

ETUDE HISTOLOGIQUE DES OVAIRES D'UN AMPHIBIEN GYMNOPHIONE *BOULENGERULA BOULENGERI* PENDANT LA PERIODE DE REPRODUCTION

*SERCLERAT Hanen¹, MEASEY John², EXBRAYAT J.-Marie¹, CHEVALIER Christine¹
*hserclerat@univ-catholyon.fr

1 Université de Lyon, UMRS 449, 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, F-69288 LYON Cedex 2,
2 Biology Department, University of Western Cape, Private Bag X17 Bellville 7535, South Africa

RESUME

Durant le cycle sexuel de la femelle de *Boulengerula boulengeri*, les études histologiques ont permis de décrire l'évolution ovarienne et les différenciations folliculaires, ainsi que l'identification des cinq stades de la folliculogénèse (nids germinatifs, follicules prévitellogéniques, follicules vitellogéniques, follicules atrétiques et corps jaunes). La croissance ovocytaire est caractérisée par l'évolution de la thèque, de la granulosa et des zones pellucides.

INTRODUCTION

Les Gymnophiones, amphibiens également connus sous le nom d'Apodes, vivent dans des milieux équatoriaux ou tropicaux d'une manière fousseuse. D'après les descriptions de (1, 2, 3, 4), les Gymnophiones sont caractérisés par la présence d'une

paire de tentacules sensoriels, placée entre l'œil et la narine et de deux yeux réduits, recouverte par une peau ou une membrane osseuse. Leur corps est allongé, annelé et, chez certains groupes, couvert d'écailles. Ce sont des animaux serpentiformes. Ils sont dépourvus de membres et de ceintures. Leurs formes sont diverses, leur taille varie d'une espèce à l'autre (5, 6).

Boulengerula boulengeri est une espèce de Gymnophione qui vit essentiellement dans les zones montagneuses, pré-montagneuses et les vallées de Tanzanie, Kenya, Rwanda et Malawi (7, 8, 9 et 10).

Cette espèce est caractérisée par l'allongement de tous ses organes. Les reins situés entre le foie et le cloaque, sont étroits, le tube digestif est rectiligne et à peine plus long que le corps de l'animal, le foie est plurilobé. L'appareil génital femelle comporte

deux ovaires et deux oviductes, parallèles aux reins, dont les extrémités antérieures se trouvent au niveau du cœur et s'ouvrent par un ostium, alors que leur extrémité postérieure pénètre dans le cloaque (1, 11).

Cette espèce est difficile à capturer du fait de sa vie fousseuse et probablement en raison de ses habitudes souterraines, ce qui explique que son mode de reproduction ne soit pas encore connu (12).

Pour décrire l'évolution ovarienne et les différenciations folliculaires de la femelle de cette espèce, des études histologiques ont été réalisées en utilisant, en particulier, la coloration à l'azan modifié, particulièrement adaptée à l'étude des gonades femelles (13, 14).

MATERIELS ET METHODES

Matériel biologique

Vingt six femelles de *Boulengerula boulengeri* ont été capturées par le Dr. John Measey, chaque mois, de décembre 2002 à novembre 2003, dans les forêts de la réserve Kwomkoro à l'est de la Tanzanie. Les prélèvements biologiques, sur des animaux anesthésiés par le Tricaine Méthanesulfonate (MS 222), ont été effectués dans les 4 heures suivant la capture, puis fixés dans le formol à 10 % et conservés dans l'alcool à 70°. Les ovaires des femelles ont été inclus dans une gélose à 1,3 % puis dans la paraffine. Ils ont été coupés longitudinalement au microtome de Minot (coupes de 5 µm). Les coupes ont ensuite été collées sur des lames «Super Frost plus».

Analyses histologiques

Les coupes d'ovaires déparaffinées et hydratées sont plongées dans des bacs conte-

nant 10 lames afin d'être successivement colorés au rouge nucléaire (0,1 %) pendant 15 min, puis à l'orange G molybdique (2 %) pendant 5 min et au bleu d'aniline (0,5 %) pendant 3 min.

Ensuite, les lames colorées sont déshydratées dans l'éthanol à 96° pendant 5 min, dans l'éthanol à 100° pendant 7 min, dans le butanol pendant 5 min et dans le cyclohexane pendant 10 min.

Pour protéger les coupes colorées et permettre une meilleure observation, un montage est réalisé en fixant une lamelle (Menzel Glaser) sur la coupe par une goutte de résine (EUKITT «O. Kindler GmbH») en évitant les bulles d'air. Une fois montées, les lames peuvent être conservées indéfiniment.

Les coupes ont été observées au microscope photonique aux objectifs 40, 100, 400 et 1000.

RESULTATS

La coloration à L'azan de Romeis modifié a permis de distinguer le tissu conjonctif, les cellules de granulosa et les nucléoles acidophiles et de caractériser les différents compartiments de l'ovaire.

Les différents stades folliculaires

L'observation des ovaires de *Boulengerula boulengeri*, pendant la période de reproduction a permis de décrire les différents compartiments de l'ovaire ainsi que l'évolution des follicules ovariens.

Follicules ovariens :

L'étude histologique a permis d'observer la présence de deux couches folliculaires entourant l'ovocyte. Une couche externe, de nature conjonctive, colorée en bleu tur-

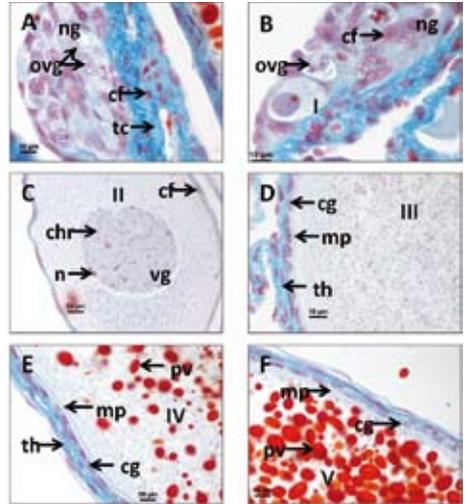
quoise à l'azan modifié, constitue la thèque externe. Elle contient des cellules aplaties, allongées avec des noyaux colorés en rouges, constituant la thèque.

Une couche interne correspondant à la granulosa, renferme des cellules épithéliales de forme variée, aplatie ou cubique selon les stades de maturations. Ces cellules contiennent des noyaux colorés en rouge à l'azan modifié. Ces couches folliculaires sont parfois traversées de vaisseaux sanguins.

L'ovocyte est caractérisé par un cytoplasme à structure et à composition variables, avec un noyau de taille et d'aspect différents en fonction des stades de maturation. L'évolution des follicules a été divisée en stade I correspondant aux nids germinatifs, stades II et III correspondant aux follicules prévitellogéniques, stades IV et V, ou follicules vitellogéniques, follicules atrétiques et corps jaunes. Pour chaque stade spécifique de cette espèce, une correspondance a été donnée avec la classification des stades de développement des follicules ovariens chez les Gymnophiones (stades A à F) proposée par Exbrayat (15).

Stade I (stade A): Nids germinatifs

Ils sont composés du tissu conjonctif coloré en turquoise à l'azan modifié contenant des cellules folliculaires de taille variable au cytoplasme acidophile et des vaisseaux sanguins. Ils comportent des ovogonies. Les nids germinatifs sont situés en périphérie des follicules à différents stades d'évolution (Figures 1a A et B).



Figures 1a : Observations histologiques des différents stades folliculaires dans un ovaire de *Bouleengerula boulengeri*. Coloration azan de Romés modifié.

A : Nid germinatif. **B :** Nid germinatif contenant un follicule primaire. **C :** follicule au stade II (prévitellogénique). **D :** Follicule au stade III (prévitellogénique). **E :** follicule au stade IV (vitellogénique). **F :** follicule au stade V (vitellogénique).

cf = cellules folliculaires ; chr = chromatine ; cg = cellule de la granulosa ; mp = membrane pellucide ; n = nucléole ; ng = nid germinatif ; ovg = ovogonies ; pv = plaquettes vitellines ; tc = tissu conjonctif ; th = thèque ; vg = vésicule germinative. **Echelle :** 10 µm

Stade II et III : Follicules prévitellogéniques

Stade II (stade B) : Ce sont des follicules en cours de croissance issus des ovogonies. Ce sont des follicules primaires de forme irrégulière. Les ovocytes primaires peuvent être nus ou entourés d'une petite couche de cellules folliculaires aplaties. Ils possèdent un gros noyau central ou une vésicule germinative ayant plusieurs nucléoles acidophiles et des chromatines.

Stade III (stade C) : Ce troisième stade est caractérisé par l'épaississement de couches folliculaires, l'apparition des plaquettes vitellines, de la zone pellucide et des granules corticaux et par la différenciation des cellules de la granulosa en cellules plus jointives (Figures 1a C et D).

Stade IV et V : Follicules vitellogéniques (stade D)

Stade IV: Pendant ce stade, l'ovocyte est volumineux, son cytoplasme est rempli de nombreuses plaquettes vitellines de différentes tailles colorées en orange à l'azan modifié.

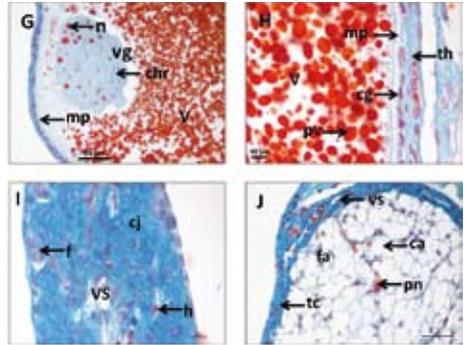
Trois couches sont observées dans la zone pellucide.

Stade V : Il est difficile de différencier les follicules aux stades V de IV. Les follicules au stade V sont des gros follicules mûrs et sphériques, caractérisés par un noyau excentré, des plaquettes vitellines envahissant l'ovocyte et l'apparition des plaquettes vitellines.

(Figures 1a E, F et 1b G, H).

Follicules atrétiques et corps jaunes Corps jaunes (stade F)

Ce sont des follicules dont l'ovocyte a été pondu. Ils sont caractérisés par la réduction progressive de la taille du follicule, la prolifération des cellules de la granulosa et l'apparition de cellules lutéales (Figure 1b I).



Figures 1b : Observations histologiques des différents stades folliculaires dans un ovaire de *Boulengerula boulengeri*. Coloration azan de Roméis modifié

A : follicule au stade V (vitellogénique) avec une vésicule germinative excentrée. **B :** follicule au stade V (vitellogénique). **C :** corps jaune. **D :** follicule atrétique.

Ca = cellules adipocytiques ; chr = chromatine ; cg = cellule de la granulosa ; cj = corps jaune ; f = fibroblaste ; fa = follicule atrétique ; h = hématie ; mp = membrane pellucide ; n = nucléole ; pn = polynucléaire ; vg = vésicule germinative ; vs = vaisseau sanguin.

Echelle : 10 µm et 50 µm.

Follicules atrétiques (stade E)

Ce sont des follicules issus de la dégénérescence des ovocytes non ovulés. Ils sont caractérisés par la prolifération des cellules folliculaires vers le centre et la présence de cellules d'aspect phagocytaire ou adipocytaire (Figure 1b J).

CONCLUSION

Pour la première fois, la structure ovarienne a été décrite chez le Gymnophione *Boulengerula boulengeri*. L'étude histologique a ainsi permis de caractériser les différentes structures des follicules ovariens depuis le nid germinatif jusqu'au corps jaune ou l'atrésie folliculaire, en notant les changements cytologiques au cours des différents stades de la folliculogénèse. Chez les Gymnophiones, la présence de corps jaunes consécutive à l'évolution des follicules après ovulation, est observée chez les espèces ovipares (*Boulengerula boulengeri*, le présent travail, et *Boulengerula taitanus* (4) et vivipares (*Typhlonectes compressicauda*) (5). Ce travail entre dans le cadre d'une étude approfondie

des appareils reproducteurs de *Boulengerula boulengeri* et de la connaissance des cycles de reproduction de cette espèce en lien avec les facteurs environnementaux. L'étude des variations histologiques des organes reproducteurs mises en rapport avec les variations des facteurs climatiques (température, pluie) représente une méthode de choix pour apprécier les facteurs déclenchant la reproduction (6, 11). C'est ainsi que dans de précédents travaux, il a été montré que chez l'espèce vivipare sud-américaine *Typhlonectes compressicauda*, la reproduction était soumise à la pluviosité et que chez l'espèce ovipare africaine *Boulengerula taitanus*, les cycles de reproduction semblaient liés aux variations de température (4).

BIBLIOGRAPHIE

1. TAYLOR, EH. The caecilian of the world: a Taxonomic Review. University of Kansas Press, Lawrence. 1968, 334-343.
2. HRAOUI-BLOQUET, S. Nutrition embryonnaire et relations materno-fœtales chez *Typhonectes compressicaudus* (Dumeril et Bibron, 1841) Amphibien Gymnophione vivipare. Thèse de doctorat EPHE. 1995, 216 pp.
3. EXBRAYAT, J.M. et ESTABEL, J. Anatomy with particular reference to the reproductive system. In EXBRAYAT, J.-M. (Ed). Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona (Caecilians), Science Publishers, Enfield (NH), Jersey, Plymouth. 2006, 79- 155.
4. RAQUET, M. Modalités de la reproduction chez les femelles de *Boulengerula taitanus*, Amphibien Gymnophione. Dipl. EPHE, Lyon. 2008. 129 pp.
5. EXBRAYAT, J.M. Quelques aspects de la biologie de la reproduction chez *Typhonectes compressicaudus* (Dumeril et Bibron, 1841), Amphibien Gymnophione. *Cahiers Univ. Cath. Lyon, sér. Sci.* 1993, 7. 263 pp.
6. EXBRAYAT, J.M. Les Gymnophiones, ces curieux Amphibiens. Boubée Ed, Paris. 2000a, 443 pp.
7. NUSSBAUM, R. A et HINKEL, H. Revision of East African Caecilians of Genera *Afrocaecilia* Taylor and *Boulengerula* Tornier (Amphibia: Gymnophiona: Caeciliidae). *Copeia*. 1994, 3: 750-760.
8. GOWER, D. J; LOADER, S. P; MONCRIEFF, C. B et WILKINSON, M. Niche separation and comparative abundance of *Boulengerula boulengeri* and *Scolecormorphus vittatus* (Amphibia: Gymnophiona) in an East Usambara forest, Tanzania. *African Journal of Herpetology*. 2004, **53** (2):183-190.
9. MEASEY, GJ. Are Caecilians Rare? An East African Perspective. *Journal of East African Natural History*. 2004, **93**: 1-21.
10. HARPER, E. B.; MEASEY, G. J.; PATRICK, D. A.; MENEGON, M. et VONESH, J. R. Caeciliidae *Boulengerula boulengeri* (Tornier, 1896) Usambara bluish-gray caecilian. Field Guide to Amphibians of the Eastern Arc Mountains and Coastal Forests of Tanzania and Kenya. 2010, 320 pp.
11. EXBRAYAT, J. M. Appareils génitaux et reproduction chez les amphibiens Gymnophiones. *Bull. Soc. Zool. Fr* 1992, **117** (3) : 291- 296.

12. DELETRE M. et. MEASEY G.J. Sexual selection vs ecological causation in a sexually dimorphic caecilian, *Schistometopum thomense* (Amphibia Gymnophiona Caeciliidae). *Ethology Ecology & Evolution*. 2004, **16** : 243-253.
13. EXBRAYAT, JM. Méthodes classiques de visualisation du génome en microscopie photonique, Tec & Doc Ed. Paris, 2000b. 182 pp.
14. CHEVALIER, C. Etude histologique du développement sexuel de l'apron du Rhône *Zingel asper*. L., percidé endémique menacé d'extinction. Thèse de Doctorat EPHE, 2007. Lyon. 210 pp.
15. EXBRAYAT, J.M. Oogenesis and folliculogenesis. *In* EXBRAYAT, J.-M. (Ed). Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona (Caecilians), Science Publishers, Enfield (NH), Jersey, Plymouth. 2006, 275-290.