponctuelles assurée à l'aide du micromètre intégrateur de Zeiss (SOLARI, 1973). La répartition des différentes catégories cellulaires est étudiée le long d'un transect au moyen de la méthode de l'échantillonnage continu exhaustif (LEGAY et TOMASSONE, 1978). La régularité de la dispersion est ensuite appréciée à l'aide du test d'analyse de la variance de Snédécour par lequel on peut estimer de deux manières différentes indépendantes la variance de la dispersion des différentes catégories cellulaires de cette population supposée unique d'origine (LAMOTTE, 1971). L'une de ces méthodes met en évidence les influences du facteur « homogénéité histologique » que l'on étudie sur les différents échantillons (la variance calculée est alors U_r), L'autre méthode de calcul élimine ces influences (la variance calculée est alors U_f). La comparaison des deux variances par le rapport U_f/U_r permet, en traduisant leurs divergences, d'en tester la signification. Les tables de Snédécour donnent la valeur limite au-delà de laquelle ce rapport est trop grand pour être attribué au seul hasard et doit donc être considérée comme significative (PUJOL et EXBRAYAT, 2000).

Le test du χ^2 a également été appliqué sur les coupes transversales après avoir supposé que la répartition des différentes catégories cellulaires suit une loi théorique donnée, ici une homogénéité caractérisée par une distribution régulière.

Dans une hypothèse d'homogénéité, les différents échantillons sont comparables d'après le test d'analyse de la variance de Snédécour, y compris les spermatozoïdes de l'un des testicules où une placette (zone de mesure) aberrante est la cause du refus du test. Cet effet perturbateur a amené à considérer, par la suite, que seuls les échantillons sur lesquels les comptages portent sur au moins 30 champs sont représentatifs du testicule en entier.

De même les χ^2 observés sont tous inférieurs au χ^2_a . Rien ne s'oppose donc à l'acceptation de l'hypothèse d'homogénéité du testicule. Si ce test rend les champs aberrants moins perturbateurs, son application est par contre délicate lorsque les cellules d'une catégorie donnée sont peu nombreuses et il ne doit en aucun cas être utilisé si le nombre de mesures est inférieur à 5.

L'analyse statistique des observations microscopiques ne s'oppose donc pas à ce que les testicules de *Bufo regularis* soient considérés comme homogènes sur le plan histologique, aussi bien dans le sens antéro-postérieur que dans le sens de la périphérie vers le centre. Aucun facteur anatomique ou histologique n'intervient dans la répartition des cellules de la lignée germinale en quelque endroit du testicule que ce soit.

Même si les testicules de *Bufo regularis* présentent une morphologie très différente de ce qui est en général observé, la structure histologique est parfaitement comparable à celle des autres anoures à cycle sexuel continu. En particulier, la répartition des types cellulaires de la lignée spermatogénétique est parfaitement homogène

comme chez d'autres amphibiens africains à cycle continu (*Phrynobatrachus calcaratus*, *Ptychadena maccarthysensis*, *Ptychadena oxyrhynchus*, Delsol *et al*, 1980, 1981; GUEYDAN-BACONNIER, 1980, GUEYDAN-BACONNIER *et al*, 1984a et b).

Comme dans toute mesure d'un échantillon biologique, des variations sont observées. Ces variations sont apparemment liées à deux causes : l'une étant la variation individuelle, toujours observée dans les échantillons biologiques.

La seconde cause pourrait être de nature physiologique. Chez *Bufo regularis*, on observe parfois une hétérogénéité dans la répartition de certaines catégories germinales. Dans ce cas, une première hypothèse serait que l'évolution des cellules germinales se poursuit et il peut alors exister une certaine hétérogénéité de répartition liée à une dynamique pas exactement synchrone. Une seconde hypothèse serait que la spermatogenèse est arrêtée et que l'hétérogénéité conséquente du mécanisme précédent affecterait la répartition des cellules germinales dans les gonades. Cependant, la répartition des différentes catégories germinales est globalement homogène et même parfois très homogène, ce qui laisse supposer l'existence d'un mécanisme de régulation particulièrement efficace.

4 - Le cycle sexuel des mâles

Pour comprendre le cycle sexuel des mâles, les coupes histologiques des testicules ont été étudiées à l'aide d'une analyse d'images effectuée grâce à l'intégrateur de Zeiss, comme indiqué précédemment. Comme il a été démontré, le testicule est homogène. La seule contrainte exigée pour une observation est la nécessité de travailler sur un minimum de 30 champs d'intégrateur par animal. Notre observation a porté sur un minimum de 30 champs par testicule, totalisant ainsi 875 cellules, et ceci sur 56 animaux mâles étudiés pour ce cycle. Un total de 49000 cellules ont ainsi été répertoriées. La figure 5 donne le diagramme des variations saisonnières des volumes de testicule occupée par les différentes catégories cellulaires de la lignée spermatogénétique au cours du cycle annuel. On constate que les sept catégories cellulaires sont présentes toute l'année, que la variation du nombre total de cellules spermatogénétiques est faible (45 à 60) et que le nombre de cellules de chaque catégorie ne subit pas de variations saisonnières notables. Ces données histologiques ont été analysées par les méthodes statistiques classiques : moyenne, écart-type, test de Snédécour et test du χ^2 . Elle sont faites par rapport aux classes pluviométriques A, B, C pour les test de Snédécour et par rapport aux valeurs médianes des variables pour les tableaux de contingence des χ^2 , conservant ainsi les mêmes paramètres que pour l'analyse planimétrique du testicule.

L'examen des résultats montre que les distributions s'écartent beaucoup des distributions gaussiennes. Le test de Snédécour refuse l'hypothèse d'une distribution régulière pour les spermatozoïdes en faisceaux, les spermatozoïdes libres, l'ensemble des cellules sexuelles, la lumière tubulaire, les vaisseaux sanguins, les cellules de Sertoli, les cellules nourricières, les canaux évacuateurs avec des spermatozoïdes. Ce test permet par contre d'accepter une distribution régulière pour les spermatogonies I et II, les spermatocytes I et II et les spermatides, les cellules des parois des cystes, les cellules interstitielles (cellules de Leydig) et les cellules des canaux évacuateurs vides. Ces dernières cellules étant indépendantes de la saison, elles ont donc un cycle continu.

Le test du χ^2 permet d'accepter l'indépendance par rapport aux différentes conditions pluviométriques pour les spermatogonies I et II. Par contre, il la refuse pour les

spermatocytes I et pour l'ensemble spermatocytes II et spermatides. Ne remplissent pas non plus cette condition l'ensemble des cellules sexuelles et les canaux évacuateurs avec spermatozoïdes. Ce test confirme également l'indépendance par rapport aux saisons pour les cellules de la paroi des cystes, les cellules interstitielles et les canaux évacuateurs vides. La longueur du corps n'intervient dans aucune variable, la densité semble liée aux spermatogonies II et aux spermatocytes II, le rapport gona-do-somatique est corrélé aux spermatocytes II et à la lumière tubulaire. Les résultats ne peuvent conduire à une interprétation de détail, étant donné leur complexité. Toutefois, ils confirment globalement la notion de cycle continu pour la lignée spermatogénétique, quelles que soient les variations saisonnières. Les χ^2 observés de l'ensemble des cellules sexuelles par rapport à toutes les variables de l'étude biométrique et de l'étude planimétrique sont dans l'ensemble inférieures au χ^2_a . Il y a donc une remarquable homogénéité de cet ensemble des cellules sexuelles, ce que nous ne saurions trouver dans un cycle discontinu. L'ensemble des cellules sexuelles varie en sens inverse de la lumière tubulaire. Il n'y a donc pas de dilatation des tubes séminifères à certaines périodes de l'année, ni variation apparente du tissu interstitiel, ce dernier n'étant le siège ni de développement ni de régression. Les spermatogonies I, par rapport au coefficient d'occupation spermatogénétique ou aux spermatozoïdes en faisceau ont la même corrélation : ils varient en sens contraire. Ainsi, la multiplication des spermatogonies I suit la formation des spermatozoïdes en faisceaux, comme pour reconstituer immédiatement le stock. La variabilité des dispersions, reflet d'une

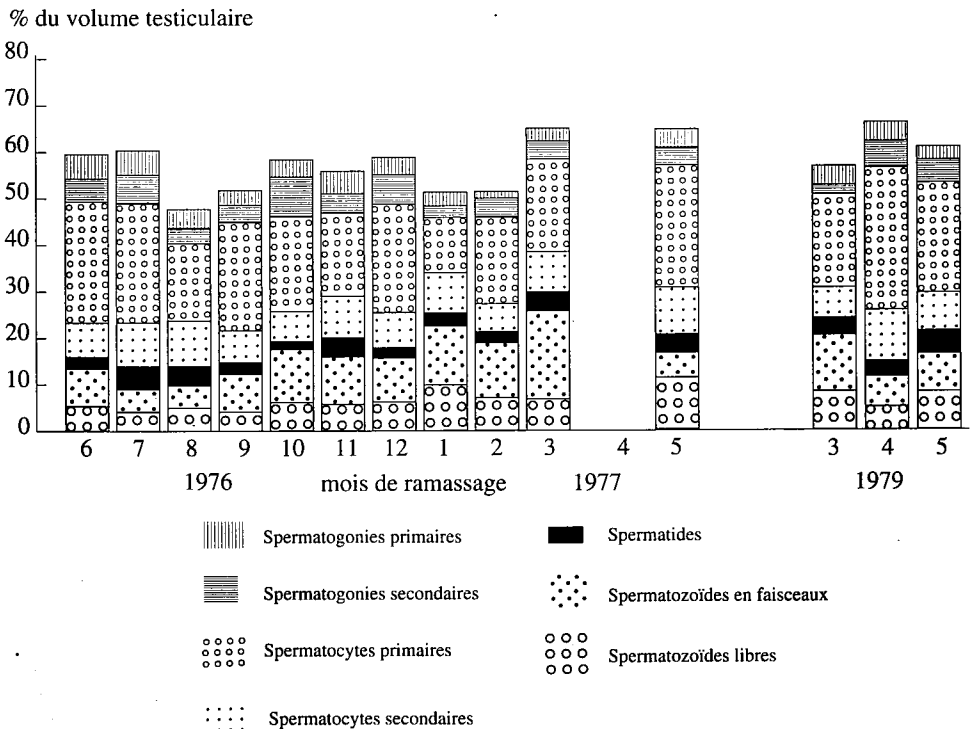


Fig. 5 : Variations saisonnières des volumes de testicules occupés par les différentes catégories cellulaire chez *Bufo regularis* mâle (population de Lomé, Togo).

grande variabilité individuelle, est une entrave à l'application du test de Snédécór ; elle n'exclut pas la notion de cycle continu pour la structure cytologique du testicule et son activité spermatogénétique.

Les analyses quantitatives des différentes observations histologiques effectuées sur les testicules, tout en nous permettant de conclure à un cycle sexuel de type continu chez *Bufo regularis*, suggèrent que se maintiendrait pendant toute l'année des formes premières de la spermatogenèse (spermatogonies I) et l'élimination des formes évoluées (spermatozoïdes), phénomène plus sensible durant les mois pluvieux (lot C) au cours desquels les spermatozoïdes libres sont plus nombreux.

Si les spermatozoïdes semblent plus dépendants de la saison, les spermatogonies et les spermatocytes ont une distribution remarquablement homogène, indépendante des variations saisonnières. Cette stabilisation maintient un certain quota pour toutes les catégories cellulaires confirmant un cycle continu, tout en laissant apparaître des variations individuelles notables.

5 - Précisions apportées par l'étude histoautoradiographique d'une population de Brazzaville (Congo)

Des *Bufo regularis* mâles provenant de Brazzaville ont été capturés en octobre décembre 1980, mars et mai 1981 (GUEYDAN-BACONNIER *et al.*, 1984 b ; NEYRAND de LEFFEMBERG et EXBRAYAT, 1995 ; PUJOL, 1985). A leur arrivée au laboratoire, ils ont été mis en élevage dans des conditions proches des conditions tropicales : 30 °C, 90 % d'humidité et avec un rythme nycthéral de 12 h / 12 h. Quelques jours après leur arrivée, une partie des animaux de chaque lot a reçu une injection intrapéritonéale de thymidine tritiée à raison de 0,7 µCi / g, ce qui a totalisé 59 animaux (22 en octobre, 13 en décembre, 16 en mars et 8 en mai). Ces animaux ont été sacrifiés entre 15 minutes et 21 jours après l'injection, puis fixés au liquide de Bouin ou au formol à 4 %. Les sujets n'ayant reçu aucune injection ont servi de témoins. Les testicules gauches ont été disséqués, pesés puis préparés selon les méthodes classiques de l'histoautoradiographie. Les coupes de 4 µm à la paraffine ont reçu une application d'émulsion nucléaire Ilford K5 pendant 1 jour à 4 ° C. Les impacts radioactifs ont été révélés par le PQ Universel Ilford. Le fond des coupes a été coloré par le rouge nucléaire, l'azan de Roméis ou encore le Feulgen. Parallèlement aux lames révélées, pour chaque testicule, ont été préparées des lames témoins issues de *Bufo* injectés mais n'ayant pas reçu d'application d'émulsion ; elles ont été colorées à l'hémalun-éosine et à l'azan. Les stades de la spermatogenèse ont été déterminés de la même manière que précédemment. L'étude quantitative a été effectuée selon la méthode des numérations ponctuelles décrites ci-dessus. Elle a porté sur 30 champs d'intégrateur de Zeiss, soit 750 points de dénombrement ou cellules par testicule. Les résultats ont été exprimés en pourcentage par rapport au nombre total de cellules sexuelles. Les observations ont été effectuées sur l'animal à la spermatogenèse la plus rapide, c'est-à-dire chez celui qui présente un marquage des étapes spermatogénétiques les plus évoluées.

Chez *Bufo regularis*, la durée de la spermatogenèse 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. L'évolution des taux de marquage permet d'évaluer approximativement la durée minimale des étapes spermatogénétiques. La division mitotique des spermatogonies

I 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 spermatocytes II s'effectue en 8 jours. La transformation des 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 spermatogenèse chez les animaux à maturation rapide. L'étude par histautoradiographie 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 spermatogenèse.

6 - Régulation endocrine du cycle sexuel mâle

Le cycle sexuel des mâles de la population que nous avons étudié est de type continu. Comme chez tous les vertébrés, la régulation des cycles de reproduction des amphibiens mâles implique l'action de plusieurs tissus endocrines et notamment le tissu interstitiel du testicule (voir bibliographie in LOFTS, 1974) et les cellules de l'adénohypophyse (voir bibliographie in VAN OORDT *et al*, 1968 ; GIROD, 1983, EXBRAYAT, 1989 ; MASOOD-PARVEEZ *et al*, 1994). Il n'existe à l'heure actuelle que peu de données sur les organes endocrines de *Bufo regularis* (PUJOL et EXBRAYAT, 1996). Les crapauds étudiés sont des mâles prélevés en 1976, 1977 et 1979, fixés au liquide de Bouin et conservés dans de l'alcool à 70 °. Les testicules et les hypophyses de deux animaux adultes de même taille, prélevés chaque mois ont été inclus dans la paraffine et coupés transversalement à 5 µm. Les coupes de testicule ont été colorées au trichrome de Masson-Goldner ou à l'azan de Romeis. Quelques coupes à congélation ont été colorées au noir Soudan B afin de mettre en évidence la présence de lipides. Le pourcentage de testicule occupé par le tissu interstitiel a été apprécié par une méthode faisant intervenir des numérations ponctuelles (décrite dans un paragraphe précédent).

. Le tissu interstitiel

Comme chez les autres anoures, les testicules de *Bufo regularis* comportent un véritable tissu interstitiel parfaitement comparable aux cellules de Leydig des mammifères. Ces cellules arrondies de 10 µm de diamètre environ sont regroupées en nodules de tailles variables situés entre les parois conjonctives des tubes séminifères. La coloration au noir soudan B permet de mettre en évidence leur contenu lipidique.

Chez *Bufo regularis*, les résultats obtenus par l'étude du pourcentage d'occupation du volume testiculaire par le tissu interstitiel montrent des variations. Le traitement statistique de ces données a cependant fait apparaître une indépendance de celui-ci par rapport aux conditions climatiques et, en particulier, la pluviométrie.

. L'hypophyse

L'hypophyse de *Bufo regularis* est située immédiatement au-dessous du sillon médian de la formation proéminente de l'hypothalamus (THIREAU et MAROLLE, 1968). Elle est de forme ovoïde, semblable à celle des autres anoures. La *pars distalis* de l'adénohypophyse est irriguée de nombreux sinusoides qui se rejoignent pour former le système capillaire porte-hypophysaire.

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). Pour établir une correspondance précise entre les qualités tinctoriales des types cellulaires et leur fonction endocrine, nous avons appliqué des anticorps dirigés contre les hormones lactotropes (anti-PRL) et gonadotropes (anti LH et anti FSH) (« DAKO, France »). Un kit «Biomeda» (Microm-France) a été utilisé pour révéler la présence des anticorps par immunocytochimie indirecte. Les coupes déparaffinées et hydratées ont d'abord été incubées pendant 30 minutes dans le mélange PBS et H_2O_2 (110 vol) à 0,3% afin de bloquer les peroxydases endogènes. Puis elles ont été mises successivement au contact d'un mélange PBS-lait à 3% afin d'inhiber les liaisons non spécifiques, d'un anticorps primaire dirigé contre la PRL, la LH ou la FSH puis d'un anticorps secondaire biotinylé couplé à de l'avidine-peroxydase. La peroxydase a enfin été révélée par réaction avec l'AEC (amino-éthyl-carbazole), utilisé comme substrat. Les sites d'activité enzymatique apparaissent alors colorés en rouge-orangé. Les coupes sont montées à l'aide d'un milieu de montage aqueux (« Crystal Mount » de MICROM). Des témoins dépourvus d'anticorps primaire ou secondaire ont été également confectionnés (PUJOL et EXBRAYAT, 1996).

Les surfaces de coupes transversales de l'hypophyse ont été mesurées (6 coupes régulièrement espacées par hypophyse). Pour mesurer les cellules de l'hypophyse, nous avons considéré 10 cellules de chaque catégorie sur deux coupes transversales par hypophyse (soit un total de 40 cellules par mois). Pour déterminer les surfaces des coupes ou des cellules, nous avons mesuré le grand et le petit diamètre de chaque élément, puis calculé sa surface, en l'assimilant à une ellipse (selon une méthode déjà décrite par EXBRAYAT, 1989). La moyenne a enfin été calculée pour tous les éléments appartenant à une même hypophyse.

Les moyennes mensuelles des diamètres des surfaces de coupe ne présentent pas, *a priori*, de variations notables malgré l'alternance des saisons sèches et des saisons humides. Les quelques variations seront analysées plus loin.

L'étude histologique de la *pars distalis* a permis de mettre en évidence les cellules gonadotropes et lactotropes. Aucun trait particulier ne semble différencier *Bufo regularis* des autres amphibiens anoures. Ces deux types cellulaires sont régulièrement dispersés dans tout le volume hypophysaire. Dans la partie postérieure de l'hypophyse, les cellules gonadotropes sont particulièrement nombreuses sur les faces ventrale et latérale de l'organe.

Les cellules gonadotropes qui réagissent avec un anticorps anti-LH ou anti-FSH ou avec les deux sont basophiles, volumineuses, ovoïdes ; leur cytoplasme bleuté au trichrome de Cleveland et Wolfe contient de nombreux grains rosés, APS positifs, de nature glycoprotéique. La répartition de ces cellules est régulière dans l'hypophyse. Les cellules à prolactine réagissent avec un anticorps anti-PRL. Elles sont acido-philés, de taille plus réduite que les cellules gonadotropes et contiennent des grains de sécrétion de nature protidique, colorés par l'orangé G, aussi bien au trichrome de Cleveland et Wolfe qu'à l'APS-orangé G. Leur disposition est également homogène dans l'hypophyse.

A l'examen de la moyenne mensuelle des surfaces de coupe de ces deux populations cellulaires au cours du cycle annuel, il apparaît des variations de faible amplitude.

Etude statistique des résultats

Les données obtenues ont été traitées statistiquement en analyse de composantes principales et de corrélation (LAGARDE, 1995). L'intérêt d'une telle analyse est de

faire apparaître des corrélations entre des résultats qui, *a priori*, peuvent paraître disparates.

Les données concernant la pluviométrie, la température, le volume du tissu interstitiel, les surfaces de coupe de l'adénohypophyse, la surface des cellules gonadotropes et lactotropes ont été traitées statistiquement par analyse en composantes principales (A.C.P.). Les résultats sur les moyennes mensuelles de toutes ces données du cycle annuel figurent dans la figure 8. Les coefficients supérieurs à 0,5 sont retenus : ce sont les indicateurs de tendance.

Il apparaît que :

- les moyennes des surfaces totales de l'hypophyse sont liées au volume du tissu interstitiel, ce qui se caractérise par un accroissement simultané des deux données. Elles sont par contre faiblement liées positivement aux cellules lactotropes. Les surfaces totales des coupes d'hypophyse décroissent lorsque la température augmente. Le pourcentage de tissu interstitiel paraît diminuer lorsque la hauteur d'eau augmente.

- Les moyennes des surfaces cellulaires lactotropes sont liées positivement à la moyenne des surfaces des cellules gonadotropes. Elles augmentent en effet simultanément. Ces surfaces cellulaires augmentent en outre lorsque la hauteur des précipitations et le nombre de jours de pluie augmentent.

VI - L'APPAREIL UROGENITAL FEMELLE : MORPHOLOGIE, CYCLE SEXUEL ET REGULATION ENDOCRINE

1 - Les animaux

L'étude quantitative du cycle de reproduction a porté sur 68 femelles adultes de *Bufo regularis* Reuss, 1834. Elle comprend : les variations biométriques de l'animal, celles des follicules ovariens et des oviductes. Pour l'étude conjointe sur les ovaires et les hypophyses, 28 femelles de même taille donc supposées de même âge ont été retenues. Toutes sont capturées mensuellement en 1976, 1977 et 1979 (PUJOL 1987). Ces animaux fixés par le liquide de Bouin ont été stockés dans l'alcool à 70°. L'index gonadosomatique (RGS) a été calculé (PUJOL 1987). Les ovaires, les oviductes et les hypophyses ont été inclus à la paraffine et coupés à 5 µm.

2 - Structure de l'appareil génital femelle

L'appareil urogénital de *Bufo regularis* est constitué, comme chez les autres anoures d'une paire d'ovaires. Des corps adipo-lymphoïdes les coiffent à leur extrémité. Les reins des femelles ont une structure identique à ceux des mâles. Ils sont constitués d'une paire de mésonéphros fonctionnels. Situés de part et d'autre de la ligne médiane du corps, ils sont de forme allongée, légèrement convexes, parfois asymétriques par leur position et par leur taille. Une paire d'oviductes différenciés en plusieurs parties est située de part et d'autre de la cavité générale de l'animal.

3 - Cycle sexuel des femelles

Les ovaires ont été bloqués « *in toto* ». Des coupes transversales ont été effectuées à cinq niveaux différents le long d'une ligne antéro-postérieure. Les pièces ont été colorées au Trichrome de Masson-Goldner et à l'azan de Roméis (GABE 1968). Les follicules ovariens ont été classés en 5 stades selon leur dimension et leur évolution

(DUMONT 1972, PUJOL 1987). Pour l'étude parallèle de l'hypophyse et des ovaires, les moyennes mensuelles ont été établies sur 26 321 follicules. Les comptages de tous les follicules de chaque catégorie ont porté sur les cinq niveaux de quatre ovaires mensuels. Sur ces lames, les comptages ont porté sur dix coupes. Le pourcentage de chaque catégorie de follicule a été calculé globalement pour les quatre animaux d'un même mois.

Des premières observations, il ressort que les modalités de l'ovogenèse de *Bufo regularis* de Lomé sont comparables à celles qui ont été décrites chez les amphibiens tels que *Xenopus laevis* (VAN GANSEN, 1985). Les phénomènes de vitellogénèse sont semblables à ceux qui ont été décrits chez les amphibiens par WITTEK (1952) et observés chez des *Bufo regularis* d'Egypte par AMER (1970). Quel que soit le niveau de coupe, aucune différence notable n'apparaît dans les structures histologiques. Dans les ovaires, quelle que soit la période de capture, des follicules ovariens à différents stades sont observés. Le développement des ovocytes et des follicules est donc synchrone. Des ovocytes plus ou moins atteints par l'atrésie sont cependant présents pendant la saison sèche. Dans le but de suivre l'évolution des ovaires en fonction des variations saisonnières, une étude quantitative des follicules a été menée. En s'appuyant sur la classification des ovocytes établie par différents auteurs et en particulier chez *Xenopus laevis* par DUMONT (1972), les ovocytes de *Bufo regularis* ont pu être répartis en cinq stades.

Les ovocytes de stade I, dépourvus de vitellus, mesurent jusqu'à 250 μm de diamètre. Les ovocytes de stade II, en phase d'accroissement, mesurent 250 à 500 μm

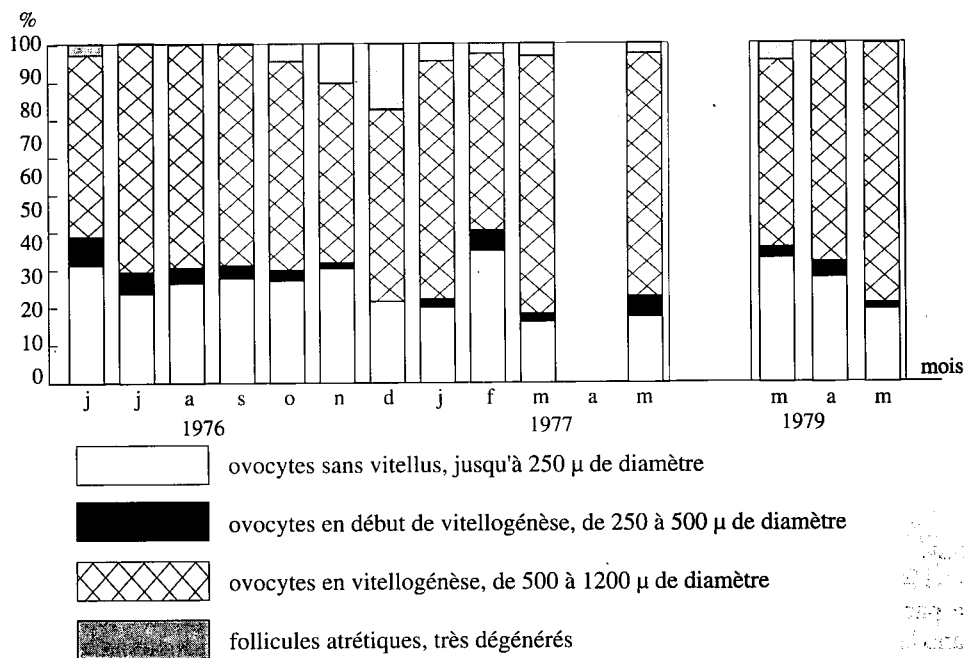


Fig. 6 : Variations saisonnières des pourcentages des différents stades ovariens chez *Bufo regularis* femelles (population de Lomé, Togo).

de diamètre ; ce sont des ovocytes en début de vitellogenèse. Les granules vitellins sont peu volumineux et situés à la périphérie. Les ovocytes de stade III mesurent entre 500 et 1200 μm de diamètre ; ce sont des ovocytes en vitellogenèse. Les grains de vitellus sont plus volumineux, ils remplissent l'ovocyte et atteignent le noyau. La vésicule germinative est décentrée, la coloration bipolaire est très nette. L'ovocyte atteint sa taille maximale. Au stade IV, les follicules sont au début de l'atrésie avec encore des grains de vitellus et l'apparition de vacuoles. Au stade V, les ovocytes et les follicules sont de taille très réduite par une importante dégénérescence ; il ne reste plus que des granules pigmentaires.

L'étude quantitative des ovaires montre que ces derniers présentent simultanément toutes les étapes de l'évolution folliculaire et que les pourcentages des différents types de follicules basés essentiellement sur l'aspect morphologique et les dimensions de l'ovocyte, sont relativement constants tout au long de l'année (figure 6). Toutefois, sur les 58410 follicules étudiés, 3297 d'entre eux sont atrétiques, tous stades de dégénérescence confondus. Ce phénomène d'atrésie semble se produire plus particulièrement pendant la grande saison sèche (novembre à mars). On n'en observe pas en avril et mai, période de reproduction. Par ailleurs, des animaux capturés en mai 1977 présentent anormalement de nombreuses atrésies. Or, durant cette année, une importante sécheresse a empêché la reproduction des crapauds. Rappelons que les rassemblements de crapauds chantants ne furent alors observés qu'au mois d'octobre suivant, à l'arrivée de la petite saison des pluies (SALAMI-CADOUX, 1979). La présence de la sécheresse pourrait alors expliquer les nombreuses atrésies constatées au niveau des ovaires pendant cette période.

L'étude quantitative a permis de montrer que l'évolution des follicules ovariens était continue chez *Bufo regularis* capturé à Lomé (PUJOL 1987). Les étapes d'évolution des follicules sont toutes présentes dans les ovaires quelle que soit la période de l'année. Une phase d'atrésie des follicules les plus volumineux a été observée lors de la grande saison sèche qui fut particulièrement sévère durant la collecte des animaux étudiés. Ces résultats permettent donc de mettre en évidence la continuité de l'évolution folliculaire au cours de l'année. Le facteur déterminant principal de la reproduction semble être, *a priori*, l'arrivée de la grande saison des pluies. La sécheresse, normale ou anormale, paraît bloquer l'évolution des follicules qui dégénèrent et entrent en atrésie après avoir atteint une taille limite.

4 - Les oviductes

Les oviductes, inclus dans la parafine « *in toto* », ont été coupés longitudinalement sur 3 niveaux en moyenne : 2 pour les plus petits et 6 pour les plus gros. Ils ont été colorés au Trichrome de Masson-Goldner, à l'APS et à la coloration de Ravetto. L'observation du cycle porte sur 700 lames (PUJOL et EXBRAYAT, 1987).

Les oviductes de *Bufo regularis* possèdent une partie antérieure plus ou moins sinueuse qui suit une direction rectiligne (*pars recta*) dont le diamètre augmente progressivement jusqu'à la partie moyenne très pelotonnée (*pars convoluta*). Il se termine par un pseudo-utérus (*pars utera*). Afin de permettre une plus grande précision dans la descriptions de la structure histologique, l'ensemble de l'oviducte a été divisé en sept niveaux désignés par les lettres A (ostium), B, C, D (*pars recta*), E (*pars convoluta*), F (partie intermédiaire) et G (*pars utera*) qui se succèdent dans le sens crânio-caudal (figure 7). De l'extérieur vers l'intérieur, chaque oviducte est revêtu d'une tunique comportant une séreuse, une couche de tissu conjonctif à la périphérie

de laquelle on observe une couche de cellules musculaires plus ou moins épaisse. Le conjonctif vascularisé peut émettre des villosités ou contenir des structures glandulaires. Un épithélium borde la lumière tubaire. Les modifications histomorphologiques et histochimiques des oviductes ont été étudiées. Pendant toute l'année et chez tous les animaux, on retrouve la même topographie histologique, à tous les niveaux de l'oviducte.

Au niveau de la zone A, l'ostium, les différentes couches de la paroi sont minces. Des crêtes conjonctives bien développées sont recouvertes d'un épithélium simple contenant des cellules mesurant $5 \times 10 \mu\text{m}$, aux ciliatures courtes. Entre les crêtes et dans la lumière, on observe quelques grains de sécrétions négatifs aux réactions histochimiques utilisées.

La zone B est un tube étroit dont la lumière occupe la presque totalité de la coupe. Les parois minces sont formées de replis qui, sur les coupes, ont une structure en lames resserrées les uns contre les autres. Les parois sont tapissées d'un épithélium simple parfois cilié. Aucune sécrétion n'est observée à ce niveau. Dans la zone C, le conjonctif est particulièrement vascularisé à la périphérie, la couche musculaire est plus épaisse. Les grandes lames observées précédemment sont remplacées par des villosités recouvertes d'un épithélium dont les cellules mesurant $6 \times 8 \mu\text{m}$ sont munies de cils apicaux plus haut que précédemment. A la base des villosités, on note la présence de cellules glandulaires de $24 \times 6 \mu\text{m}$, au noyau basal et à la sécrétion

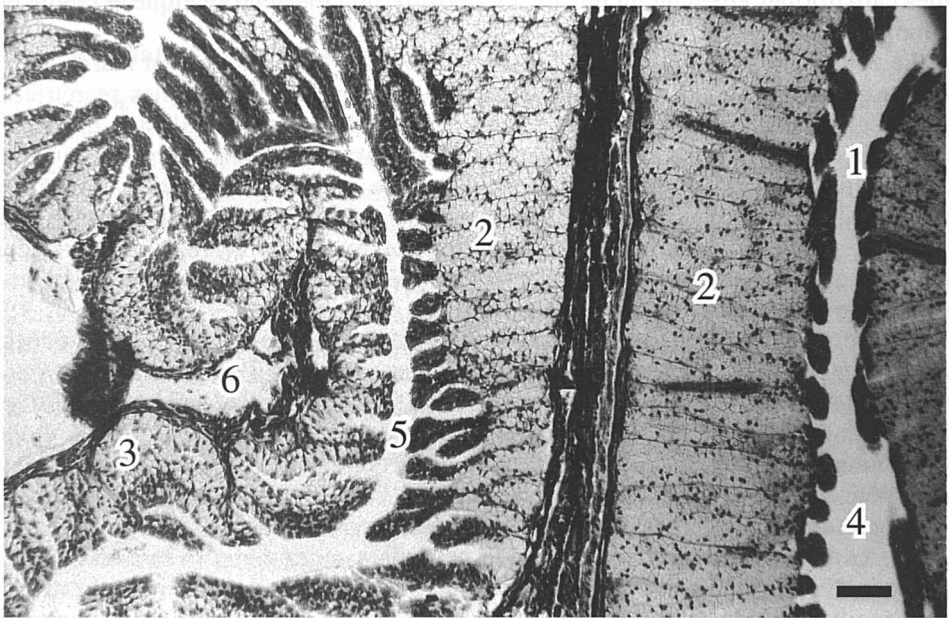


Fig. 7 : Structure histologique de l'oviducte de *Bufo regularis* femelle. 1 : niveau E (*pars convoluta*), cellules ciliées bordant la lumière. 2 : niveau E (*pars convoluta*), tissu glandulaire ; 3 : niveau G (*pars utera*), cellules glandulaires ; 4 : lumière de la *pars convoluta* (à droite) et la *pars utera* (à gauche) ; 5 : zone F intermédiaire entre la *pars convoluta* (à droite) et la *pars utera* (à gauche) ; 6 : niveau G, *pars utera*. La barre indique $100 \mu\text{m}$.

apicale. Cette dernière, APS fortement positive, non métachromatique, est colorée en jaune par la réaction de Ravetto.

La zone D comporte des villosités plus courtes et plus resserrées que précédemment, réduisant fortement la lumière tubaire. Le tissu conjonctif supporte toujours un épithélium simple cilié interrompu de cellules caliciformes émettant un mucus APS positif, orthochromatique ou faiblement métachromatique et coloré en jaune ou vert par la coloration de Ravetto. La ciliature est enduite d'une sécrétion présentant des qualités tinctoriales identiques au mucus. Entre les crêtes, au fond des cryptes, de nombreuses cellules glandulaires émettent une sécrétion APS positive, non métachromatique et colorée par le jaune alcian, ceci sans variation significative au cours du cycle.

La zone E qui constitue la majorité de la *pars convoluta* comporte un tissu glandulaire compact situé dans la partie sous-épithéliale de conjonctif. Les cellules sécrétrices volumineuses mesurant $24 \times 10 \mu\text{m}$, possèdent un noyau repoussé contre la paroi par une substance à l'aspect granuleux, fortement APS positive, orthochromatique ou peu métachromatique, colorée en jaune par la réaction de Ravetto. Dans la partie postérieure, ces sécrétions deviennent généralement neutres puis sulfatées. Ceci est particulièrement marqué chez les animaux de la seconde collecte effectuée une année où la pluviométrie était normale, voire supérieure à la moyenne. Les orifices évacuateurs des glandes compriment la base des villosités, elles-mêmes très courtes et recouvertes de cellules ciliées (mesurant $8 \times 6 \mu\text{m}$) entre lesquelles des cellules caliciformes émettent un mucus APS positif, non métachromatique et coloré en jaune par la coloration de Ravetto.

La zone F, intermédiaire entre la *pars convoluta* et la *pars utera* est marquée par l'interruption brutale du tissu glandulaire. Un nouveau type de cellules sécrétrices, seul présent dans la zone G apparaît. Dans cette dernière zone, les villosités et les cellules ciliées se raréfient progressivement et disparaissent dans la partie caudale. L'épithélium pseudo-stratifié est constitué d'une couche de cellules sécrétrices mesurant $6 \times 30 \mu\text{m}$ à noyau basal et à sécrétions APS positives, métachromatiques et colorées en bleu par la réaction de Ravetto ; entre ces dernières, sont intercalées quelques cellules ciliées et des mucocytes aux sécrétions APS positives, métachromatiques et colorées par la réaction de Ravetto.

L'ensemble de ces observations permet de préciser que la structure de l'oviducte de *Bufo regularis* rappelle ce qui a déjà été constaté chez d'autres anoures (*Rana pipiens*, LEE, 1965, 1969 ; SHIVERS et JAMES, 1970 ; *Rana esculenta*, ANDREOZZI *et al.*, 1971 ; *Bombina variegata*, ALBANESE-CARMIGNANI et ZACCONE, 1978). L'étude histochimique montre que, dans l'ostium et la dernière partie de la *pars recta*, aucune sécrétion de nature glucidique n'est observée. Dans la partie moyenne de la *pars recta* (niveau C), les glandes de fond des cryptes émettent des mucopolysaccharides neutres et acides de nature carboxylique ; cependant si ces derniers sont révélés par la réaction couplée au jaune et au bleu alcian, ils n'induisent pas une métachromasie nette au niveau de la substance concernée, ce qui laisse supposer qu'ils ne sont présents qu'en faible quantité. Dans sa dernière partie de la *pars recta*, des cellules caliciformes apparaissent, émettant une sécrétion composée de mucopolysaccharides neutres et acides, carboxyliques et sulfatés, ces deux derniers ne paraissant pas représenter une proportion importante de la sécrétion. Les sécrétions glandulaires de ce segment étant de même nature que les précédentes, on peut supposer que les glandes sont identiques mais plus volumineuses et plus nombreuses dans la portion posté-

rieure et donc contraintes à s'enfoncer dans le chorion. Au niveau de la *pars convoluta*, l'épithélium cilié est interrompu par des cellules caliciformes émettant une sécrétion muqueuse carboxylée. Les volumineuses glandes sécrètent par contre un mucus nettement neutre. L'utérus est tapissé de cellules sécrétrices émettant des mucopolysaccharides sulfatés ; les cellules caliciformes observées à ce niveau émettent un mucus nettement acide, carboxylé et sulfaté.

La complexité des sécrétions de l'oviducte de *Bufo regularis* évoque la complexité déjà connues des voies génitales des autres amphibiens ovipares. Elle confirme par sa régularité la notion de cycle continu démontrée dans les ovaires. La présence de follicules atrétiques, à certains mois, ne semble pas s'accompagner de phénomènes notoires dans les oviductes des mêmes sujets. Il nous a été donné d'observer à différents niveaux des voies génitales les passages des ovocytes et leurs dégradations, ceci chez une dizaine d'animaux capturés tout au long de l'année. Dans la plupart des cas, les sécrétions mucipares n'ont pas contribué à la confection de la gangue de l'ovocyte. Il semble alors que de nombreux éléments lymphocytaires issus du conjonctif des villosités de la *pars convoluta*, envahissent la lumière de l'oviducte. Par phagocytose, ils participent à la dégradation de l'ovocyte en l'envahissant et en lysant les plaquettes vitellines.

Ainsi, lorsque les conditions climatiques ne sont pas propices à une reproduction, un phénomène d'atrésie dans les ovaires et/ou un phénomène de dégradation dans les oviductes détruiraient les ovocytes alors condamnés puisque leur fécondation et leur développement ne pourront avoir lieu.

6 – Régulation endocrine du cycle sexuel femelle et hypophyse

Les coupes transversales des adénohypophyses sont colorées au trichrome de Cleveland et Wolfe et à l'APS-orangé G (GABE, 1968). Elles sont assimilées à une ellipse et leurs surfaces sont calculées à partir des mesures des grands et petits diamètres de chaque élément à raison de 6 coupes régulièrement espacées par hypophyse, selon une méthode déjà décrite par EXBRAYAT (1989). Les moyennes mensuelles de ces surfaces ont été calculées sur 168 coupes.

L'identification des différents types cellulaires de l'hypophyse et en particulier celle des cellules gonadotropes et lactotropes est caractérisée par leur affinité tinctoriale et validée par une étude immunohistochimique (PUJOL et EXBRAYAT, 1996). Pour mesurer les cellules de l'hypophyse, nous avons considéré 10 cellules de chaque catégorie sur 2 coupes transversales par hypophyse (soit un total de 40 cellules par mois), établissant ainsi les moyennes individuelles et mensuelles des cellules gonadotropes et lactotropes de l'hypophyse. Afin de préciser les rapports entre l'hypophyse, l'appareil génital et les facteurs externes, la surface de coupe de ces cellules a été étudiée puis analysée conjointement aux différentes variables externes (température, pluviosité) et interne (état des gonades) par analyse des composantes principales, comme précédemment chez les mâles (PUJOL et EXBRAYAT, 1996) où nous avons constaté que l'augmentation de la taille des cellules lactotropes et gonadotropes était corrélée à une baisse de température et une augmentation de pluviosité.

L'hypophyse de *Bufo regularis* femelle possède les mêmes caractéristiques que celle des mâles. Afin d'analyser les variations possibles des cellules endocrines, nous avons procédé, comme chez les mâles, à l'analyse quantitative de coupes histologiques. Comme pour les mâles, une analyse en composantes principales et de corrélation a également été effectuée (LAGARDE, 1995), en tenant compte des facteurs cli-

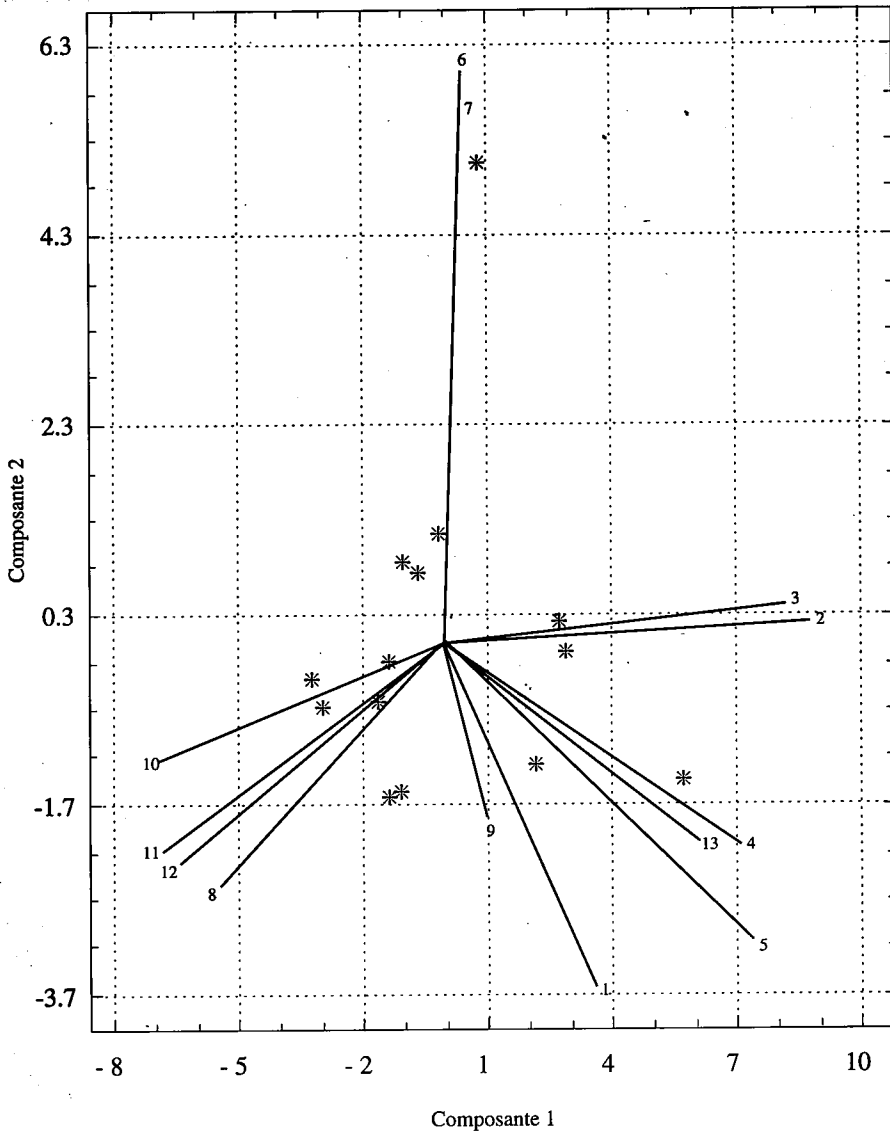


Fig. 8 : Analyse en composantes principales de l'appareil génital femelle. 1 : moyenne mensuelle des surfaces de coupe d'hypophyse ; 2 : moyenne mensuelle du nombre de follicules ovariens ; 3 : moyenne mensuelle des ovocytes de stade I ; 4 : moyenne mensuelle des ovocytes de stade II ; 5 : moyenne mensuelle des ovocytes de stade III ; 6 : moyenne mensuelle des ovocytes de stade IV ; 7 : moyenne mensuelle des ovocytes de stade V ; 8 : moyenne mensuelle des rapports gona-do-somatiques (RGS) ; 9 : pluviométrie mensuelle en mm ; 10 : température moyenne mensuelle ; 11 : température minimale moyenne ; 12 : moyenne de la surface de coupe des cellules gonadotropes de l'hypophyse ; 13 : moyenne de la surface de coupe des cellules lactotropes de l'hypophyse.

matiques, des variations structurales de l'appareil génital et de diverses caractéristiques de l'hypophyse (fig. 8).

Tout en ayant un cycle sexuel continu, les femelles de *Bufo regularis* présentent des corrélations différentes selon les critères considérés. Les variations de la taille de l'hypophyse des femelles sont indépendantes de la température, des précipitations, du rapport gonadosomatique et du nombre total de follicules. Ces variations sont par contre liées positivement à la quantité de follicules de stade III (coefficient : 0,65) et un peu plus faiblement aux surfaces des cellules lactotropes (coefficient : 0,58). Le volume des hypophyses des femelles est indépendant des autres facteurs étudiés ; en particulier les variations pluviométriques exceptionnelles de cette période de sécheresse n'ont eu aucun impact. Les surfaces des cellules gonadotropes sont indépendantes des surfaces des cellules lactotropes. Par contre elles sont corrélées positivement à la température (coefficient : 0,69) particulièrement avec les températures minima (coefficient : 0,76) et corrélées négativement aux moyennes mensuelles des follicules ovariens (coefficient : -0,71) et spécialement les follicules de stade I (coefficient : -0,67). Les surfaces des cellules augmentent avec les moyennes mensuelles des follicules ovariens (coefficient : -0,69) et avec les follicules de stade III (coefficient : 0,83). Les surfaces des cellules lactotropes sont indépendantes des autres variables y compris la pluviométrie.

Si l'on considère l'effet des variations climatiques sur l'ensemble des facteurs étudiés chez *Bufo*, il semble que le cycle sexuel subit l'influence de la température uniquement au niveau de la surface des cellules gonadotropes des femelles, qui augmente en synergie avec l'évolution de la température.

VII – CONCLUSIONS GENERALES

Au terme de cet ensemble de travaux, nous pouvons dégager quelques conclusions relatives à l'influence du climat sur certains aspects de la reproduction de *Bufo regularis* et sur la souplesse reproductive de ce dernier.

La température varie peu à Lomé. Elle ne peut donc être un facteur perturbant (ou déterminant ?) du cycle sexuel de ces animaux. Par contre, cette température par son aspect tropical est prédominante dans le caractère continu de la reproduction, lequel se rencontre fort peu dans les régions tempérées où elle joue un rôle déterminant dans les cycles discontinus ou potentiellement continus (RASTOGI, 1976 ; DELSOL *et al*, 1981 ; EXBRAYAT *et al*, 1997, 1998). On peut penser, à la suite des observations effectuées après injection d'extraits gonadotropes chez *Rana esculenta* (DELSOL *et al*, 1981), amphibien à cycle potentiellement continu, que chez les amphibiens à cycle continu, la température affecte en même temps la sécrétion de gonadotrophines et la sensibilité de l'épithélium germinale à ces hormones. Ainsi, l'action de la température serait double : sur les facteurs internes d'une part, ici l'hypophyse, et sur la sensibilité des récepteurs d'autre part.

Cette constante thermique est par contre accompagnée d'importantes variations pluviométriques allant de 0 à 277 mm de pluie par mois. La pluviométrie, par son action et ses répercussions tant sur les lieux de ponte possibles, que sur la quantité de nourriture disponible, nous a conduits à envisager une classification des animaux selon l'importance des précipitations du mois de capture. Ainsi, les observations ont été regroupées en trois classes aux climats respectivement secs (précipitations nulles), humides (précipitations inférieures ou égales à 50 mm) et pluvieux (pré-

pitations supérieures à 50 mm). Si l'étude statistique de ces échantillons nous révèle des divergences dans leurs résultats, elles seront alors le signe de l'incidence des variations pluviométriques saisonnières.

Exceptées quelques variations individuelles, les données biométriques de nos trois échantillonnages sont très homogènes. Les animaux de ces lots font ainsi partie d'une même population qui ne semble pas subir de perturbation liée aux facteurs saisonniers. Ainsi, à Lomé, l'alternance des saisons sèches et des saisons des pluies n'a pas d'influence sur les paramètres biométriques étudiés qu'ils soient relatifs à la morphologie des gonades, tant chez les mâles que les femelles. Il s'agit des masses et des longueurs du corps, de la densité, de la masse des gonades, du rapport gonado-somatique et de la masse des corps adipo-lymphoïdes. Le développement de ces derniers semblerait, dans le cadre de notre sélection, varier chez le mâle dans le même sens que la densité et chez la femelle en sens inverse du RGS, tout en restant indépendant des fluctuations pluviométriques. Il semble avoir, comme chez d'autres amphibiens à cycle continu tel que *Bufo arenarum* (PENHOS, 1952), un rôle de réserve énergétique utile mais non indispensables à la croissance de l'ovaire, suggérant ainsi la plurivalence des corps adipo-lymphoïdes. D'après SALAMI-CADOUX (1979), ces structures tamponneraient les fluctuations saisonnières de la quantité de nourriture disponible permettant ainsi un déroulement continu de la gamétogenèse.

Sur le plan biométrique, *Bufo regularis* n'a pas subi l'influence des variations climatiques au cours des captures effectuées pourtant pendant des années de déficit hydrique important. On peut en déduire que, si le métabolisme général n'est pas affecté, c'est qu'il a su s'adapter aux conditions alimentaires différentes. Il nous révèle aussi un important potentiel de tolérance écologique, ce qui rend *Bufo regularis* extrêmement résistant et explique sa large distribution en Afrique. On le rencontre en effet aussi bien dans les régions très humides de la Guinée que dans les zones arides du Sahel.

L'histologie systématique des testicules et les analyses statistiques de ces observations ont permis de constater que les variations saisonnières pluviométriques sont sans effet sur les différentes catégories cellulaires spermatogénétiques. Seuls les spermatozoïdes en faisceaux subissent une légère augmentation en saison pluvieuse, suivie d'ailleurs d'une multiplication des spermatogonies. L'entrée en division de ces dernières n'est pas fortuite ; elles semblent alors participer au maintien du stock global des cellules germinales qui reste constant tout au long de l'année. Nous avons ainsi pu préciser que, chez ces animaux maintenus à 30 °C, la spermatogenèse dure trois semaines.

La reproduction qui se fait habituellement en avril, fut peu importante cette année-là du fait des conditions climatiques particulières et se produisit en octobre au retour des pluies ; quelques accouplements ont été observés toute l'année. On peut toutefois se demander si le testicule est en activité d'une manière continue ou si, lors des périodes de reproduction, il est en quelque sorte au repos et se comporte comme un simple organe de réserve. Cette éventuelle alternance de période d'activité et de période de repos des testicules de *Bufo regularis* non visible au vu du pourcentage des différentes catégories germinales puisque leur répartition est constante en toute saison, doit s'accompagner de variations physiologiques, peut-être décelables par des études histochimiques complémentaires en particulier dans le tissu interstitiel qui doit se modifier, spécialement en période d'accouplement.

L'examen des données volumétriques des cellules du tissu interstitiel, en terme d'occupation du testicule, montre des variations *a priori* disparates et que l'on pourrait relier aux variations individuelles ou, peut-être, à la méthode des numérations ponctuelles elle-même. Cependant, l'examen des cellules du tissu interstitiel ne montre pas de variations au cours du cycle annuel. Seule l'analyse en composantes principales, a pu montrer une tendance où la variation de ce tissu est liée à la variation de la surface totale de coupes d'adénohypophyse.

Chez des *Bufo regularis* provenant de Brazzaville, nous avons pu effectuer des injections de précurseur radio-actif de l'ADN. Nos observations permettent d'affirmer qu'il existe une constante activité spermatogénétique pendant les neuf mois de la saison des pluies, au cours de laquelle les captures ont été effectuées. En effet, tous les testicules présentent des figures de méiose marquées, signes de division des cellules germinales dont la vitesse d'évolution semble un peu plus grande en fin de saison des pluies. Dans ce cas, il ne pourrait y avoir chez les mâles qu'une très hypothétique période de repos, courte, durant les trois mois de la saison sèche, dont notre matériel ne nous a pas permis l'observation. Une étude histoautoradiographique sur des sujets de Lomé nous permettrait de savoir si les *Bufo regularis* mâles, comme ceux de Brazzaville, ont un potentiel de reproduction actif et disponible pendant toute l'année. ABDELMAGUID et SABRY (1987) montrent chez ce crapaud à cycle continu que des pics de production de spermatozoïdes sont observés toutes les deux semaines.

Si, dans ces deux stations, la variabilité individuelle est importante, celle-ci est signalée par d'autres auteurs et en particulier chez *Xenopus laevis* Daudin, dont le processus spermatogénétique est également continu dans des conditions d'environnement constantes (KALT, 1976). Les résultats suggèrent que ces fluctuations individuelles, que l'on ne peut relier à aucun phénomène saisonnier, sont dues à des entrées non fortuites en division d'une partie de la population goniale, celles-ci se produisant alors par vagues successives. La variabilité s'explique alors par le temps écoulé entre les vagues successives, et également par le temps écoulé entre l'injection et l'assaut de la dernière vague. Ceci suggère que, si ces évolutions spermatogénétiques par vagues successives donnent parfois des variations importantes de la population en différenciation, elles sont elles-mêmes le signe d'une activité spermatogénétique de tout moment, c'est-à-dire typiquement continue. Ils ne sont pas les signes d'un quelconque arrêt ou ralentissement de la différenciation germinale.

A Lomé, cette apparente continuité du cycle sexuel mâle est accompagnée d'une ovogenèse continue puisqu'il y a des ovocytes prêts à être pondus toute année. Ceci est d'ailleurs confirmé par l'état quasi constant du développement des oviductes et de la présence des sécrétions servant à élaborer la gangue des œufs. Il n'y a pas pour les ovaires de *Bufo regularis* une période de croissance et une période de repos comme chez *Rana temporaria*, par exemple (amphibien à cycle discontinu). Les lieux de ponte favorables sont entièrement liés aux conditions pluviométriques dont on retrouve ici l'importance. Si celles-ci ne sont pas propices, il n'y a pas d'amplexus et les œufs entrent en atresie, ce qui semble être le cas de 50 % des animaux de notre ramassage lequel, on le rappelle, a été effectué dans les années de sécheresse importante. Seul un petit nombre de femelles a pu se reproduire normalement en avril, la majorité a attendu le retour des pluies exceptionnellement arrivées en octobre.

Les variations des cellules hypophysaires apportent des éléments à la compréhension du cycle, tant chez les mâles que les femelles. Les moyennes des surfaces de

l'hypophyse des mâles décroissent de manière générale lorsque la température augmente. Par ailleurs les surfaces des cellules gonadotropes et lactotropes varient simultanément chez les mâles et ces variations faibles paraissent influencées par la hauteur d'eau et le nombre de jours de pluie. Il apparaît donc que les cellules hypophysaires des mâles varient en fonction des conditions externes : elles augmentent faiblement pendant les périodes pluvieuses, au moment de la reproduction et elles diminuent en saison sèche, lors de la phase d'inactivité sexuelle. Le tissu interstitiel paraît également être affecté de faibles variations, avec une diminution de taille en saison pluvieuse, ce qui, pourrait être lié à l'activité sexuelle. Chez les femelles, par contre, les cellules gonadotropes augmentent de volume si la température augmente. Les cellules lactotropes ne paraissent par contre pas être liées aux conditions climatiques.

Par rapport aux espèces à cycle discontinu, les variations de la taille et du contenu des cellules hypophysaires sont bien moins marquées. Chez de nombreux anoures ou urodèles à cycles discontinus, on observe en effet la diminution drastique de certains types cellulaires au moment de la période de repos (TUCHMANN-DUPLESSIS, 1943 ; MILLER et ROBBINS, 1955 ; DIERICKX *et al*, 1960 ; ZUBER-VOGELI, 1966 ; VAN OORDT *et al*, 1968 ; RASTOGI et CHIEFFI, 1970 ; VAN OORDT, 1974). Chez les Gymnophiones *Typhlonectes compressicaudus* et *Ichthyophis beddomei* à cycles discontinus, des variations particulièrement nettes des cellules gonadotropes et lactotropes au cours du cycle annuel sont également observées (EXBRAYAT, 1989 ; MASOOD-PARVEEZ *et al*, 1994).

Plusieurs travaux ont analysé l'effet des hormones stéroïdes et hypophysaires sur la reproduction des anoures. Chez *Bufo japonicus*, il existe une augmentation des hormones stéroïdes dans le plasma des animaux en amplexus, dépendant de l'activation de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade (ITO et HISHII, 1990). L'activité cyclique de *Rana esculenta* est liée aux variations des fonctions de l'hypothalamus, de l'hypophyse et du taux de testostérone circulante (DEL RIO *et al*, 1980). Pendant la période de reproduction de ce même complexe, on observe une augmentation des taux d'hormones stéroïdes chez les mâles (LUPO *et al*, 1988). LYNCH et BLACKBURN (1995) ont montré que des implants de cyprionate de testostérone stimulait le développement des callosités des pouces de *Rana pipiens* mâle castré.

L'examen des données bibliographiques portant à la fois sur les variations morphométriques des tissus glandulaires et sur les dosages d'hormones par des méthodes sensibles permet de déceler d'étroites corrélations entre ces données.

Chez *Bufo regularis*, ces variations sont certes peu spectaculaires mais le fait qu'elles existent, même faiblement, et qu'elles soient corrélées aux conditions climatiques laisse entrevoir comment pourrait agir un des facteurs déclenchant de la reproduction qui semble bien être l'arrivée de la saison des pluies dans le cadre de la population que nous avons étudiée. SALAMI-CADOUX (1979) signale que les modalités de la reproduction sont différentes selon le biotope. Si ce dernier est sec, l'assèchement bloque la reproduction, si il est humide, une trop forte pluie modifie les lieux de ponte et empêche alors toute reproduction.

Il semble bien, par ailleurs, exister une certaine souplesse des cycles de reproduction chez les anoures. CARNEVALI *et al* (1993), par exemple, ont montré, chez *Rana esculenta*, que les cycles étaient différents en plaine et en montagne.

En conclusion, ce travail confirme la continuité du cycle sexuel de *Bufo regularis* caractérisé par des testicules remplis des différentes catégories germinales tout au

long de l'année, quelles que soient les conditions climatiques. L'examen des variations du tissu interstitiel, de la taille de l'hypophyse et des cellules gonadotropes et lactotropes de l'hypophyse, confirme également ce type de cycle puisque l'on n'observe jamais de cellules régressées comme chez les espèces à cycle discontinu. Mais il semble bien cependant que des phases d'activité puissent être mises en évidence essentiellement chez les mâles puisqu'une tendance est observée au moment où la pluviosité est accrue ou la température plus basse, c'est-à-dire pendant la période de reproduction. Il semble donc que *Bufo regularis* soit un crapaud prêt à se reproduire tout au long de l'année, selon des modalités différentes selon le sexe. La pluie, la température ou d'autres facteurs pourraient agir sur les organes endocrines des mâles qui entreraient en activité et contribueraient à la reproduction, peut-être en déclenchant l'évacuation des spermatozoïdes conjointement à la reprise de la spermatogenèse. Chez les femelles, il y aurait alors ovogenèse et vitellogenèse continues, indépendantes des conditions externes. Les preuves en sont l'indépendance des cellules hypophysaires vis-à-vis des conditions externes, la présence de follicules atrétiques laissant penser que les follicules ont une croissance continue jusqu'à un certain stade, suivie de l'ovulation ou de l'atrésie et de la présence d'ovocytes en dégradation dans les oviductes tout au long de l'année.

De nos observations effectuées sur la population de Lomé, il semble découler que, chez cet anoure, la température tropicale régulière intervient dans la potentialité du cycle continu – c'est-à-dire spermatogenèse et ovogenèse continues – et que la pluviométrie par ses variations privilégie directement les périodes de reproduction. Ces conclusions sont parfaitement comparables aux résultats déjà connus de trois autres amphibiens africains, *Phrynobatrachus calcaratus* (GUEYDAN-BACONNIER, 1980), *Ptychadena maccarthyensis* et *Ptychadena oxyrhynchus* (NEYRAND DE LEFFEMBERG et PUJOL, 1984). Tous trois présentent également, en Côte d'Ivoire, spermatogenèse et ovogenèse continues dont l'accomplissement est modelé par les précipitations et les biotopes. Si l'on trouve des *Phrynobatrachus* aptes à se reproduire pendant toute l'année, il semblerait là aussi que la pluviométrie soit le facteur déclenchant : l'arrivée des pluies ou la persistance des points d'eau favorisent des amplexus et les pontes. La saison sèche aggravée par les feux de brousse voit disparaître la majorité de la population adulte de *Phrynobatrachus*. Chez *Ptychadena maccarthyensis*, on observe deux périodes de reproduction qui correspondent aux deux saisons des pluies, cette espèce s'enfouit dans le sol en saison sèche. Chez *Ptychadena oxyrhynchus*, les amplexus sont observés un peu plus tôt, à la fin de la saison sèche. La coexistence de ces deux espèces serait favorisée par le décalage de leur période de reproduction.

Il apparaît finalement une réelle synchronisation entre les phénomènes de reproduction, d'adaptation et de survie de l'espèce par les jeux des rythmes internes, en majorité endocriniens et externes. Cette dépendance des mécanismes de reproduction ne se rencontre pas chez les vertébrés supérieurs qui ont acquis dans l'ensemble, une certaine indépendance vis-à-vis des facteurs externes.

Remerciements. – Les auteurs tiennent à remercier le Professeur Delsol grâce à qui ce travail a pu être réalisé, Mademoiselle le Dr Flatin pour sa contribution efficace, Mademoiselle Laurent pour la confection des coupes histologiques. Ils remercient également Monsieur Pujol pour l'aide apportée dans le traitement statistique des données.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABDELMAGUID N. et SABRY I., 1987. — Cyclic Spermatogenesis in the Testis of the Egyptian Toad (*Bufo regularis*). *Folio Morphologica*, n° 4, Vol.XXXV.
- ADAMS A. E., 1940. — Sexual conditions in *Triturus viridescens*. III The reproductive cycle of the adult aquatic form of both sexes. *Amer. J. Anat.*, 66 : 235-271.
- ALBANESE-CARMIGNANI M.P. and ZACCONE G., 1978. — Histochemical distribution of acid mucopolysaccharides and B-gluconidase activity (B-gluc-A) in the oviduct of *Bombina variegata pachypus* Bonaparte. *Cell and Molec. Biol.*, 23 : 1-13.
- AL-HUSSAINI A.H., 1939. — Notes on the anatomy of Egyptian toads (*Bufo regularis* Reuss and *Bufo viridis* Laur.). *Bull. Fac. Sci. Fouad I Univ. Caire*, 19 : 3-42.
- AL-HUSSAINI A.H et ROSHDY M.A., 1959. — An abnormal urino-genital system in the Egyptian toads *Bufo regularis* Reuss. *Bull. Zool. Soc. Egypt*, 14 : 54-59.
- AMER (F.I.), 1970. — Normal vitellogenesis in growing oocytes of *Bufo regularis* Reuss. *Zool. Aus. Dtsch.*, 185 (1-2) : 46-51.
- ANDREOZZI G., BOTTE V. e CHIEFFI G. 1971. — L'ovidutto di *Rana esculenta* nel corso del ciclo riproduttivo. Ricerche istologiche ed istochimiche. *Boll. Zool.*, 38 (3) : 261-272.
- BARBAULT R., 1976. — Structure et dynamique d'un peuplement d'amphibiens en savane protégée du feu (Lamto, Côte d'Ivoire). *La Terre et la Vie*, 30 : 246-263.
- BARBAULT R., CASTANET J., FRANCILLON H. et de RICQLÈS A., 1979. — Détermination de l'âge chez un anouïre déserticole *Bufo pentoni* (Anderson, 1893). *La Terre et la Vie*, 33 (1) : 129-141.
- BASU S. L., 1968. — Effects of testosterone and estrogen on spermatogenesis in *Rana hexadactyla* Lesson. *J. Exp. Zool.*, 169 : 133-139.
- BHADURI J. L., 1953. — A study of the urogenital system of Salientia. *Zool. Soc. Bengal. Calcutta*. 6 (1) : 1-75.
- BILLARD R., SOLARI A., ESCAFFRE A.M., 1974. — Méthode d'analyse quantitative de la spermatogenèse des Poissons Téléostéens. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 14 (1) : 87-104.
- BLAIR W.F., 1972. — Evidence from hybridization. in W.F. BLAIR, *Evolution in the genus Bufo*. University of Texas Press, Austin : 196-232.
- BOGART J.P., 1968. — Chromosome number difference in the amphibian genus *Bufo* : the *Bufo regularis* species group. *Evolution*, U.S.A. 22 (1) : 42-45.
- BOGART J.P., 1972. — Karyotypes. in W.F. Blair, *Evolution in the genus Bufo*. University of Texas Press, Austin : 171-195.
- BOULENGER G.A., 1980. — On the Palaearctic and Aethiopian species of *Bufo*. *Proc. Zool. Soc. London* : 545 : 74
- CARNEVALI O., MOSCONI G., SABBieti M. G., MURRI C. A., VILLANI P. and POLZONETTI-MAGNI A. M., 1993. — Some aspects of the reproductive biology of *Rana esculenta* at sea-level and montane habitats. *Amphibia-Reptilia*, 14 : 381-388.
- CEI J.M., 1973. — Geographical barriers and serological relationships in some african toads of the *Bufo regularis* complex. *Arqu. Mus. Bocage*, 4 (10) : 233-245.
- CEI J.M., ERSPAMER V. and RASEGHINI M., 1972. — Biogenic amines. in W.F. BLAIR, *Evolution in the genus Bufo*. University of Texas Press, Austin : 233-243.
- CHAMPY C., 1913. — Recherches sur la spermatogenèse des batraciens et les éléments accessoires du testicule. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 52 : 13-304.
- CLOUDSEY-THOMPSON J.- L., 1967. — Diurnal rythm, temperature and water relations of the African toad, *Bufo regularis*. *J. Zool. London*, 152 : 43 - 54.
- DEL RIO G., CITARELLA F. and D'ISTRIA M., 1980. - Androgen recptor in the thumb pad of *Rana esculenta* : dynamic aspects. *J. Endocrinol.*, 85 : 279-282.
- DELSOL M., BLOND-FAYOLLE C. et FLATIN J., 1995. — Appareil génital mâle, anatomie, histologie, déterminisme du cycle sexuel. in GRASSÉ P.-P. et DELSOL M., *Traité de Zoologie*, tome XIV, fasc. 1-A., Edit., Masson, Paris : 1187-1229.
- 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., 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.
- DIERICKX K., VAN DER ABBEELE A. et RYSENAER M., 1960. — Phénomènes d'activité cyclique dans le système hypothalamo-hypophysaire de *Rana temporaria*. Données nouvelles. *Arch. Anat. Microsc. Morph. exp.* : 49 : 73-88.
- 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.
- DUMONT J.-N., 1972. — Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) : I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.*, 136 : 153-180.
- EXBRAYAT J.-M., 1986a. - Quelques aspects de la biologie de la reproduction de *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron, 1841), amphibien apode. Thèse Doct. Etat ès Sci. nat., Univ. Paris VI : 308 p.
- EXBRAYAT J.-M., 1986b. - Le testicule de *Typhlonectes compressicaudus* : 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 compressicaudus* (Duméril and Bibron, 1841), Amphibian Gymnophiona, during the cycles of seasonal activity. I- In adult males. *Biol. Struct. Morph.*, 2 (4) : 117-213.
- 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 EXBRAYAT J.-M. et FLATIN J., *L'évolution biologique, science, histoire ou philosophie ?*, 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 (2) : 113-124.
- EXBRAYAT J.-M. et SENTIS P., 1982. — Homogénéité du testicule et cycle annuel chez *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron, 1841), amphibien apode vivipare. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 294 : 757-762
- FLOWER S. S., 1933. — Notes on the recent reptiles and amphibians of Egypt, with a list of the species recorded from that kingdom. *Proc. Zool. Soc. London* : 735-851.
- GABE M., 1968. — *Techniques histologiques*, Masson édit., 1113 p.
- GALGANO M., 1952. — Saggio di classificazione delle varie modalita di svolgimento della spermatogenesi negli Anfibi. *Archiv. Zool. Ital.*, 37 : 193-230.
- GEOFFROY SAINT HILAIRE E. et GEOFFROY SAINT HILAIRE I., 1809. — Description des Reptiles qui se trouvent en Egypte. In : Description de l'Egypte, Histoire Naturelle, I, 1^{ère} partie : 115-160.
- GIROD C., 1983. — *Immunocytochemistry of the vertebrate adenohypophysis*, In : Handbuch der Histochemie Graumann W., Neumann, K. (Edits). vol. VIII, supplt, Springer Verlag, part 5 : 536 p.
- GUIBE J. et LAMOTTE M., 1958. — La réserve naturelle intégrale du Mont Nimba. XI : Batraciens. *Mém. I.F.A.N., Sénégal*, 53 : 241-273.
- 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, 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., DELSOL M. et FLATIN J., 1984b. — Etude comparative du dynamisme de la spermatogenèse chez trois batraciens tropicaux par autohistoradiographie. *Ann. Sci. Nat., Zool., 13^e Sér.*, 6 : 191-196.
- GUTTMAN S. I., 1967. — Transferrin and hemoglobin polymorphism, hybridization and introgression in two African toads, *Bufo regularis* and *Bufo rangeri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 23 : 871-877.
- GUTTMAN S. I., 1972. — Blood proteins In BLAIR W.F., *Evolution in the genus Bufo*. Univ. Kansas Press Austin : 265-278.
- HULSELMANS J.L.J., 1970. — Preliminary notes on African Bufonidae. *Rev. Zool. Bot. Afr.*, 81 (1-2) : 149-155.
- INGER R.F., 1968. — Exploration du Parc National de la Garamba, *Mission H. De Saeger. Inst. Parcs Nat. Rép. Dém. Congo*, 52 : 1-190.
- Bull. mens. Soc. linn. Lyon*, 2002, 71 (1).

- ITOH M. and ISHII, S. (1990). — Changes in plasma levels of gonadotropins and sex steroids in the toad *Bufo japonicus*, in association with behaviour during the breeding season. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 80 : 451-464.
- JOLY J., 1971. — Les cycles sexuels de *Salamandra salamandra* L. I - Cycle sexuel des mâles. *Ann. Sci. Nat., Zool. Biol. Anim.*, 12^e sér., 13 (3) : 451-504.
- KALT M., 1976. — Morphology and kinetics of spermatogenesis in *Xenopus laevis*. *J. exp. zool.*, 195 : 393-408.
- LAGARDE J., 1995. — *Initiation à l'analyse des données*. Dunod'Edit. 163 p.
- LAMOTTE M., 1966. — Type de répartition géographique de quelques batraciens dans l'Ouest africain. *Bull. I.F.A.N.*, 28, A (3) : 1140-1148.
- LAMOTTE M., 1971. — *Initiation aux méthodes statistiques en biologie*. Masson, Paris, 144 p.
- LAMOTTE M. et ZUBER-VOGELLI M., 1954. — Contribution à l'étude des batraciens de l'Ouest Africain. II. Le développement larvaire de *Bufo regularis* Reuss, de *Rana occipitalis* Gunther et de *Rana crassipes* (Buch. et Peters). *Bull. I.F.A.N.*, 16 (3) : 940-954.
- LAMOUREUX M., 1969. — *Note explicative n° 34. Carte pédologique du Togo au 1/1.000.000°*. ORSTOM Lomé, 91 P.
- LAURENT R.F., 1972. — amphibiens. In *Exploration du Parc National des Virunga*, 2^e sér., 22 : 1-125.
- LEE P. A., 1965. — Histological and histochemical analysis of the annual cycle of growth and secretion in the oviduct of *Rana pipiens*. Dissert. Abstract, U.S.A., 6 (5) : 2392.
- LEE P. A., 1969. — Histology of the oviduct of the leopard frog *Rana pipiens*. *Anat. Rec.*, 165 (4) : 493-501.
- LEGAY J. M. et TOMASSONE R. 1978. — *Biométrie et écologie*. Soc. Fr. Biom. INRA Départ. Biom. Ed. 1 : 387 p.
- LE QUANG TRONG Y., 1973. — Structure et développement de la peau et des glandes cutanées de *Bufo regularis* Reuss. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 98 (4) : 449-487.
- LOFTS B., 1974. — Reproduction. In LOFTS B., *Physiology of the Amphibia*, Academic Press, 2 : 107-218.
- LOVERIDGE A., 1957. — Check list of the Reptiles and Amphibians of East-Africa (Uganda, Kenya, Tanganyika and Zanzibar). *Bull. Mus. comp. Zool. Harvard Univ.*, 117 : 153-362.
- LOW B. S., 1968. — Venom polymorphism in *Bufo regularis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 26 : 247-257.
- LOW B. S., 1972. — Evidence from parotid-gland secretions. in BLAIR W.F., *Evolution in the genus Bufo*, University of Texas Press, Austin : 244-264.
- LUPO C., ZERANI M., CARNEVALI O., GOBETTI A. and POLZONETTI-MAGNI A.M., 1988. — Testosterone binding protein in the encephalon and plasma sex hormones during the annual cycle in *Rana esculenta* complex (Amphibia Ranidae). *Mon. Zool. Ital.*, 22 : 133-144.
- LYNCH L. C. and BLACKDURN D. G., 1995. — Effects of testosterone administration and gonadectomy on nuptial pad morphology in overwintering male leopard frogs, *Rana pipiens*. *Amphibia-Reptilia*, 16 : 113-121.
- MARTIN R. F., 1972. — Evidence from osteology. in BLAIR W.F., *Evolution in the genus Bufo*, University of Texas Press, Austin : 37-70.
- MASOOD-PARVEEZ U., BHATTA G. K. and NADKARNI V.B., 1994. — The pituitary gland of the oviparous Caecilian, *Ichthyophis beddomei*. *J. Herp.*, 28 : 238-241.
- MENZIES J.I., 1963. — The climate of Bo, Sierra Leone, and the breeding behaviour of the toad *Bufo regularis*. *J. W. Afr. Sci. Ass.*, 8 : 60-73.
- MILLER M. R. and ROBBINS M. E., 1955. — Cyclic changes in the pituitary gland of the Urodele Amphibian *Taricha torosa* (*Triturus torosus*) ; *Anat. Rec.*, 122 : 105-114.
- 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 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.
- NEYRAND DE LEFFEMBERG F., PUJOL, P., 1984. — Etude comparative des cycles de reproduction de trois anoures africains : *Bufo regularis*, *Ptychadena maccarthysensis* et *Ptychadena oxyrhynchus*. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 32 : 36-40.
- OORDT (VAN) P.G.W.J., 1956. — *Regulation of the spermatic cycle in the common frog Rana temporaria*. Thesis Utrecht. G.W. Van der Wiel and C°. Arnheim : 1-116.
- OORDT (VAN) P.G.W.J., 1974. — Cytology of the adenohypophysis. In LOFTS B., *Physiology of the Amphibia*, Academic Press, 2 : 53-106.
- OORDT (VAN) P.G.W.J., van DONGEN W. J. and LOFTS B., 1968. — Seasonal changes in endocrine organs of the male common frog *Rana temporaria*. I - The pars distalis of the adenohypophysis. *Z. Zellforsch.*, 88 : 549-559.
- PARKER H.W., 1936. — The Amphibians of the Mamfe Division, Cameroons - I. Zoogeography and Systematics. - *Proc. Zool. Soc. London* : 135-164.
- PENHOS J.-C., 1952. — Rôle des corps adipeux du *Bufo arenarum* Hensel. *C.R. Soc. Biol.*, 147 : 1095-1096.
- PERRET J.-L., 1966. — Les amphibiens du Cameroun. *Zool. Jb. Syst.*, 8 : 289-464.
- PONSE K., 1949. — La différenciation du sexe et l'intersexualité chez les Vertébrés. Masson éd. Paris, 336 p.
- POYTON J.-C., 1964. — The amphibian of Southern Africa : a faunal study. *Ann. Natal. Mus.*, 17 : 1-134.
- PUJOL P., 1985. — Quelques aspects de la reproduction du crapaud *Bufo regularis* Reuss, 1834. Diplôme de l'E.P.H.E., 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., 1987. — Observations préliminaires sur la structure et les sécrétions mucipares de l'oviducte de *Bufo regularis* (Reuss, 1834). amphibien anoure tropical. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 44 : 8-15.
- PUJOL P. et EXBRAYAT J.-M., 1993. — Oviductes et cycle sexuel continu chez *Bufo regularis* Reuss (1834) amphibien anoure tropical. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 118 (3) : 361.
- 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.*, 80 : 27-37.
- 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 : 53-66.
- RASTOGI R. K., 1976. — Seasonal cycle in anuran (Amphibia) testis : the endocrine and environmental controls. *Bull. Zool.*, 43 : 151-172
- RASTOGI R. K. and CHIEFFI G., 1970. — Cytological changes in the pars distalis of pituitary of the green frog *Rana esculenta* L. during the reproductive cycle. *Z. Zellforsch.*, 111 : 505-518.
- SALAMI-CADOUX M.-L., 1979. — *Cycles et épidémiologie de Polystomatidae parasites de l'amphibien Bufo regularis* au Togo. Doct. ès Sci. nat., Univ. Perpignan, 394 p.
- SANDERSON I.T., 1936. — The Amphibians of the Mamfe Division, Cameroons. II. Ecology of the frogs. *Proc. Zool. London*, 165-208.
- SCHIOTZ A., 1969. — The Amphibians of West Africa : a Review. *Niger. Field*, 34 : 4-17.
- SEADRA S.N. and MICHAEL M. I., 1961. — Normal Table of the Egyptian Toad, *Bufo regularis* Reuss, with an Addendum on the Standardisation of the stages considered in previous publications. *Morphologie Ceskosl.*, 9 (4) : 331-351.
- SEETZEN U. J., 1855. — *Reisen durch Syrien, Palestinz, Phönicien, die Transjordan-Länder, Arabia Petraea und Unter-Aegypten*, Berlin, 3 vol.
- SHIVERS A. and JAMES J.M., 1970. — Morphology and histochemistry of the oviduct and egg-jelly layers in the frog *Rana pipiens*. *Anat. Rec.*, 166 (3) : 541-555.
- 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.
- STORTECCI G., 1936. — Gli anfibi della Tripolitania. *Atti Soc. ital. Sci.nat., Milano*, 75 : 129-226.
- Bull. mens. Soc. linn. Lyon*, 2002, 71 (1).

- TANDY M. and KEITH R., 1972. — *Bufo of Africa*. in BLAIR W.F., *Evolution in the genus Bufo*. University of Texas Press, Austin : 119-170.
- TAYLOR A. C. and KOLLROSS J. J., 1946. — Stage in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat. Rec.*, 94 : 7-23.
- THIREAU et MAROLLE E., 1968. — Morphologie externe et interne du crapaud africain *Bufo regularis* Reuss 1834. *Publ. Univ. Abidjan*, 75 p.
- TUCHMANN-DUPLESSIS H., 1943. — Variations saisonnières de la structure de l'hypophyse du triton palmé. *C. R. Soc. Biol., Paris*, 136 : 30-31.
- VAN GANSEN P. 1985. — *Ovogenèse des amphibiens*. in GRASSÉ P.-P. et DELSOL M., *Traité de Zoologie*, tome XIV, fasc. 1-A., Edit., Masson, Paris : 21-55.
- VAN OODT P.G.W.J., 1956. — Régulation of the spermatic cycle in the common frog *Rana temporaria*. Thesis Utrecht. G.W. Vander Wiel and C°. Arnheim, 1-116.
- WAKE M. H., 1968. — Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. Part I : the gonads and fat bodies. *J. Morph.*, 126 : 291-332.
- WEBB G. C., 1958. — The common african toad *Bufo regularis*. *Ibadan Univ. Press*, 13-55.
- WINSTON R.M., 1955. — Identification and ecology of the toad *Bufo regularis*. *Copeia*, 4 : 293-302.
- WITSCHI E., 1924. — Die Entwicklung der keimzellen der *Rana temporaria* L. I. Urkeimzellen und Spermatogenese. *Zeit. J. Zellen Gewel. Abt. B*, 1 : 523.
- WITTECK M. 1952. — La vitellogenèse chez les amphibiens. *Arch. Biol.*, 63 : 134-198.
- ZUBER-VOGELLI 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.