

Bulletin de la Société Herpétologique de France

1^{er} trimestre 1991

n° 57



ISSN 0754-9962

Bull. Soc. Herp. Fr., (1991) 57

Bulletin de la Société Herpétologique de France

Responsable de la rédaction / **Editor** : **Roland VERNET**
Responsables associés / **Associate editors** : Claude PIEAU, Michel LEMIRE
Responsable index / **Index editor** : Jeff TIMMEL, Sophie BERLAND
Directeur de la publication / **Director of publication** : **Robert GUYÉTANT**

Comité de rédaction et comité de lecture / **Editorial Board**

R. BARBAULT (Paris), L. BODSON (Liège, Belgique), M.H. CAETANO (Lisbonne, Portugal), J. DURAND (Paris), J.-M. FRANCAZ (Orléans), M. GOYFFON (Grenoble), R. GUYÉTANT (Besançon), D. HEUCLIN (Cohé-Vérac), B. LANZA (Florence, Italie), M. LEMIRE (Paris), J. LESCURE (Paris), J.P. MARTINEZ-RICA (Jaca, Espagne), C. PIEAU (Paris), A. de RICQLES (Paris), J.-C. RAGE (Paris), R. VERNET (Paris).

Instructions aux auteurs / **Instructions to authors**

Des instructions détaillées ont été publiées dans le numéro 33. Les auteurs peuvent s'y reporter. S'ils ne les possèdent pas, ils peuvent en obtenir une copie auprès du responsable du comité de rédaction. Les points principaux peuvent être résumés ainsi :

Les manuscrits, dactylographiés en double interligne, au recto seulement sont envoyés en double exemplaire. La disposition du texte doit respecter les instructions. L'adresse de l'auteur se place en dernière page. Les figures sont réalisées sur papier calque ou bristol. Les photographies (noir et blanc) ne sont publiées qu'exceptionnellement. Les légendes des figures sont dactylographiées sur feuilles séparées. Les références bibliographiques sont regroupées en fin d'article.

Exemple de présentation et référence bibliographique :

BONS, J., CHEYLAN, M. et GUILLAUME, C.P. (1984) — Les Reptiles méditerranéens. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 29: 7-17.

Tirés à part

Les tirés à part (payants) ne sont fournis qu'à la demande des auteurs (lors du renvoi de leurs épreuves corrigées) et seront facturés par le service d'imprimerie.

La rédaction n'est pas responsable des textes et illustrations publiés qui engagent la seule responsabilité des auteurs. Les indications de tous ordres, données dans les pages rédactionnelles, sont sans but publicitaire et sans engagement.

La reproduction de quelque manière que ce soit même partielle, des textes, dessins et photographies publiés dans le Bulletin de la Société Herpétologique de France est interdite sans l'accord écrit du directeur de la publication. La S.H.F. se réserve la reproduction et la traduction ainsi que tous les droits y afférant, pour le monde entier. Sauf accord préalable, les documents ne sont pas retournés.

ENVOI DES MANUSCRITS à :

M. Roland VERNET

Laboratoire d'Ecologie, Ecole Normale Supérieure

46 rue d'Ulm - 75230 PARIS CEDEX 05

Télécopie (Fax) : (1) 43298172

Télex : 202601 F ENULM

Le Gérant: R. GUYÉTANT
N° de Commission paritaire: 59374
Imprimerie commune
de l'Université de Franche-Comté
25030 BESANÇON - CEDEX
Dépôt légal: 1^{er} trimestre 1991

Bulletin de la Société Herpétologique de France

1^{er} trimestre 1991

n° 57

SOMMAIRE RENCONTRES HERPÉTOLOGIQUES D'AMIENS (28-30 Juin 1990)

- **Venins de serpents et serums antivenimeux**
Cassian BON..... 1
- **Influence de la température d'élevage sur la différenciation sexuelle chez les Amphibiens**
Christian DOURNON, Danièle DURAND, Christiane DEMASSIEUX, Alain BAUTZ et Guy GODBILLON..... 19
- **Influence de la température sur la cinétique de la spermatogenèse chez *Rana esculenta* et *Rana lessonae*, en juillet**
Florence NEYRAND de LEFFEMBERG et Jean-Marie EXBRAYAT..... 31
- **Remise en cause de la bande latérale comme critère absolu de distinction entre la Rainette verte, *Hyla a. arborea* et la Rainette méridionale, *Hyla meridionalis* (Anura : Hylidae)**
Hugues PINSTON et Emmanuelle CRANEY..... 41
- **Morphologie de l'épithélium branchial des embryons de *Typhlonectes compressicaudus* (Amphibien Gymnophione) étudié en microscopie électronique à balayage**
Jean-Marie EXBRAYAT et Souad HRAOUI-BLOQUET..... 45
- **Anomalies et régénération des membres chez *Triturus marmoratus* (Latreille, 1800)**
Maria Helena CAETANO..... 53
- **Notes. Vie de la Société. Informations..... 59**

CONTENTS ANNUAL MEETING OF THE FRENCH HERPETOLOGICAL SOCIETY (AMIENS, June 28-30, 1990)

- **Snake venoms and antivenom serum**
Cassian BON..... 1
- **Influence of the rearing temperature on the sexual differentiation in Amphibians**
Christian DOURNON, Danièle DURAND, Christiane DEMASSIEUX, Alain BAUTZ and Guy GODBILLON..... 19

• Effects of temperature on the spermatogenesis kinesis in <i>Rana esculenta</i> and <i>Rana lessonae</i>, in July Florence NEYRAND de LEFFEMBERG and Jean-Marie EXBRAYAT.....	31
• Question on lateral stripe as absolute distinction feature between the Common tree frog <i>Hyla a. arborea</i> and the Stripeless tree frog, <i>Hyla meridionalis</i> (Anura : Hylidae) Hugues PINSTON and Emmanuelle CRANEY.....	41
• Morphology of gill epithelium in <i>Typhlonectes compressicaudus</i> embryos (Amphibia, Gymnophiona), by mean of Scanning Electron Microscopy Jean-Marie EXBRAYAT and Souad HRAOUI-BLOQUET.....	45
• Anomalies and limbs regeneration in <i>Triturus marmoratus</i> (Latreille, 1800) Maria Helena CAETANO.....	53
• Notes. News from the Society. Informations.....	59

VENINS DE SERPENTS ET SERUMS ANTIVENIMEUX

par

Cassian BON

Résumé — Les venins de serpents sont constitués pour l'essentiel de protéines qui combinent leur action en fonction de leur nature et de leur taux. On distingue : les toxines responsables de l'action létale du venin, des substances douées d'actions biologiques parfois importantes mais non létales par elles-mêmes. Les venins de serpents sont également riches en enzymes, notamment en enzymes hydrolytiques, qui jouent un rôle important dans la digestion des proies.

Les sérums antivenimeux, et en particulier les sérums polyvalents dirigés contre l'ensemble des serpents venimeux d'une région donnée, sont généralement préparés par hyper-immunisation de chevaux avec un mélange de venins. Afin de réduire l'antigénicité du sérum, les immunoglobulines sont purifiées et converties en fragments (Fab)₂ par un traitement à la pepsine.

Mots-clés : Venin, serpent, toxine, enzyme, sérum antivenimeux, immunoglobuline.

Summary — Snake venoms are complex mixtures of proteins which combine their actions according to their relative proportions and of their intrinsic properties. The snake venoms contain toxins which are responsible for their lethal potency as well as substances which are non lethal by themselves but which possess important biological activities. The venoms also contain enzymes, mainly hydrolytic enzymes, which contribute to the digestion of the preys.

Antivenoms, and particularly polyvalent antivenoms prepared against all venomous snakes present in a geographical area, are obtained by hyper-immunisation of horses. In order to minimize the serum antigenicity, immunoglobulins are purified and converted in (Fab)₂ fragments by pepsin treatment.

Key-words : Venom, snake, toxin, enzyme, antivenom, immunoglobulin.

I. INTRODUCTION

Les venins n'ont pas de sens biologique par eux-mêmes. Ils font partie d'un tout, l'appareil venimeux, qui comprend essentiellement deux glandes venimeuses qui synthétisent le venin et un système d'injection constitué par des dents modifiées en crochets permettant à l'animal de faire pénétrer son venin assez profondément dans les tissus de sa proie ou de son agresseur.

Chez les *Crotalidae* par exemple, les glandes à venins dérivent des glandes labiales supérieures (Kochva, 1987). Ce sont des glandes de taille assez importante, constituées de tubules très ramifiés, logées dans une masse de tissu conjonctif. Elles sont innervées par le rameau maxillaire du nerf trigéminal. Les tubules sont constitués d'une seule assise de cellules qui sécrètent le venin. Celui-ci s'écoule dans des tubes collecteurs où il est conservé. De plus, près de l'orifice

de la glande, le système collecteur s'enrichit d'un ensemble de cellules à mucus qui, outre leur fonction glandulaire, pourraient servir de valvules. Les glandes à venin d'*Elapidae* et d'*Hydrophiidae* présentent une anatomie similaire. Cependant la séparation entre les parties sereuses des muqueuses est moins nette et de ce fait elles sont considérées comme plus primitives.

L'injection du venin se fait par l'intermédiaire du crochet. Cette dent plus grande que toutes les autres possède un canal plus ou moins profond et plus ou moins clos, qui facilite la pénétration du venin lors de la morsure. Les serpents ont été divisés en quatre groupes selon leur dentition :

- les **aglyphes** sont des serpents sans crochet et souvent sans glande à venin mais non pas sans dents comme leur nom générique pourrait le laisser croire. C'est le cas notamment des boas.

- chez les **opisthophyphes**, l'une des dents situées à l'arrière de la mâchoire supérieure, souvent plus grande que les autres, est munie d'un canal qui facilite l'écoulement du venin. Ce type de dentition est fréquent chez les *Colubridae* mais n'est pas spécifique à ce groupe.

- chez les **protéroglyphes**, c'est la dent antérieure de la mâchoire qui est transformée en crochet. La plupart des *Elapidae* et des *Hydrophiidae* appartiennent à ce groupe.

- les **solénophyphes** possèdent le système d'injection de venin le plus élaboré. Le crochet est une dent très longue dont le canal d'injection est complètement clos sauf aux deux extrémités. De plus, l'os maxillaire sur lequel il s'insère avec sa dent de remplacement est court et articulé tout à l'avant de la mâchoire. Ceci permet d'une part une injection profonde et d'autre part le repliement des crochets dans la gueule de l'animal lorsqu'il est au repos.

L'appareil venimeux des serpents, en particulier celui des solénophyphes, apparaît comme l'un des systèmes venimeux les plus perfectionnés que le monde animal ait élaboré. Sa fonction principale est évidente, il s'agit de capturer les proies dont se nourrit l'animal. Cependant, certaines adaptations font penser à un organe de défense ; c'est notamment le cas chez le cobra cracheur. Enfin, il semble que l'appareil venimeux joue un rôle dans la digestion des proies.

D'autre part, il arrive parfois qu'un serpent placé dans des situations de défense morde l'homme, ou un animal domestique, qu'il perçoit comme un agresseur, et lui injecte tout ou partie du venin qu'il possède dans sa glande venimeuse. D'un point de vue médical, la sévérité de l'envenimation dépend évidemment des qualités du venin, notamment de son abondance et de son pouvoir toxique, mais aussi de l'efficacité du système d'injection. C'est ainsi, qu'à une ou deux exceptions près, ne sont considérés comme venimeux que les serpents pourvus d'une dentition protéroglyphe (*Elapidae*, *Hydrophiidae*) ou solénophyphes (*Viperidae*, *Crotalidae*) capables d'injecter efficacement leur venin chez l'homme.

II. LES VENINS DE SERPENTS

La nature protéique des venins des vipères a été observée dès 1843 par Lucien Bonaparte, le frère de Napoléon (Bonaparte, 1843). De fait, les protéines constituent de 90 à 95% du poids sec du venin et sont responsables de la quasi-totalité de ses effets biologiques. Il faut toutefois remarquer que certains venins contiennent aussi des ions (Zn^{++} , Ca^{++} , Cu^{++} ou Co^{++}) en quantités parfois

importantes (Friederich et Tu, 1971) ainsi que des composés organiques doués d'activité biologique comme l'histamine, la sérotonine et l'acétylcholine (Bieber, 1979 ; Tilmisany *et al.*, 1986). Parmi la centaine, voire le millier de protéines contenues dans un venin de serpent, on trouve évidemment des toxines, en particulier des neurotoxines, mais aussi des protéines non toxiques possédant ou non une activité enzymatique, ce qui ne veut pas dire qu'elles sont dépourvues de propriétés pharmacologiques.

Pour comprendre les effets biologiques des venins de serpents, il faut se rendre compte d'une part qu'ils sont des mélanges complexes de toxines, d'enzymes et d'autres protéines qui combinent leurs effets en fonction de leurs propriétés et de leurs taux et d'autre part que la concentration d'une toxine et d'une enzyme peut varier considérablement d'une espèce à l'autre surtout entre espèces zoologiquement éloignées. Cette grande variabilité observée dans la composition des venins de serpents, alliée à une grande complexité de leur composition chimique, explique tout à fait l'extrême diversité des effets biologiques des venins de serpents.

A. Les enzymes des venins de serpents

Les venins de serpents contiennent un grand nombre d'enzymes, comme le montre le Tableau I. On constatera que les venins de serpents sont très riches en enzymes hydrolytiques (phospholipases A₂, phosphodiesterases, 5'-nucléotidases, ribonucléases, désoxyribonucléases, hyaluronidases, endopeptidases, peptidases...), qui pourraient jouer un rôle important lors de la digestion des proies (Thomas et Pough, 1979). En effet, il est souvent observé que les animaux tués par une morsure de serpent se décomposent très rapidement. Les venins de serpents contiennent aussi des cholinestérases et des acétylcholinestérases (Iwanaga et Suzuki, 1979) et des peptidases impliquées dans la coagulation du sang (Seegers et Ouyang, 1979) et la libération de peptides biologiquement actifs (Rothschild et Rothschild, 1979) qui possèdent des actions pharmacologiques très importantes.

Le rôle des enzymes présentes dans les venins de serpents n'est pas définitivement éclairci. Quelques auteurs ont supposé que les effets létaux sont dus à certaines enzymes particulièrement abondantes comme l'acétylcholinestérase (Zeller, 1951), les nucléotidases (Taborda *et al.*, 1952), les protéases (Deutsch et Diniz, 1955), les phospholipases (Slotta et Fraenkel-Conrat, 1938). Cependant, il a été montré que l'inactivation de certaines de ces enzymes ne provoquait pas de perte notable de la toxicité du venin (Iwanaga et Suzuki, 1979). De plus, en purifiant les protéines des venins, il est possible de séparer au moins partiellement certaines fractions enzymatiques des fractions toxiques. Il semble donc d'une façon générale que les enzymes des venins ne participent pas toutes directement à leur toxicité. La distinction entre toxine et enzyme n'est cependant pas absolue puisque certaines neurotoxines comme la crotoxine ou la β -bungarotoxine possèdent une activité phospholipase A₂. D'autre part, il a été observé que certaines enzymes peu ou pas toxiques par elles-mêmes augmentent fortement les effets pharmacologiques de toxines contenues dans le même venin. C'est le cas de la phospholipase A₂ de *Naja naja* qui augmente l'effet léthal de la cardiotoxine et accentue *in vitro* son action dépolarisante sur les fibres musculaires et les axones (Chang *et al.*, 1972).

Type	Nom	N° IUB (1)	Origines
1-Oxydoréductases	Lactate déshydrogénase	1.1.1.27	<i>Elapidae</i>
	L-amino acide oxidase	1.4.3.2	Toutes les espèces
	Catalase	1.11.1.6	Toutes les espèces
2- Transférases	Alanine amino transférase	2.6.1.2	
3 - Hydrolases	Phospholipase A ₂	3.1.1.4	Toutes les espèces
	Lysophospholipase	3.1.1.5	<i>Elapidae, Viperidae</i>
	Acétylcholinestérase	3.1.1.7	<i>Elapidae</i>
	Phosphatase alcaline	3.1.3.1	<i>Bothrops atrox</i>
	Phosphatase acide	3.1.3.2	<i>Agkistrodon acutus</i>
	5'-Nucléotidase	3.1.3.5	Toutes les espèces
	Phosphodiesterase	3.1.4.1	Toutes les espèces
	Désoxyribonucléase	3.1.21.1	Toutes les espèces
	Ribonucléase I	3.1.27.5	Toutes les espèces
	Adénosine triphosphatase	3.6.1.3	Toutes les espèces
	Amylase	3.2.1.1	Toutes les espèces
	Hyaluronidase	3.2.1.37	Toutes les espèces
	NAD-Nucléotidase	3.2.2.6	Toutes les espèces
	Kininogénase	3.4.21.8	<i>Viperidae</i>
	Activateur du facteur X	3.4.21.23	<i>Viperidae, Crotalidae</i>
	Héparinase	-	<i>Crotalidae</i>
	α-Fibrinogénase	-	<i>Viperidae, Crotalidae</i>
	β-Fibrinogénase	-	<i>Viperidae, Crotalidae</i>
	α-β-Fibrinogénase	-	<i>Vipera gabonica</i>
	Enzyme fibrinolytique	-	<i>Crotalidae</i>
	Activateur de prothrombine	-	<i>Crotalidae</i>
	Collagénase	-	<i>Viperidae</i>
	Elastase	-	<i>Viperidae</i>
4 - Lyases	Glucosamine ammonium lyase	1.3.1.9	

Tableau I : Principales enzymes présentes dans les venins de Serpents.

(1) Pour référence Iwanaga et Suzuki (1979) ; Markland (1983) ; Stocker (1990). International Union of Biochemistry (IUB) (1978).

B. Les protéines biologiquement actives mais non toxiques des venins de serpents

Les venins de serpents contiennent des protéines que l'on caractérise surtout par leurs propriétés biologiques souvent spectaculaires. Elles sont parfois toxiques mais à des doses très élevées et portent quelquefois une activité enzymatique. Elles ont été un peu artificiellement regroupées dans ce paragraphe, mais on ne pouvait parler de venins de serpents sans les mentionner.

Dès 1949, Rocha e Silva et ses collaborateurs ont montré que le venin de *Bothrops* provoque indirectement une vasodilatation des capillaires et que cette action résulte de l'hydrolyse d'une protéine plasmatique, le kininogène, qui libère un neuro-peptide hypotenseur, la bradikinine (Rocha e Silva *et al.*, 1949). C'est en étudiant les propriétés pharmacologiques de ce venin que l'on a caractérisé pour la première fois la bradikinine qui dans les conditions physiologiques normales est libérée par une enzyme endogène, la kallikréine. Le venin de *Bothrops*, comme la plupart des venins de *Crotalidae* et de *Viperidae*, contient une protéine agissant comme la kallikréine. Ces protéines ont des masses moléculaires d'environ 30.000 daltons et possèdent une activité arginine estérase, sans toutefois hydrolyser la caséine (Cohen *et al.*, 1970). D'autre part, un inhibiteur de kallikréine a été trouvé dans le venin de *Vipera russellii* (Takahashi *et al.*, 1972).

Plusieurs activateurs de la bradikinine ont été isolés des venins de *Crotalidae*. Il s'agit de peptides riches en proline, constitués de 5 à 12 acides aminés et portant un résidu pyroglutamique en position N-terminale, qui inhibent l'enzyme convertissant l'angiotensine I (active) en angiotensine II (inactive) (Ondetti *et al.*, 1971). Ces peptides hypotenseurs de venins de serpents ont servi de modèles pour la synthèse de puissants médicaments hypotenseurs, le Captopril et l'Enalapril (Comer, 1984).

Un autre exemple très connu est celui du facteur de croissance nerveuse ou "nerve growth factor" (NGF) qui induit la différenciation des neurones sensoriels des ganglions sympathiques. Les NGF de venins de serpents sont des protéines de 20 à 30.000 daltons de masse moléculaire, non toxiques et sans activité enzymatique connue. On les retrouve dans le venin de certains *Elapidae*, de *Crotalidae* et de *Viperidae* ainsi d'ailleurs que dans les glandes maxillaires d'autres animaux non venimeux comme la souris mâle.

Il existe un autre groupe de protéines de venins de serpents numériquement et pharmacologiquement très important, qui interfèrent avec les processus de la coagulation du sang. Ce sont soit des enzymes protéolytiques très spécifiques qui agissent comme des activateurs de la coagulation, soit des inhibiteurs spécifiques des facteurs endogènes de la coagulation sanguine. Ces composants de venins de serpents sont caractérisés par une action très spécifique de sorte que plusieurs ont été purifiés et sont utilisés comme agents thérapeutiques ou de diagnostic.

C. Principales toxines de venins de serpents

Les venins de serpents sont riches en toxines capables de tuer ou à défaut d'immobiliser les proies dont ils se nourrissent. Le tableau II présente les

principales neurotoxines de venins de serpents. Il faut signaler que chaque venin ne contient pas toutes les neurotoxines présentées dans le tableau II, il en contient cependant plusieurs comme le montre la figure 1. Par ailleurs, dans le cas du venin de *Bungarus fasciatus*, un *Elapidae* d'Asie, les différentes toxines sont présentes à des taux très variables qui changent beaucoup d'une espèce à l'autre même lorsqu'elles sont zoologiquement très voisines. Ceci explique la diversité des actions physiologiques des venins. Enfin, il faut remarquer que si un venin de serpent contient plusieurs neurotoxines, celles-ci agissent en synergie. Notamment, le venin de *Bungarus fasciatus* (Fig.1) contient des α -bungarotoxines curarisantes, qui bloquent la transmission neuromusculaire à un niveau post-synaptique en empêchant la liaison de l'acétylcholine sur son récepteur musculaire, et des neurotoxines pré-synaptiques (les β -bungarotoxines et la céruléotoxine), qui empêchent la libération de l'acétylcholine par les terminaisons nerveuses.

III. SERUMS ANTIVENIMEUX

Comme cela a été souligné par l'Organisation Mondiale de la Santé dans son rapport de 1981, les morsures par les serpents venimeux constituent un problème médical, social et économique dans de nombreux pays tropicaux, notamment ceux en voie de développement ayant une forte densité de population rurale non mécanisée. Il y a environ un siècle, Albert Calmette (1894) démontrait qu'il est possible d'immuniser un animal contre un venin de serpent et préparait pour la première fois un sérum antivenimeux en montrant que le sérum de l'animal immunisé est capable de soigner un second animal mordu par le même serpent. Cette étude a été le point de départ du traitement moderne des morsures des serpents au moyen de la sérothérapie antivenimeuse.

A première vue, dans le domaine de la sérothérapie antivenimeuse, la meilleure stratégie consiste à préparer des sérums spécifiques contre chaque serpent venimeux. Cependant, les serpents venimeux sont nombreux (plus de 400 espèces) et plusieurs espèces vivent dans la même région, de sorte que l'identification du serpent responsable de morsure est souvent incertaine (Viravan *et al.*, 1986). Un sérum polyvalent dirigé contre toutes les espèces venimeuses présentes dans une région donnée est de ce fait beaucoup plus utile qu'une série de sérums monovalents (Christensen, 1979). D'un autre côté, à cause de la complexité de la composition des venins, le pouvoir de neutralisation d'un sérum polyvalent diminue lorsque le nombre d'espèces utilisées pour sa préparation augmente. Ainsi un compromis doit être réalisé entre la polyvalence du sérum antivenimeux et son efficacité protectrice et il est parfois nécessaire de préparer plusieurs sérums polyvalents pour couvrir tous les serpents venimeux de la région concernée.

Dans la perspective de préparer des sérums polyvalents dirigés contre les espèces venimeuses d'une région donnée, il est important d'identifier les serpents présentant un risque pour l'homme dans cette région, et de préciser les réactions immunologiques croisées, notamment les protections croisées, entre ces différents venins. Nous décrirons dans les paragraphes suivants l'exemple d'un sérum antivenimeux destiné à protéger contre l'ensemble des serpents venimeux des pays d'Afrique du Nord et du Proche et Moyen-Orient.

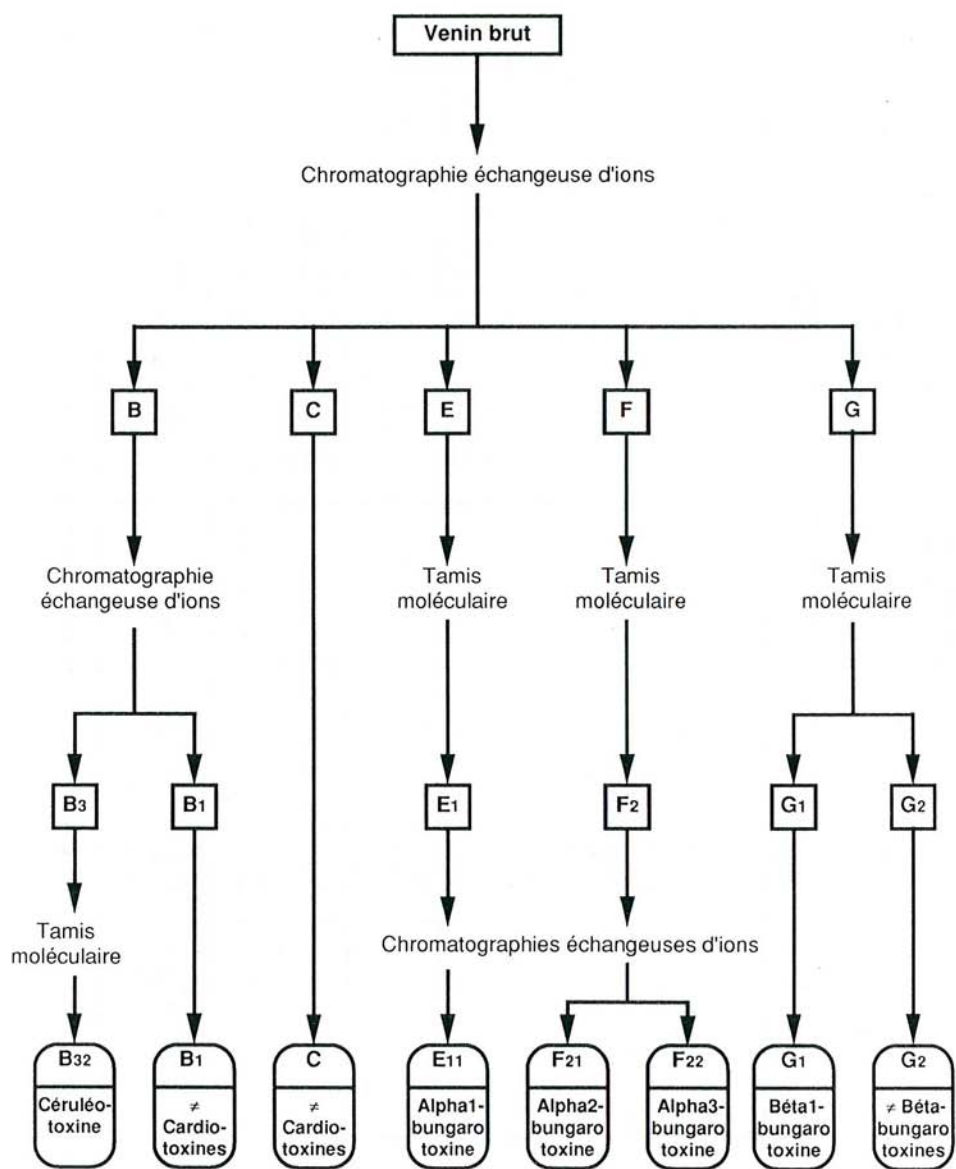


Figure 1 : Différentes neurotoxines du venin de *Bungarus fasciatus*

Classe	Exemple	Structure Moléculaire	Propriété Enzymatique	Mécanisme d'action
α -Neurotoxines	α -bungarotoxine α -toxine erabutoxine cobrotoxine...	Polypeptides de 60 -62 ou 70-74 acides aminés	Aucune	Curare : bloquent la transmission neuromusculaire en se liant sur le récepteur cholinergique des fibres musculaires squelettiques.
κ -Toxines	κ -toxine	Ressemblent aux α -neurotoxines	Aucune	Bloquent certains récepteurs cholinergiques du système nerveux central.
β -Neurotoxines	notexine ammodyttoxine β -bungarotoxine crotoxine talpoixine...	Assez variable : une ou plusieurs sous-unités dont l'une au moins est une phospholipase A2.	Phospholipase A2	Bloquent la transmission neuromusculaire en empêchant la libération de l'acétylcholine par les terminaisons nerveuses. Pourraient interagir avec un canal potassium voltage sensible.
Dendrotoxines	dendrotoxine Toxines I et K	Polypeptides de 57 acides aminés ressemblant aux inhibiteurs trypsiques du pancréas.	Aucune	Augmentent la quantité d'acétylcholine libérée par les terminaisons nerveuses. Interagissent avec un canal potassium voltage sensible.
Cardiotoxines	γ -toxine cardiotoxine cyrotoxine	Ressemblent aux α -neurotoxines	Aucune	Perturbent les membranes plasmiques de certaines cellules (fibres cardiaques, cellules excitable...) et entraînent leur lyse. Provoquent un arrêt cardiaque.
Saratotoxines	saratotoxines a, b et c	Polypeptides de 21 acides aminés qui ressemblent aux endothélines.	Aucune	Puissants vasoconstricteurs qui affectent le système cardiovasculaire dans son ensemble. Provoquent un arrêt cardiaque.
Myotoxines	Myotoxine- α Crotamine	Polypeptides basiques de 42 acides aminés.	Aucune	Provoquent la dégénérescence des fibres musculaires en interagissant avec un canal sodium voltage dépendant.
	Phospholipase A2	Ressemblent aux β -neurotoxines	Phospholipase A2	Provoquent la dégénérescence des fibres musculaires.
Hémorragines	Mucrotoxine A Toxine hémorragique a,b,c... HT1, HT2	Polypeptide de 20 à 30.000 daltons de masse moléculaire	Métalloprotéase	Provoquent des hémorragies très importantes dues à une altération des parois vasculaires.

Tableau II : Principales toxines de venins de serpents.

A. Identification des serpents venimeux présentant un risque potentiel pour l'homme

La Figure 2 montre la distribution géographique de la plupart des serpents venimeux habitant les pays d'Afrique du Nord et du Proche et Moyen-Orient. Elle n'inclut pas les serpents marins (*Hydrophiidae*), dont le biotope très particulier fait qu'ils ne présentent un danger que pour une population bien définie, et quelques serpents terrestres qui ne sont pas très dangereux (*Atractaspis*, *Elapsoidae* et *Causus*) (Klemmer, 1968). La Figure 2 montre que l'herpétofaune venimeuse des pays nord-africains (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Egypte) et des pays du Proche et Moyen-Orient (Israël, Jordanie, Syrie, Liban, Arabie saoudite, Emirats Arabes, Sud et Nord Yémen, Irak) est assez homogène puisque 12 serpents venimeux, appartenant à seulement 7 genres, vivent dans cette région relativement large. Par contre, l'extension aux pays voisins (Turquie au nord, Iran à l'est et Soudan au sud) augmenterait considérablement la diversité de l'herpétofaune venimeuse. Cette première conclusion suggère qu'il devrait être possible de préparer un sérum antivenimeux polyvalent protégeant contre tous les serpents venimeux d'Afrique du Nord et du Proche et Moyen-Orient. Ce sérum polyvalent devrait être capable de neutraliser les venins de trois *Elapidae* (*Naja haje*, *Naja nigricollis* et *Walterinesia aegyptiae*) et neuf *Viperidae* (*Vipera lebetina*, *Vipera xanthina*, *Vipera letastei*, *Echis carinatus*, *Echis coloratus*, *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera*, *Pseudocerastes persicus* et *Bitis arietans*).

Le danger potentiel des différentes espèces mentionnées ci-dessus est très variable. Il est difficile d'évaluer le danger réel de chaque serpent venimeux car de très nombreux paramètres doivent être considérés. En particulier, il n'est pas facile d'apprécier les facteurs écologiques et/ou éthologiques qui déterminent la fréquence des morsures. Par ailleurs, les études épidémiologiques sont rares et la gravité des envenimations est définie avec des paramètres très différents, de telle sorte que les comparaisons de pays à pays sont difficiles. Enfin, dans de très nombreux cas de morsures de serpent, l'espèce responsable de l'accident n'est pas identifiée de façon formelle. En revanche, il est relativement facile de déterminer le danger potentiel de chaque serpent en mesurant la toxicité du venin et la quantité de venin présente dans la glande venimeuse. Le Tableau III montre le résultat d'une telle étude, réalisée dans le cas des serpents mentionnés précédemment. Les valeurs obtenues indiquent clairement que les serpents *Elapidae* sont potentiellement plus dangereux que les serpents *Viperidae* car ils possèdent des quantités très importantes d'un venin plus toxique. Heureusement les serpents *Elapidae* sont rares dans les pays du Proche-Orient et leurs morsures sont exceptionnelles (Klemmer, 1968). La situation est plus sérieuse dans le cas de *Bitis arietans*, le plus dangereux des *Viperidae*, puisqu'il apparaît quasiment aussi dangereux que les *Elapidae* et qu'il est responsable d'un plus grand nombre de morsures.

Une autre observation importante qui peut être obtenue à partir des données présentées dans le Tableau III est la très forte variabilité, à l'intérieur de chaque espèce, dans le danger potentiel que représentent les serpents provenant de différentes régions géographiques. Les différences observées dans la quantité de venin collecté peuvent être en partie dues au *modus operandi* des différents expérimentateurs qui ont collecté le venin en stimulant plus ou moins efficacement les spécimens utilisés pour cette étude. Les différences dans la toxicité des venins sont par contre tout à fait significatives et suggèrent que la

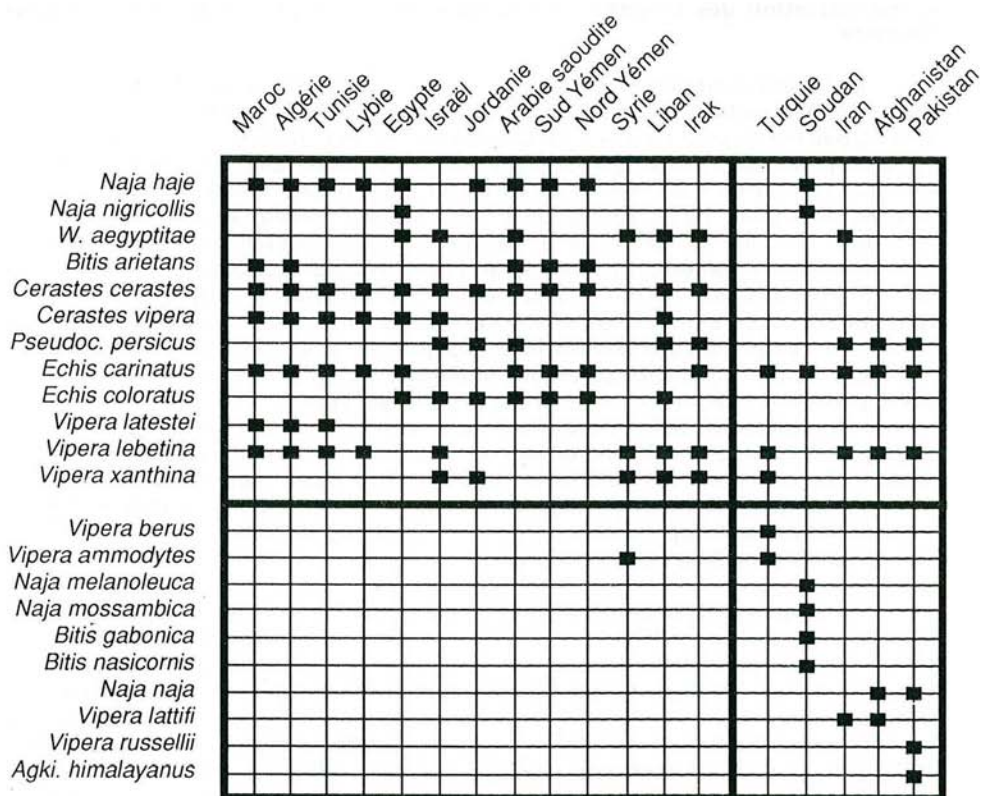


Figure 2 : Distribution régionale des serpents venimeux des pays d'Afrique du Nord et du Proche et Moyen-Orient

composition du venin d'une espèce donnée est elle-même variable. Elle peut dépendre de l'origine géographique du serpent, comme cela a été mentionné par Taborska (1975), ou même varier d'un individu à un autre (Faure et Bon, 1987).

B. Protections croisées entre les venins des serpents

Dans le but de déterminer les protections croisées possibles entre les venins des serpents des pays d'Afrique du Nord et du Proche et Moyen-Orient, des sérums monovalents ont été préparés chez le cheval contre les venins de *Naja haje*, *Naja nigricollis*, *Echis carinatus*, *Vipera lebetina* et *Bitis arietans*. Leurs capacités à neutraliser les venins homologues et hétérologues ont été déterminées. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau IV et montrent que des neutralisations croisées tout à fait significatives existent entre les venins d'espèces zoologiquement voisines. Par exemple, les venins des trois espèces d'*Elapidae* sont neutralisés à la fois par les sérums anti-*Naja haje* ou anti-*Naja*

Espèce	Origine	DL50 µg/serpent	Quantité par serpent	
			mg/serpent	DL50/serpent
<i>Naja haje</i>	Ethiopie (1)	15	300	21.000
<i>Naja haje</i>	Egypte (2)	3	300	100.000
<i>Naja haje</i>	Egypte (3)	5	85	17.000
<i>Naja nigricollis</i>	Ethiopie (1)	15	600	40.000
<i>Walt. aegyptiae</i>	Egypte (3)	5	18	3.600
<i>Echis carinatus</i>	Egypte (1)	43	50	1.200
<i>Echis carinatus</i>	Mali (3)	65	25	400
<i>Echis carinatus</i>	Pakistan (3)	28	50	1.800
<i>Echis carinatus</i>	Arabie saoudite (4)	38	26	700
<i>Echis coloratus</i>	Arabie saoudite (4)	13	23	1.800
<i>Cerastes cerastes</i>	Egypte (2)	23	100	4.300
<i>Cerastes cerastes</i>	Tunisie (3)	24	34	1.500
<i>Cerastes vipera</i>	Egypte (2)	22	30	1.400
<i>Cerastes vipera</i>	Tunisie (3)	10	6	600
<i>Vipera lebetina</i>	Tunisie (1)	26	100	3.900
<i>Vipera lebetina</i>	Turquie (2)	24	40	1.700
<i>Vipera palestinae</i>	Israël (2)	11	25	2.300
<i>Bitis arietans</i>	Guinée (1)	22	250	11.000
<i>Bitis arietans</i>	Arabie saoudite (4)	5	100	20.000

Tableau III : Danger potentiel des serpents venimeux des pays d'Afrique du Nord et du Proche et Moyen-Orient

Venins fournis par : (1) Institut Pasteur (Paris) ; (2) Dr. Fatma Hassan (Le Caire) ; (3) Latoxan (Rosans, France) ; (4) Dr. David Theakston (Liverpool).

nigricollis. D'une façon comparable, le sérum anti-*Echis carinatus* neutralise très efficacement le venin de l'espèce voisine *Echis coloratus* ainsi que celui d'espèces plus éloignées, *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera*, *Vipera xanthina* et même *Bitis arietans*. Les résultats montrés dans le Tableau IV indiquent enfin qu'il doit être possible de préparer un sérum polyvalent capable de neutraliser le venin de tous les serpents venimeux présents dans les pays d'Afrique du Nord et du Proche-Orient, en immunisant les chevaux avec un mélange de venins préparé à partir de trois espèces seulement : un *Elapidae* (*Naja haje* ou *Naja nigricollis*) et deux *Viperidae* (*Echis carinatus* et *Vipera lebetina*). Toutefois, en prenant en compte l'observation que les venins de *Naja haje*, *Naja nigricollis* et *Bitis arietans* sont les serpents venimeux les plus dangereux de cette région, un pouvoir protecteur plus important est requis contre ces trois espèces. Ainsi un sérum préparé en immunisant les chevaux avec un mélange de cinq venins (*Naja haje*, *Naja nigricollis*, *Echis carinatus*, *Vipera lebetina* et *Bitis arietans*) devrait être plus efficace.

Venins	Sérums antivenimeux monovalents				
	Anti- <i>Naja</i> <i>haje</i>	Anti- <i>Naja</i> <i>nigricollis</i>	Anti- <i>Echis</i> <i>carinatus</i>	Anti- <i>Vipera</i> <i>lebetina</i>	Anti- <i>Bitis</i> <i>arietans</i>
<i>Naja haje</i>	31	7	—	—	—
<i>Naja nigricollis</i>	16	59	—	—	—
<i>Walt. aegyptiae</i>	19	50	—	—	—
<i>Echis carinatus</i>	—	—	67	—	—
<i>Echis coloratus</i>	—	—	250	63	—
<i>Cerastes cerastes</i>	—	—	27	63	—
<i>Cerastes vipera</i>	—	—	85	63	—
<i>Vipera lebetina</i>	—	—	—	49	—
<i>Vipera palestinae</i>	—	—	40	95	—
<i>Bitis arietans</i>	—	—	60	62	200

Tableau IV : Protections immunologiques homologues et hétérologues

Les valeurs indiquent le nombre de DL₅₀ normalisées par 100 mg de protéine de sérum antivenimeux.

C. Préparation des sérums antivenimeux

Les sérums antivenimeux sont en général préparés chez le cheval, bien que la chèvre et le mouton aient aussi été utilisés avec succès. Les sérums sont obtenus par hyper-immunisation avec un venin unique (sérums monovalents) ou un mélange de venins (sérums polyvalents). Dans la plupart des cas, les venins ne sont pas modifiés chimiquement pour en atténuer la toxicité, comme cela est en général pratiqué dans le cas des toxines bactériennes (anatoxines), car les venins inactivés (anavenins) s'avèrent être de mauvais antigènes. Il est donc nécessaire d'injecter au départ des doses très faibles de venin pour éviter d'envenimer l'animal utilisé pour la préparation du sérum antivenimeux, puis d'augmenter celles-ci très progressivement au fur et à mesure que le titre protecteur de l'animal immunisé s'accroît. Cette première étape d'hyper-immunisation qui s'étale ainsi sur plus de trois mois, est très délicate à réaliser car il faut en permanence ajuster la quantité de venin injecté au niveau des anticorps produits par l'animal. La production des sérums bruts peut alors être entreprise : les chevaux reçoivent chaque mois deux ou trois injections de rappel avec une quantité importante de venin, à une semaine d'intervalle, et leur sang est prélevé quelques jours après chaque injection. Très souvent, l'on pratique en outre la plasmaphérèse, c'est-à-dire qu'après séparation du plasma des cellules sanguines, celles-ci sont réinjectées à l'animal, afin de réduire l'anémie entraînée par ces prises de sang importantes et répétées.

Les sérums bruts sont purifiés par précipitation avec du sulfate d'ammonium. Les immunoglobulines sont ensuite digérées avec de la pepsine afin de séparer la région Fc du fragment F(ab)₂ qui lie l'antigène. La préparation est une nouvelle fois précipitée avec de l'alumine pour éliminer les derniers

composants équin, responsables des réactions allergiques que l'on observait fréquemment avec les premiers sérums antivenimeux, imparfaitement purifiés. La qualité d'un sérum antivenimeux est déterminée principalement en mesurant sa capacité à neutraliser le pouvoir létal des venins utilisés pour sa préparation (protection homologue) et des venins des espèces voisines (protection hétérologue). D'une manière générale, une dose fixe de venin (homologue ou hétérologue) est mélangée avec des quantités croissantes du sérum antivenimeux à doser et le pouvoir toxique résiduel du mélange est déterminé par des essais de létalité chez la souris.

Le pouvoir neutralisant des sérums antivenimeux est faible lorsqu'il est comparé au pouvoir neutralisant de sérums dirigés contre des toxines bactériennes (toxines tétanique, botulinique, cholérique, diphtérique...). Ceci tient au fait que dans le cas des toxines bactériennes, les sérums sont dirigés contre une seule toxine, ou un petit nombre de toxines, tandis que dans le cas des sérums antivenimeux, ceux-ci doivent neutraliser l'ensemble des composants présents dans le venin et, comme nous l'avons vu dans la première partie, les constituants des venins sont très nombreux. Par ailleurs, les toxines bactériennes sont souvent des molécules de masse moléculaire élevée, tandis que les toxines des venins de serpent sont de petites molécules, de sorte que, les anticorps réagissant mole à mole avec les toxines, il faut un volume de sérum antivenimeux plus important pour neutraliser le même poids de toxines. Lors d'une morsure par un serpent venimeux, il est donc nécessaire d'utiliser des quantités importantes de sérums antivenimeux (plusieurs dizaines de millilitres) pour neutraliser l'action toxique du venin injecté. Ceci augmente d'autant les risques liés à une réaction allergique. Il est donc important que la purification du sérum antivenimeux soit réalisée de la façon la plus rigoureuse possible.

D. Principaux sérums monovalents et polyvalents

De nombreux sérums antivenimeux ont été préparés pour faire face à la plupart des besoins. La liste des principaux producteurs de sérums antivenimeux et de leurs spécialités a été publiée à plusieurs reprises (Bureau of medicine and surgery, Department of US Navy, 1979 ; Christensen, 1979 ; Detrait, 1982 ; Chippaux et Goyffon, 1983). Cette liste est trop longue pour être reproduite ici, le lecteur intéressé par un problème pratique consultera utilement les publications de Detrait (1982) ou de Chippaux et Goyffon (1983), bien que certains produits aient été modifiés depuis la publication de ces travaux⁽¹⁾.

Le choix d'un sérum antivenimeux approprié est parfois assez simple. C'est notamment le cas dans les pays d'Afrique du Nord et du Proche et Moyen-Orient, comme cela a été exposé ci-dessus. En Europe, la plupart des producteurs proposent un sérum polyvalent préparé avec les venins de *Vipera aspis*, *Vipera berus* et *Vipera ammodytes*, bien que certains fabricants ajoutent au mélange utilisé pour préparer leur sérum polyvalent les venins de *Vipera ursini* ou de *Vipera lebetina*. Cependant d'autres producteurs, comme l'Institut de Zoologie de Zagreb, ont choisi de ne produire qu'un sérum monovalent avec le venin de

(1) Une réactualisation des producteurs de sérum antivenimeux a été publiée en 1991 par Chippaux et Goyffon dans : Snake venoms and toxins, Handbook of natural toxins, vol 5, Tu A.T. ed. pp. 529-555, Marcel Dekker, New York.

Vipera ammodytes. La situation n'est pas toujours aussi aisée, notamment lorsque la répartition géographique de l'herpétofaune venimeuse est complexe, comme c'est le cas en Afrique centrale, en Amérique centrale et en Asie du sud-est. En Afrique centrale, par exemple, on trouvera des sérums polyvalents plutôt dirigés contre les serpents venimeux de la savane (*Bitis arietans*, *Naja nigricollis*, *Naja melanoleuca*, *Naja mossambica*, *Echis carinatus* et éventuellement *Bitis gabonica*), de la forêt (*Dendroaspis viridis*, *Dendroaspis polylepis*, *Dendroaspis jamesoni*, *Dendroaspis angusticeps*) ainsi que des sérums polyvalents plus complets protégeant contre les serpents de forêt et de savane, mais dont le titre protecteur est plus faible. Enfin, étant donné qu'*Echis carinatus* est responsable de la plupart des morsures en savane africaine (Pugh et Theakston, 1980), on trouve aussi des sérums monovalents anti-*Echis*, dont le titre est meilleur mais qui ne protègent que contre les morsures de cette espèce et des espèces apparentées.

IV. CONCLUSION

La grande diversité des manifestations physiopathologiques observées lors des envenimations ophidiennes accidentelles ou expérimentales est due à l'extrême complexité des venins de serpents et à la grande variabilité dans le taux de chacun de leurs constituants : toxines, enzymes, etc. Ainsi, il a été possible d'isoler à partir des venins de serpents un grand nombre de substances qui se sont révélées être de remarquables outils pharmacologiques et ont conduit à des découvertes importantes dans des domaines très divers de la biologie (caractérisation et purification du récepteur cholinergique, découverte du système kinine-bradikinine, mise en évidence du facteur de différenciation nerveuse...) et parfois même à des médicaments majeurs (hypotenseurs comme le Captopril) ou à des outils de diagnostic très utiles.

La remarquable complexité des venins de serpents et leur grande variabilité de composition posent, en revanche, de sérieux problèmes aux praticiens chargés de soigner les patients mordus par les serpents venimeux. La diversité des traitements est évidemment directement liée à celle des venins. En outre, il faut remarquer que si les venins de serpents contiennent des toxines possédant une action physiologique précise, comme dans le cas des α -neurotoxines curarisantes qui se lient sélectivement sur le récepteur cholinergique des muscles squelettiques, ils possèdent aussi des substances ayant des actions plus diffuses, capables par exemple de déclencher une réaction d'auto-destruction chez l'organisme envenimé. C'est le cas des myotoxines qui après avoir altéré de façon discrète les fibres musculaires, par un mécanisme encore largement incompris, sont responsables de leur auto-destruction. C'est également le cas des enzymes responsables de la réaction œdémateuse qui se développe à partir du site de la morsure dans le cas de la plupart des accidents dûs aux *Viperidae* et *Crotalidae*.

C'est dans ce contexte que la sérothérapie antivenimeuse prend tout son sens. Ayant été préparés avec un venin complet (ou un mélange de venins), les sérums antivenimeux contiennent des immunoglobulines, en fait des fragments F(ab)'₂, qui réagissent avec un très grand nombre de constituants du venin, limitant leur action biologique et accélérant leur élimination. Cette grande diversité d'interaction implique cependant que de nombreux anticorps réagissent avec des protéines des venins dépourvues d'action physiopathologique importante, limitant ainsi l'efficacité des sérums antivenimeux. C'est pourquoi certains auteurs

ont proposé de remplacer les sérums antivenimeux par des anticorps monoclonaux dirigés contre les toxines, notamment les neurotoxines des venins (Ménez, 1985 ; Theakston, 1989). Cette approche a été rapidement confrontée à des problèmes fondamentaux importants qui n'ont été qu'imparfaitement résolus, de sorte qu'elle n'a pu aboutir à ce jour. D'une part, la plupart des anticorps monoclonaux, qui ne réagissent qu'avec une seule région de la molécule de la toxine (un épitope), sont très rarement capables de neutraliser le pouvoir létal de la toxine, le complexe anticorps monoclonal-toxine étant toujours actif. Par ailleurs, lorsqu'un anticorps monoclonal est neutralisant, son pouvoir protecteur est souvent assez faible. Les autres limitations des anticorps monoclonaux sont liées aux propriétés des venins eux-mêmes : s'agissant de mélanges complexes contenant plusieurs toxines, il faudra mélanger au moins autant d'anticorps monoclonaux que le venin contient de toxines ; par ailleurs, la variabilité des venins d'espèce à espèce est telle, qu'il est rare de trouver un anticorps monoclonal préparé avec une toxine de venin d'une espèce capable de neutraliser les toxines homologues des venins d'espèces voisines. Ainsi, il est nécessaire pour neutraliser un venin, d'utiliser un mélange constitué d'un grand nombre d'anticorps monoclonaux ce qui revient, dans une certaine mesure, à reconstituer un mélange aussi complexe qu'un sérum polyclonal.

Les anticorps monoclonaux pourraient peut-être cependant être utilisés pour améliorer le pouvoir neutralisant des sérums antivenimeux classiques. Par exemple, dans le cas du crotale sud-américain, *Crotalus durissus terrificus*, une seule toxine, la crotoxine, est responsable de 90% du pouvoir toxique du venin. L'addition à un sérum antivenimeux anti-crotale d'un anticorps monoclonal capable de neutraliser très efficacement la crotoxine devrait donc doper de façon spectaculaire le pouvoir protecteur de ce sérum antivenimeux. Par ailleurs, il est raisonnable de penser qu'un sérum préparé avec les principales toxines contenues dans un venin sera plus efficace que celui obtenu avec le venin entier. Cette stratégie a donné d'excellents résultats dans le cas des sérums anti-scorpioniques, essentiellement parce que les manifestations physiopathologiques des venins de scorpions sont dues à un petit nombre de types immunologiques de neurotoxines, peu immunogènes, contenues dans un venin riche en mucoprotéines pharmacologiquement inactives, mais très immunogènes. Cette stratégie est en revanche difficile à réaliser dans le cas des venins de serpents car en raison de leur complexité et de leur diversité, il est pratiquement impossible de séparer simplement les protéines toxiques des protéines pharmacologiquement inactives.

D'un autre point de vue, des progrès importants peuvent encore être faits pour améliorer le pouvoir protecteur des sérums antivenimeux polyclonaux actuels ainsi que leur qualité immunologique. En effet, le sérum des animaux utilisés pour la préparation des sérums antivenimeux contient une majorité d'anticorps dirigés contre des protéines autres que celles du venin, même lorsque ces animaux sont hyperimmunisés. Ainsi, il est possible d'augmenter de façon significative le pouvoir protecteur d'un sérum antivenimeux en purifiant les anticorps qui reconnaissent spécifiquement les protéines du venin. Ceci peut être réalisé par exemple en chromatographiant le sérum sur une colonne d'immunoaffinité préparée avec le venin en question. Par ailleurs, les techniques de purification modernes telles que les chromatographies échangeuses d'ions sont tout à fait capables, à un faible coût et à une échelle industrielle, de permettre la préparation des sérums antivenimeux beaucoup moins immunogènes, rendant ainsi leur utilisation beaucoup plus sûre.

Remerciements — Cette étude a été financée en partie par des subventions de l'Institut Pasteur Production, de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale et de la Direction des Recherches, Essais et Techniques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BIEBER, A.L. (1979) — Metal and non protein constituents in snake venoms. *In* : Snake Venoms (Lee, C.Y., ed.), pp.295-306, Handbook of Experimental Pharmacology, Vol.52, Springer-Verlag, Berlin. 1130 p.
- BONAPARTE, C.L. (1843) — Recherche chimique sul venumo della vipera. *Atti. Sci. Ital.*, 175 : 179.
- BUREAU OF MEDECINE AND SURGERY, DEPARTMENT OF US NAVY (1979) — Antivenin Sources. *In* : Poisonous Snakes of the World, pp.169-180, United States Government Printing Office, Washington DC.
- CALMETTE, A. (1894) — Contribution à l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. *Ann. Inst. Pasteur*, 8 : 275-291.
- CHANG, C.C., CHUANG, S., LEE, C.Y. et WEI, J.W. (1972) — Role of cardiotoxin and phospholipase A in the blockade of nerve conduction and depolarization of skeletal muscle induced by cobra venom. *Brit. J. Pharmacol.*, 44 : 752-764.
- COHEN, I., ZUR, M., KAMINSKY, E. et DE VRIES, A. (1970) — Isolation and characterization of kinin-releasing enzyme of *Echis coloratus* venom. *Biochem. Pharmacol.*, 19 : 785-793.
- COMER, W.T. (1984) — Antihypertensive agents. *Am. Rep. Med. Chem.*, 19 : 61-65.
- CHIPPAUX, J.P. et GOYFFON, M. (1983) — Producers of antivenoms sera. *Toxicon*, 21 : 739-752.
- CHRISTENSEN, P.A. (1979) — Production and standardization of antivenin. *In* : Snake Venoms (Lee, C.Y., ed.) pp.825-846, Handbook of Experimental Pharmacology, Vol.52, Springer-Verlag, Berlin, 1130 p.
- DETRAIT, J. (1982) — Répertoire des Instituts et Laboratoires producteurs de sérums antivenimeux. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 21 : 44-49.
- DEUTSCH, H.F. et DINIZ, C.R. (1955) — Some proteolytic activities of snake venoms. *J. Biol. Chem.*, 216 : 17-26.
- FERREIRA, S.H. (1965) — A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Brit. J. Pharmacol.*, 24 : 163-169.
- FRIEDERICH, C. et TU, A.T. (1971) — Role of metals in snake venoms for hemorrhagic esterase and proteolytic activities. *Biochem. Pharmacol.*, 20 : 1549.
- FAURE, G. et BON, C. (1987) — Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*, 25 : 229-234.
- INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY (IUB) (1978) — Enzyme nomenclature, Academic Press, New York.

- IWANAGA, S. et SUZUKI, T. (1979) — Enzymes in snake venoms. *In* : Snake venoms (Lee, C.Y., ed.), pp.61-158, Handbook of experimental Pharmacology, Vol.52, Springer-Verlag, Berlin, 1130 p.
- KOCHVA, E. (1987) — The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon*, 25 : 65-106.
- KLEMMER, K. (1968) — Methods of classification of venomous snakes. *In* : Venomous Animals and Their Venoms (Bücherl, W., Buckley, E.E. et Deulofeu, V. eds.), pp.275-285, Vol.I, Academic Press, New York, 707 p.
- MARKLAND, F.S. (1983) — Rattlesnake venom enzymes that interact with components of the hemostatic system. *J. Toxicol. Toxin Rev.*, 2 : 119-127.
- MENEZ, A. (1982) — Molecular immunology of snake toxins. *Pharmacological Therapeutics*, 30 : 91-113.
- ONDETTI, M.A., WILLIAMS, N.J., SABO, E.F., PLUSEC, J., WEAVER, E.R. et KOCY, O. (1971) — Angiotensin converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure and synthesis. *Biochemistry*, 19 : 4033-4038.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ (1981) — Caractérisation des venins et standardisation des sérums antivenimeux : progrès réalisés. *OMS Publication Offset*, 58 : 1-49.
- PUGH, R.N.H. et THEAKSTON, R.D.G. (1980) — The incidence of morbidity of snake bites in Nigerian savana. *Lancet* ii, 1181.
- ROCHA e SILVA, M., BERALDO, W.T., ROSENFELD, G. (1949) — Bradikinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating principle released from plasma globulin by snake venoms and trypsin. *Am. J. Physiol.*, 156 : 261-273.
- ROTHSCHILD, A.M. et ROTHSCCHILD, Z. (1979) — Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. *In* : Snake venoms (Lee, C.Y., ed.), pp.591-627, Handbook of Experimental Pharmacology, Vol.52, Springer-Verlag, Berlin, 1130 p.
- SEEGERS, W.H. et OUYANG, C. (1979) — Snake venoms and blood coagulation. *In* : Snake venoms (Lee, C.Y., ed.), pp.684-749, Handbook of Experimental Pharmacology, Vol.52, Springer-Verlag, Berlin, 1130 p.
- SLOTTA, K.H. et FRAENKEL-CONRAT, H. (1938) — Schlangengifte ; Mitteilung, reinigung und cristallisation des Klapperschlangen-giftes. *Ber. dtsch. Chem. Ges.*, 71 : 1076-1087.
- STOCKER, K.F. (1990) — Composition of snake venoms. *In* : Medical Use of Snake Venoms Proteins (Stocker, K.F., ed.), pp.33-56, CRC Press, Boca Raton, Florida, 272 p.
- TABORDA, A.R., TABORDA, L.C., WILLIAMS, J.N.J. et ELVEHJEM, C.A. (1952) — A study of the desoxyribonuclease activity of snake venoms. *J. Biol. Chem.*, 194 : 207-226.
- TABORSKA, E. (1975) — Intraspecies variability of the venom of *Echis carinatus*. *Physiol. Bohemoslov.*, 20 : 307-311.
- TAKAHASHI, H., IWANAGA, J. et SUZUKI, T. (1972) — Isolation of a novel inhibitor of kallikrein, plasmin and trypsin from the venom of Russell's viper (*Vipera Russellii*). *FEBS Letters*, 27 : 207-210.
- TILMISANY, A.K., MUSTAFA, A.A., ABDEL-AZIZ, A. et OSMAN, O.H. (1986) — Evidence for the presence of histamine in Gabon viper (*Bitis gabonica*) venom. *Toxicon*, 24 : 1159-1162.

- THEAKSTON, R.D.G. (1989) — New techniques in antivenom production and active immunization against snake venoms. *Trans. Royal Society Trop. Med. and Hyg.*, 83 : 433-435.
- THOMAS, R.G. et POUGH, F.H. (1979) — The effect of snake venom on digestion of prey. *Toxicon*, 17 : 221-231.
- VIRAVAN, C., VEERRAVAT, U., WARRELL, M.J., THEAKSTON, R.D.G. et WARRELL, D.A. (1986) — ELISA confirmation of acute and past envenoming by the monocellate Thai cobra (*Naja kaouthia*). *Am. J. Trop. Med.* 35 : 173-181.
- ZELLER, E.A. (1951) — Enzymes as essential components of toxins. *In* : Enzymes Vol.1 (Summer, J.B. et Myrback, K. eds.), pp.986-1013, *Academic Press, New York*.

C. BON
Unité des Venins
Unité associée Institut Pasteur-INSERM U285
Institut Pasteur
25, rue du Dr. Roux
75724 PARIS CEDEX 15

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE D'ÉLEVAGE SUR LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE CHEZ LES AMPHIBIENS

par

Christian DOURNON, Danièle DURAND, Christiane DEMASSIEUX,
Alain BAUTZ et Guy GODBILLON

Résumé — Chez les Amphibiens, des températures d'élevage chaudes ou froides compatibles avec le développement des larves peuvent perturber la différenciation de l'un des sexes, provoquer l'inversion sexuelle et modifier le sex-ratio. Chez les Urodèles, après un traitement à 30-32°C, les mâles génotypiques ZZ sont inversés en femelles phénotypiques chez *Pleurodeles poireti* tandis que les femelles génotypiques ZW sont inversées en mâles phénotypiques chez *Pleurodeles waltl*. Pour cette espèce, un traitement à 32°C appliqué durant la période thermosensible de la différenciation du sexe des gonades (stades 42 à 54) permet d'obtenir 100% d'inversion.

Une étude de la variation du nombre de cellules germinales primordiales (CGP) depuis leur émergence (stades 33-35) jusqu'au début de la différenciation histologique du sexe des gonades (stade 53) chez *Pl. Waltl* révèle que :

- la prolifération des CGP se réalise selon trois phases : Po, durant laquelle l'indice mitotique est pratiquement nul, sa durée dépend du génotype sexuel des larves ; P₁, marquée par une lente reprise de la prolifération des CGP ; P₂, caractérisée par une prolifération différentielle des cellules germinales (CG) selon le sexe phénotypique ultérieur de la gonade ;

- chez les larves élevées à la température ambiante (20°C), l'augmentation du nombre des CG est moins importante dans les futurs testicules que dans les futurs ovaires ;

- chez les larves ZW inversées à 32°C, un ralentissement de la prolifération durant la période P₂ conduit à un nombre de CG encore plus faible chez ces thermonéomâles que chez les mâles standard élevés à 32°C ou à 20°C.

L'existence de voies moléculaires distinctes pour la différenciation testiculaire des mâles standard d'une part et pour celle des thermonéomâles d'autre part permet d'interpréter ces résultats.

Mots-clés : Amphibiens - Inversion gonadique - Différenciation sexuelle - Prolifération gonocytaire - Température d'élevage.

Summary — In amphibians, high or low rearing temperatures allowing larval development can disturb the differentiation in one sex, induce the sexual inversion and modify the sex-ratio. In Urodeles, after a treatment at 30-32°C, genotypic ZZ males become phenotypic females in *Pleurodeles poireti* whereas ZW females become phenotypic males in *Pleurodeles waltl*. In that species, the rearing at 32°C during the thermosensitive period of differentiation of gonadal sex (stage 42 to 54) allows the obtention of 100% sex reversal.

The study of variations of primordial germ cell (PGC) numbers from their emergence

(stages 33-35) up to the beginning of histological differentiation of gonadal sex (stage 53), in *Pleurodeles waltl*, indicates that :

— PGC proliferation is realized through three phases : P₀ characterized by a mitotic index next to nil and a duration controlled by sexual genotype of larvae ; P₁ during which germ cell number increases moderately ; P₂, clearly marked by a differential GC proliferation owing to the ulterior phenotypic sex of gonad ;

— in larve reared at ambient temperature (20°C), the increasing of GC number is lower in future testes than in future ovaries.

— in inverted larvae reared at 32°C, a strong decrease in GC proliferation during P₂ period induces a more lower GC number in these thermoneomales than in standard males reared at 20°C or at 32°C.

The existence of distinct molecular ways for testicular differentiation of whether standard males or thermoneomales allows the interpretation of these results.

Key-words : Amphibians - Sex reversal - Gonadal differentiation - Gonocytes counting - Rearing temperature.

I. INVERSION SEXUELLE PAR LA TEMPÉRATURE D'ÉLEVAGE

A. Mise en évidence de l'inversion sexuelle

En 1898, Hertwig a observé qu'une température élevée accélérât la vitesse de développement des larves d'Amphibiens. Plus tard, l'étude des effets de la température d'élevage sur la différenciation sexuelle fut entreprise par Witschi sur *Rana temporaria* et *Rana sylvatica* (Witschi, 1914, 1929). D'autres Anoures (*Bufo vulgaris*, Piquet, 1930 ; *Rana japonica*, Yoshikura, 1959, 1963 ; *Rana catesbeiana*, Hsü et al., 1971) et un Urodèle (*Hynobius retardatus*, Uchida, 1937a, b) furent ensuite examinés. Dans tous les cas, des modifications histologiques des gonades ainsi que des sex ratios déviés ont été décrits. L'inversion complète et fonctionnelle des gonades et du phénotype sexuel des individus n'avait jamais été démontrée car aucun marqueur permettant l'identification du génotype sexuel n'était connu, et les animaux n'étant élevés que quelques semaines après la métamorphose, leurs descendances n'étaient jamais étudiées. En outre, l'interprétation des résultats obtenus sur ces espèces ne prenait pas en compte l'existence de races sexuelles chez les Amphibiens.

En effet, en fonction de la race sexuelle, l'intersexualité et le sex ratio évoluent différemment durant la période juvénile. Dans les races indifférenciées et semi-différenciées, l'intersexualité peut correspondre à la période de transition de la différenciation testiculaire des mâles génétiques, alors que dans les races différenciées, l'intersexualité peut résulter de l'inversion partielle du phénotype gonadique des femelles génétiques. Ainsi dans l'étude de la différenciation gonadique, il est parfois difficile de distinguer les effets d'un facteur épigénétique, tel que la température d'élevage, de l'évolution normale des gonades. De plus, on considère généralement que les intersexués évoluent en mâles phénotypiques (prévalence mâle). Considérant la masculinisation partielle des femelles génétiques à la métamorphose, il a été très souvent affirmé chez l'Amphibien que l'élevage des larves à une température élevée conduisait à 100% de mâles phénotypiques. Or, des résultats recueillis à partir de deux espèces d'Urodèles, *Hynobius retardatus* (Uchida, 1937a, b) et *Pleurodeles waltl* (Dournon, 1981 ; Houillon et Dournon, 1986) montrent que des intersexués peuvent aussi évoluer en femelles phénotypiques.

Chez les Reptiles, la première observation suggérant que la température d'incubation des oeufs pourrait modifier le sex ratio à l'éclosion, fut réalisée par Charnier (1966) sur un Lézard nord-africain *Agama agama*. En 1971, Pieau a obtenu des sex ratios déviés pour les embryons de deux espèces de Tortues, *Emys orbicularis* et *Testudo graeca* ; en 1972, il démontre pour la première fois que la température d'incubation est la cause de la déviation du sex ratio, qu'une température basse produit 100% de mâles phénotypiques, qu'une température élevée produit 100% de femelles. Depuis, l'action de la température a été montrée chez de nombreuses espèces de Chéloniens, de Crocodiliens et quelques espèces de Squamates.

Ces considérations et ces résultats nous ont conduit à rechercher des conditions permettant de démontrer sans ambiguïté l'inversion sexuelle par la température, et au-delà, à étudier la détermination et la différenciation sexuelle chez deux Salamandridés, le Triton *Pleurodeles waltl* et le Triton *Pleurodeles poireti*. Ces deux Urodèles sont de race sexuelle différenciée et peuvent être hybridés.

P. waltl est originaire de la péninsule ibérique et de l'ouest de l'Afrique du Nord. Introduit en France par Louis Gallien dans les années 50, il est maintenu en élevage dans de nombreux laboratoires.

P. poireti, plus petit que *P. waltl*, est originaire de l'est de l'Afrique du Nord. Il est difficile à élever en laboratoire et ses descendance sont peu abondantes, quelques dizaines d'oeufs.

B. Réponses différentes selon la température

En règle générale, chez les Amphibiens, l'élevage des larves à la température ambiante (de 16 à 24°C) conduit à un sex ratio de un mâle pour une femelle, alors qu'à des températures chaudes ou froides, compatibles avec le développement, la différenciation gonadique est perturbée dans l'un des sexes génotypiques et le sex ratio dévié.

1. Effets du froid

Witschi (1914) et Piquet (1930) avaient maintenu des têtards de *Rana temporaria* à 10-12°C et obtenu un excès de femelles phénotypiques juvéniles. Ces deux auteurs n'ayant pas défini la race sexuelle des *Rana* utilisées, leurs observations devraient être renouvelées.

Chez *P. waltl*, il est très difficile d'élever des larves à des températures basses à cause des mycoses et des épizooties. De plus, le développement est extrêmement ralenti. Dans ces conditions d'élevage, un juvénile possédant testicule et ovaire a été obtenu. Il était issu d'un croisement standard. Cet animal pourrait être un mâle génotypique ZZ partiellement féminisé (Dournon, Houillon et Pieau, 1990). Cependant, nous n'avons encore recueilli aucune preuve de l'obtention par le froid d'une thermonéofemelle ZZ chez *P. waltl*.

2. Effets de la chaleur

Witschi (1929) a élevé à 32±2°C des têtards de *Rana sylvatica* de race sexuellement différenciée. Au début du traitement thermique, les gonades avaient commencé leur différenciation sexuelle et le sex ratio était équilibré

(15 mâles-13 femelles). A la fin du traitement, sur 115 individus, 61 possédaient des testicules et 53 présentaient des ovaires transformés plus ou moins masculinisés. Si l'expérience montre une masculinisation par la chaleur, il n'en résulte pas 100% de mâles phénotypiques. Les expériences ultérieures réalisées chez les Anoures (Piquet, 1930 ; Yoshikura, 1959, 1963 ; Hsü *et al.*, 1971) et chez un Urodèle (Uchida, 1937b) n'ont fait que corroborer les observations de Witschi.

Chez *Pleurodeles poireti* et *Pleurodeles waltl*, la détermination du sexe génotypique est du type ZZ/ZW. Chez *P. poireti*, l'homogamétie mâle ZZ et l'hétéromorphisme des gonosomes méiotiques Z et W ont été démontrés après traitement des larves par le benzoate d'œstradiol (Lacroix, 1970). Chez *P. waltl*, l'homogamétie mâle ZZ a été démontrée par l'analyse des descendance d'individus traités au benzoate d'œstradiol (Gallien, 1951) et l'hétérogamétie femelle par des greffes embryonnaires (Collenot, 1973).

a. Inversion des mâles

Nous avons étudié les effets de la température sur les larves de *P. poireti* issues de croisements standard (mâle ZZ x femelle ZW). A la température ambiante (20±2°C) le sex ratio est 1 mâle-1 femelle, tandis qu'à 30°C le sex ratio est dévié d'une façon significative en faveur des femelles indiquant que des mâles génotypiques ZZ sont devenus des femelles phénotypiques fonctionnelles (thermonéofemelles ZZ). De plus, quelques intersexués présentent à la fois des ovaires et des testicules (Dournon *et al.*, 1984).

b. Inversion des femelles

Les effets de la température ont aussi été étudiés chez *P. waltl*, sur plusieurs types de croisements ; deux d'entre eux sont retenus ici :

1 - mâles standard ZZ x femelles standard ZW

2 - mâles standard ZZ x femelles WW

A la température ambiante, les sex ratios observés sont en accord avec les sex ratios théoriques ; respectivement 617 mâles et 639 femelles sur 20 croisements du premier type (50% ♂ - 50% ♀) et 0 mâle et 847 femelles sur 8 croisements du second type (100% ♀).

A 30°C, pour les animaux du premier type de croisement, le sex ratio est dévié en faveur des mâles ; de plus, des intersexués possédant des ovaires et testicules ont été obtenus.

Toujours à 30°C, parmi les animaux, tous de génotype femelle ZW, du second type de croisement, des mâles et des intersexués se sont différenciés.

A 32°C, quel que soit le type de croisement, tous les individus se différencient en mâles phénotypiques.

Ainsi, nous avons apporté les premières preuves de l'inversion phénotypique par la température des mâles génotypiques ZZ chez *P. poireti* (Dournon *et al.*, 1984) et des femelles génotypiques ZW chez *P. waltl* (Dournon et Houillon, 1984, 1985).

Nos résultats ont aussi mis en évidence les effets opposés de la chaleur chez *P. poireti* et chez *P. waltl*, deux espèces proches phylogénétiquement.

C. Démonstration irréfutable de l'inversion sexuelle par la température

La démonstration irréfutable de l'inversion fonctionnelle du sexe par un facteur épigénétique a été apportée par l'analyse de descendance, dont

certaines, bien que monogéniques, se différencient sous l'influence de la chaleur en individus des deux sexes phénotypiques.

Des caractères liés au sexe et l'identification des chromosomes sexuels ont été utilisés pour compléter la démonstration. Mais en retour, des analyses de descendance ont aussi permis de confirmer les caractères liés au sexe et de développer l'étude des gonosomes (Lacroix *et al.*, 1990).

La preuve de l'inversion par la température d'élevage, mais aussi la confirmation du mécanisme de type ZZ/ZW de la détermination du sexe génotypique, ont été obtenues pour les deux Tritons étudiés. Chez *P. poireti*, les thermonéofemelles ZZ ont été croisées avec des mâles standard ZZ ; leurs descendances élevées à la température du laboratoire ne comprennent que des mâles (Dournon *et al.*, 1948). Chez *P. waltl*, 80 descendances (4511 juvéniles et adultes) issues de thermonéomâles ZW obtenus à 32°C et de femelles standard ZW ont été étudiées pour le sex ratio. Dans tous les cas, les descendances ont été élevées à la température ambiante (20±2°C). Les sex ratios observés concordent avec les prévisions théoriques (Dournon et Houillon, 1983, 1984).

D. Période thermosensible pour la différenciation sexuelle des gonades

Les effets des changements de température au cours de la période larvaire sur le sex ratio ont été étudiés. Chez *P. waltl*, les larves ont tout d'abord été élevées à la température du laboratoire, puis, à un stade précis, portées à 30°, 31° ou 32°C pendant une période définie et enfin replacées à la température ambiante. Des larves témoins ont été maintenues à la température ambiante. Le travail, qui a porté sur 2304 larves issues de 15 descendances différentes, montre que la thermosensibilité de la différenciation sexuelle des gonades diffère selon les individus mais n'est pas significativement différente selon les descendances. A 31° et à 32°C, le traitement est plus efficace qu'à 30°C. A 30°C, les femelles génotypiques ne sont pas toutes inversées lorsqu'elles sont traitées entre les stades 43 et 54 (de la table de développement de Gallien et Durocher, 1957). En revanche, après un traitement à 32°C appliqué durant la même période, toutes les femelles génotypiques sont inversées (Dournon et Houillon, 1985) (Fig.1).

Chez *P. poireti*, la période de traitement à 30°C correspond en efficacité et en durée à celle de *P. waltl*. Cependant, dans cette espèce, une efficacité à 100% du traitement à 32°C n'a pu être encore démontrée du fait du nombre réduit d'animaux disponibles.

II. DIFFÉRENCIATION PRÉCOCE DU SEXE DE LA GONADE

La sélection de géniteurs particuliers permettant d'obtenir des descendances à 100% ZZ ou à 100% ZW, la maîtrise de la période thermosensible donnant accès au contrôle des différenciations testiculaire et ovarienne, la diagnostic rapide et fiable du génotype sexuel (Ferrier *et al.*, 1980, 1983 ; Dournon *et al.*, 1988) étaient trois conditions préalables pour aborder les aspects cellulaires, biochimiques et moléculaires de la différenciation précoce du sexe des gonades.

Une gonade est constituée des deux lignées cellulaires, la lignée germinale et la lignée somatique. Nous avons entrepris l'étude de la lignée

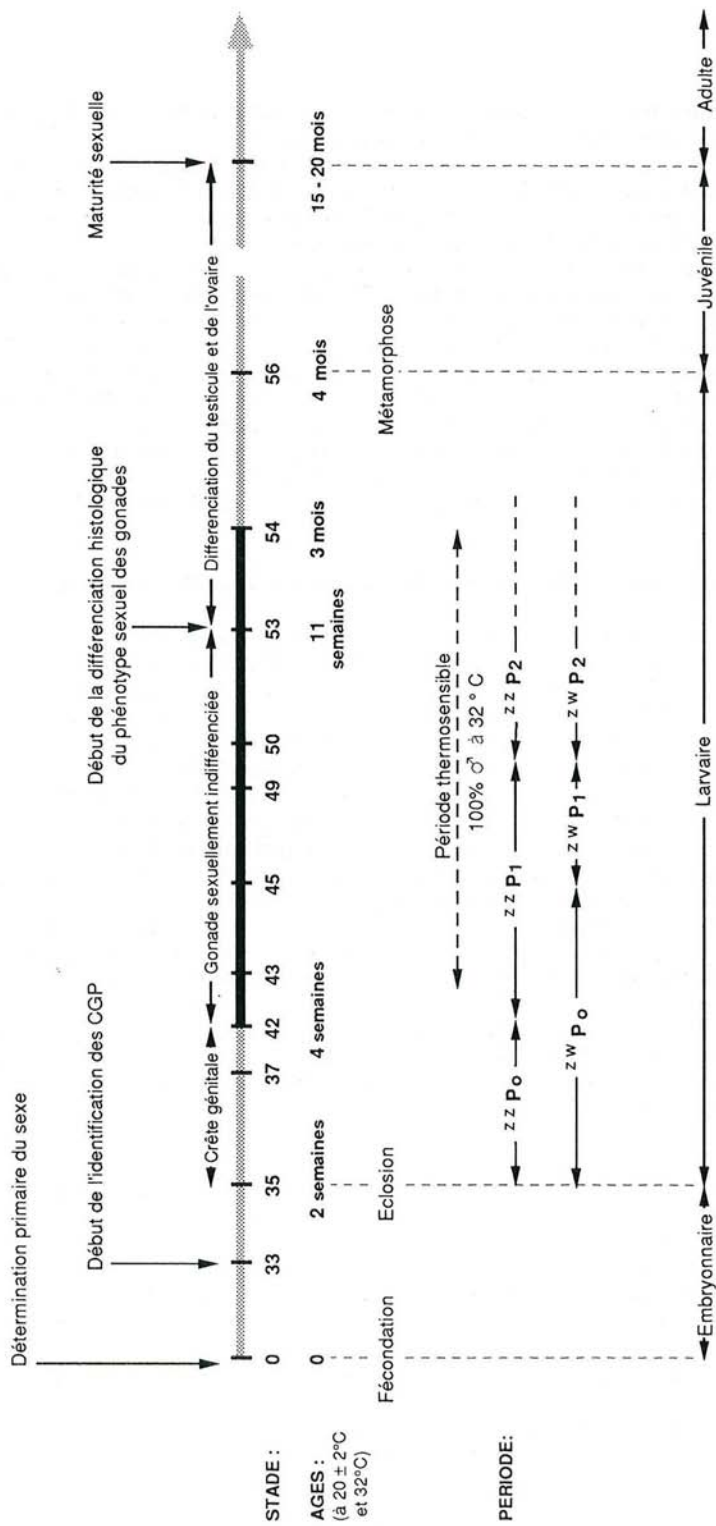


Figure 1 : Période thermosensible pour la différenciation sexuelle des gonades et périodes P₀, P₁, P₂, de prolifération des cellules germinales chez le triton *Pleurodeles waltl*.

germinale ; notre objectif est la détection de modifications de la prolifération cellulaire.

A la température ambiante chez *P.waltl*, les deux crêtes génitales sont colonisées par les cellules germinales primordiales (CGP) au début de la vie larvaire (stades 33-35). Entre 4 et 5 semaines (stades 43-45), les crêtes génitales commencent à se pédiculiser et deviennent des gonades sexuellement indifférenciées. Vers deux mois (stade 53), celles-ci amorcent leur différenciation sexuelle ; histologiquement, il devient possible de discerner un futur testicule d'un futur ovaire (Fig.1).

A. Approche cellulaire de la différenciation

Disposant de descendance standard et de descendance monogéniques mâles (100% ♂ ZZ) ou femelles (100% ♀ ZW), nous avons dénombré les CGP depuis leur émergence (stades 33-35) jusqu'au début de la différenciation sexuelle des gonades (stade 53), afin de suivre les modifications de leur prolifération. Dans notre hypothèse de travail, conforme à l'opinion générale, nous avons considéré que les cellules somatiques de la gonade interagissent avec les cellules germinales pour induire la différenciation sexuelle de celles-ci. Notre hypothèse s'appuie sur les expériences qui portent sur des greffes hétérosexuées de territoires embryonnaires. Dans tous les cas, la différenciation des cellules germinales (ZZ ou ZW) hétérotopiques est toujours conforme au phénotype sexuel des cellules somatiques hôtes (ZZ ou ZW) (Humphrey, 1945 ; Collenot, 1973 ; Dournon et Godbillon, en préparation).

Entre les stades 33 et 53, la prolifération des cellules germinales se déroule en trois phases. La première phase est caractérisée par la quasi-absence de divisions goniales (5 mitoses pour 10854 CGP) et, pour cette raison, a été appelée période Po. La seconde phase est caractérisée par la reprise des mitoses goniales et par une prolifération lente ; elle a été appelée période P₁. La troisième phase, la période P₂, est caractérisée par une prolifération différentielle selon le sexe.

1. Période Po

Durant la période Po, qui correspond à l'édification des crêtes génitales, une descendance est caractérisée par le nombre moyen de CGP par larve. Une étude portant sur 15 descendance standard, monogéniques mâles et monogéniques femelles, a permis de définir quatre groupes principaux. Dans le groupe I, les descendance sont caractérisées par un nombre moyen d'environ 96-97 CGP ; c'est le cas des descendance sauvages provenant du Portugal et de certaines descendance de notre élevage. Celles du groupe II sont caractérisées par 50-51 CGP en moyenne et celles du groupe III par 30-31 CGP. Enfin, d'autres descendance, caractérisées par 18 CGP, appartiennent au groupe IV.

Cette variation du nombre moyen de CGP par descendance, observée durant la période Po, a été interprétée comme l'expression de la modification de l'effectif de la population germinale avant le début de la période Po, c'est-à-dire durant la période au cours de laquelle il est actuellement impossible d'identifier les cellules germinales. Selon notre hypothèse, la population germinale du groupe I serait le résultat d'au moins 3 cycles mitotiques faisant passer le nombre moyen de CGP de 18 à 30-31 (groupe III), à 50-51 (groupe II), à 96-97 (groupe I) durant la période embryonnaire.

Durant la période Po, le nombre de CGP d'une larve est indépendant de son génotype sexuel. Mais la durée de la période Po est, elle, liée au génotype sexuel des larves. La période $ZZPo$ des mâles génotypiques se termine au stade 42 et dure 14 jours tant à la température ambiante ($20 \pm 2^\circ C$) qu'à $32^\circ C$. La période $ZWPo$ des femelles génotypiques se termine plus tard, après le stade 45, et dure 20 jours à $20 \pm 2^\circ C$ comme à $32^\circ C$ (Fig.1).

Ainsi, les numérations cellulaires réalisées durant la période Po ont permis de mettre en évidence au cours de la différenciation sexuelle une manifestation différentielle précoce du génotype sexuel (Durnon *et al.*, 1989, 1990).

2. Périodes P_1 et P_2

La fin de la période $ZZPo$ ainsi que celle de la période $ZWPo$ sont caractérisées par la reprise des divisions goniales. Celles-ci marquent en outre le début de la période P_1 . Quel que soit le génotype sexuel, la troisième période, P_2 , est comprise entre les stades 49-50 et 53. Durant cette période P_2 , deux observations importantes ont été réalisées.

La première porte sur des larves élevées à la température ambiante. L'augmentation du nombre de cellules germinales est plus rapide et plus importante dans les futurs ovaires que dans les futurs testicules. Au stade 53, les gonades femelles des larves ZW contiennent $634,0 \pm 95,2$ cellules germinales alors que les gonades mâles des larves ZZ contiennent $489,8 \pm 56,4$ cellules germinales. Une prolifération intense des cellules germinales dans les gonades encore sexuellement indifférenciées caractérise les futurs ovaires des individus ZW tandis qu'une prolifération plus faible caractérise les futurs testicules des individus ZZ.

La seconde observation a été faite après élevage des larves à $32^\circ C$. A cette température, la prolifération des cellules germinales chez les larves ZW dont les gonades se différencient alors en néotesticules, est fortement ralentie. Aucune cellule germinale en dégénérescence n'a été observée. Au stade 53, les néotesticules contiennent $208,6 \pm 31,8$ cellules germinales alors que les testicules des individus ZZ élevés à $32^\circ C$ contiennent $476,0 \pm 95,5$ cellules germinales.

A $32^\circ C$ comme à $20^\circ C$, la prolifération des cellules germinales caractérise donc le phénotype sexuel ultérieur à la gonade (Fig.2).

Chez les larves de génotype femelle ZW, l'abaissement significatif du nombre de cellules germinales et le ralentissement de la prolifération durant la période P_2 sont corrélatifs à la masculinisation des gonades.

En conclusion, chez *Pleurodeles waltl* durant les 7 semaines qui précèdent la différenciation histologique du sexe des gonades et qui correspondent à la période thermosensible pour l'inversion sexuelle, les modifications différentielles de la prolifération des cellules germinales indiquent que des événements d'ordre moléculaire interviennent déjà pour contrôler la différenciation ultérieure en testicule ou en ovaire des gonades.

Après la différenciation histologique du sexe des gonades chez les Vertébrés hétérothermes comme chez les Vertébrés homéothermes, le sexe hétérogamétique (σ^X XY ou ϕ^Z ZW) possède plus de cellules germinales que le sexe homogamétique (ϕ^X XX ou σ^Z ZZ). Or, chez les Mammifères, lorsque les gonades des femelles génotypiques XX sont masculinisées, on constate, comme chez le Pleurodèle, un abaissement significatif du nombre de cellules germinales (Vigier *et al.*, 1987). D'après ces constatations, nous formulons l'hypothèse selon laquelle il existerait des voies moléculaires distinctes pour la

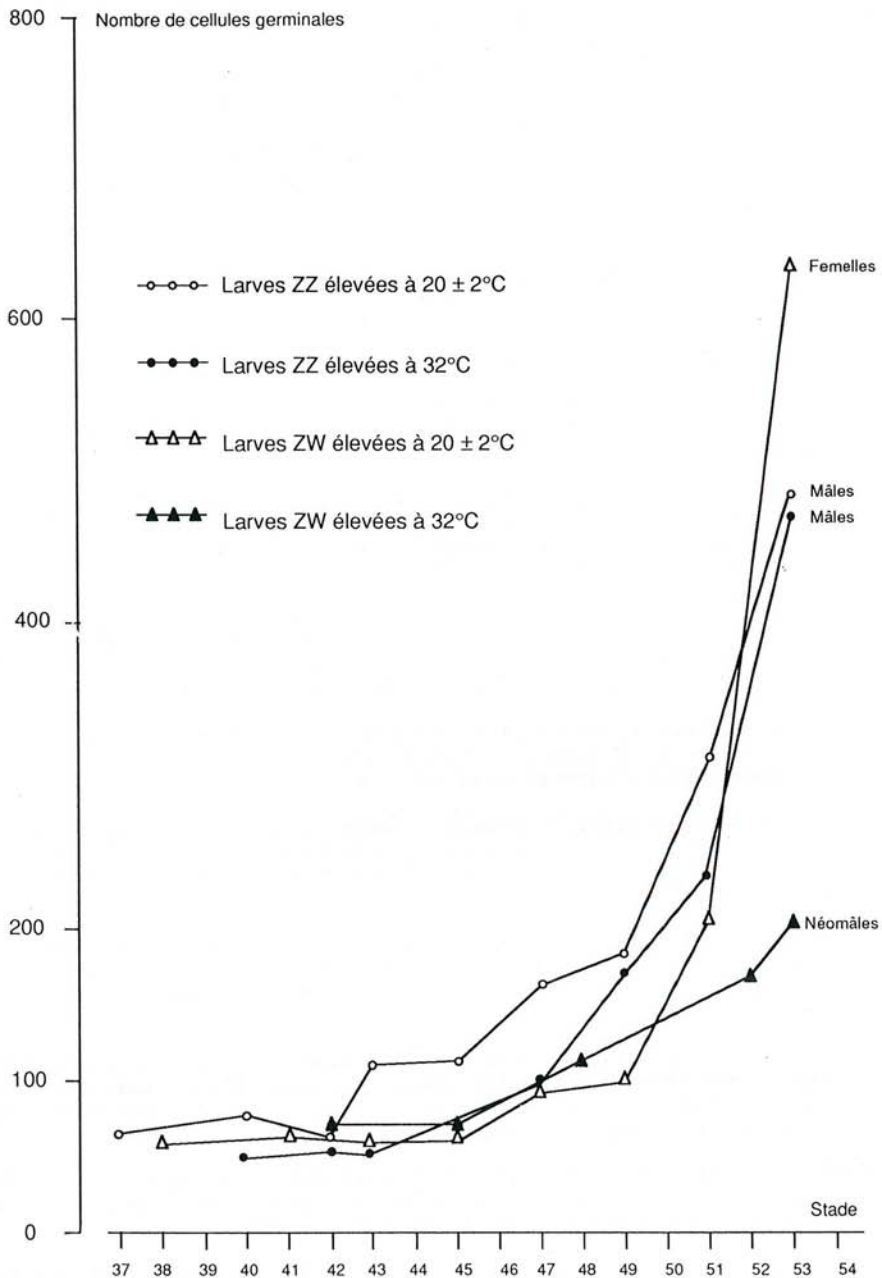


Figure 2 : Prolifération différentielle des cellules germinales avant la différenciation histologique du sexe de la gonade (st.53) chez *Pleurodeles waltl*.

différenciation testiculaire : une voie suivie lorsque la différenciation testiculaire est conforme au génotype sexuel, d'autres conduisant aux inversions des gonades des femelles XX et des femelles ZW.

L'impact de la température au niveau moléculaire est inconnu. Il devra être précisé chez des Amphibiens actuels qui présentent à température ambiante, un déterminisme génétique du sexe. Etant aussi précisé chez d'autres Vertébrés actuels thermosensibles, il sera alors probablement possible d'envisager le rôle de la température au cours de l'Evolution de certains hétérothermes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHARNIER, M. (1966) — Action de la température sur la sex ratio chez l'embryon d'*Agama agama* (Agamidae, Lacertilien). *C.R.Soc.Biol. (Paris)*, 160 : 620-622.
- COLLENOT, A. (1973) — Obtention, par la méthode des greffes de gonades embryonnaires, d'une femelle à descendance unisexuée femelle, chez le triton *Pleurodeles waltlii* Michah. *Experientia*, 29 : 885-887.
- DOURNON, C. (1981) — Action d'une température d'élevage de 30°C sur la morphogenèse, l'inversion fonctionnelle du phénotype sexuel et la prolifération des cellules germinales chez l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltlii*. Ph. D. Thesis, Université P. et M. Curie, Paris, 204 p.
- DOURNON, C., COLLENOT, A. et LAUTHIER, M. (1988) — Sex-linked peptidase-1 patterns in *Pleurodeles waltlii* Michah. (Urodele Amphibian) : genetic evidence for a new codominant allele on the W sex chromosome and identification of ZZ, ZW and WW sexual genotypes. *Reprod. Nutr. Dév.*, 28 : 979-987.
- DOURNON, C., GUILLET, F., BOUCHER, D. et LACROIX, J.C. (1984) — Cytogenetic and genetic evidence of male sexual inversion by heat treatment in the newt *Pleurodeles poireti*. *Chromosoma*, 90 : 261-264.
- DOURNON, C. et HOUILLON, C. (1983) — Déterminisme génétique du sexe : démonstration à partir d'animaux à phénotype sexuel inversé sous l'action de la température chez l'Amphibien Urodèle, *Pleurodeles waltlii* Michah. *C.R. Séances Acad. Sci. (Paris)* (III). 296 : 779-782.
- DOURNON, C. et HOUILLON, C. (1984) — Démonstration génétique de l'inversion fonctionnelle du phénotype sexuel femelle sous l'action de la température d'élevage chez l'Amphibien Urodèle : *Pleurodeles waltlii* Michah. *Reprod. Nutr. Dév.*, 24 : 361-378.
- DOURNON, C. et HOUILLON, C. (1985) — Thermosensibilité de la différenciation sexuelle chez l'Amphibien Urodèle, *Pleurodeles waltlii* Michah. Conditions pour obtenir l'inversion du phénotype sexuel de toutes les femelles génétiques sous l'action de la température d'élevage. *Reprod. Nutr. Dév.*, 25 : 671-688.
- DOURNON, C., DEMASSIEUX, C., DURAND, D. et LESIMPLE, M. (1989) — Primordial germ cell proliferation in the salamander *Pleurodeles waltlii* : genetic control before gonadal differentiation. *Int. J. Dev. Biol.*, 33 : 477-485.
- DOURNON, C., DURAND, D., DEMASSIEUX, C. et LESIMPLE, M. (1990) — Differential germ cell proliferation in the salamander *Pleurodeles waltlii* : control by sexual genotype and by thermal epigenetic factor before differentiation of sexual phenotype of gonads. *Int. J. Dev. Biol.*, 34 : 365-375.

- DOURNON, C., HOUILLON, C. et PIEAU, C. (1990) — Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. *Int. J. Dev. Biol.*, 34 : 81-92.
- FERRIER, V., GASSER, F., JAYLET, A. et CAYROL, C. (1983) — A genetic study of various enzyme polymorphisms in *Pleurodeles waltlii* (Urodèle Amphibien). II. Peptidases : demonstration of sex linkage. *Biochem. Genet.*, 21 : 535-549.
- FERRIER, V., JAYLET, A., CAYROL, C., GASSER, F. et BUISAN, J.J. (1980) — Etude électrophorétique des peptidases erythrocytaires chez *Pleurodeles waltlii* (Amphibien Urodèle) : mise en évidence d'une liaison avec le sexe. *C.R. Séances Acad. Sci. (Paris)*. 290 : 571-574.
- GALLIEN, L. (1951) — Sur la descendance unisexuée d'une femelle de *Pleurodeles waltlii* Michah. ayant subi pendant sa phase larvaire l'action gynogène du benzoate d'oestradiol. *C.R. Séances Acad. Sci. Paris (D)*. 233 : 828-830.
- GALLIEN, L. et DUROCHER, M. (1957) — Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltlii*. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 91 : 97-114.
- HERTWIG, O. (1898) — Über den Einfluss der Temperatur auf die Entwicklung von *Rana fusca* und *Rana esculenta*. *Arch. mikr. Anat. Entw.*, 51 : 319-381.
- HOUILLON, C. et DOURNON, C. (1986) — Evolution du tractus uro-génital chez les Pleurodèles chimères à corps double. Effet de position dans les interactions entre glandes génitales de sexe différent. *Reprod. Nutr. Dév.*, 26(5A) : 33-53.
- HSÜ, C.Y., YÜ, N.W. et LIANG, H.M. (1971) — Induction of sex reversal in female tadpoles of *Rana catesbeiana* by temperature treatment. *Endocrinol. Jpn.*, 18 : 243-251.
- HUMPHREY, R.R. (1945) — Sex determination in Ambystomid Salamanders : a study of the progeny of females experimentally converted into males. *Amer. J. Anat.*, 76 : 33-66.
- LACROIX, J.C. (1970) — Mise en évidence sur les chromosomes en écouvillon de *Pleurodeles poireti* Gervais, Amphibien Urodèle, d'une structure liée au sexe, identifiant le bivalent sexuel et marquant le chromosome W. *C.R. Séances Acad. Sci. (Paris) (D)*. 271 : 102-104.
- LACROIX, J.C., AZZOUZ, R., SIMON, F., BELLINI, M., CHARLEMAGNE, J. et DOURNON, C. (1990) — Lampbrush W and Z heterochromosome characterization with a monoclonal antibody and heat induced chromosomal markers in the newt *Pleurodeles waltlii* : W chromosome plays a role in female sex determination. *Chromosoma*, 99 : 307-314.
- PIEAU, C. (1971) — Sur la proportion sexuelle chez les embryons de deux Chéloniens (*Testudo graeca* L. et *Emys orbicularis* L.) issus d'oeufs incubés artificiellement. *C.R. Séances Acad. Sci. (Paris) (D)*. 272 : 3071-3074.
- PIEAU, C. (1972) — Effets de la température sur le développement des glandes génitales chez les embryons de deux chéloniens, *Emys orbicularis* L. et *Testudo graeca* L.. *C.R. Séances Acad. Sci. (Paris) (D)*. 274 : 719-722.
- PIQUET, J. (1930) — Détermination du sexe chez les Batraciens en fonction de la température. *Rev. Suisse Zool.*, 37 : 173-281.
- UCHIDA, T. (1937a) — Studies on the sexuality of Amphibia. II Sexual induction in a sexually semi-differentiated salamander. *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. (Zool.)*, 6 : 35-58.

- UCHIDA, T. (1937b) — Studies on the sexuality of Amphibia. III Sex transformation in *Hynobius retardatus* by high temperature. *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. (Zool.)*, 6 : 59-70.
- VIGIER, B., WATRIN, F., MAGRE, S., TRAN, D. et JOSSO, N. (1987) — Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it *in vitro*. *Development*. 100 : 43-55.
- WITSCHI, E. (1914) — Experimentelle Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Keimdrüsen von *Rana temporaria*. *Arch. Mikr. Anat. Entw.*, 85 : 9-113.
- WITSCHI, E. (1929) — Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. II Sex-Reversal in female tadpoles of *Rana sylvatica* following the application of high temperature. *J. Exp. Zool.*, 52 : 267-291.
- YOSHIKURA, M. (1959) — The action of the pituitary in sex differentiation and sex-reversal in amphibians. II Effects of high temperature on the gonads of hypophysectomized frog larvae. *Kumamoto J. Sci. (B)*. 4 : 69-101.
- YOSHIKURA, M. (1963) — Influence of high temperature on the development of gonads of thiourea-treated frog tadpoles. *Kumamoto J. Sci. (B)*. 6 : 70-101.
- C. DOURNON, D. DURAND, C. DEMASSIEUX, A. BAUTZ et G. GODBILLON
Laboratoire de Biologie expérimentale - Immunologie
Université de Nancy I - B.P.239
54506 VANDŒUVRE-LES-NANCY Cedex (FRANCE)

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CINÉTIQUE DE LA SPERMATOGENÈSE CHEZ *Rana esculenta* ET *Rana lessonae* EN JUILLET

par

Florence NEYRAND de LEFFEMBERG et Jean-Marie EXBRAYAT

Résumé — Chez des *Rana esculenta* et *Rana lessonae* capturées dans les Dombes en juillet, à la fin de la période de reproduction, une élévation de température accélère la spermatogenèse. L'étude confirme en outre que la spermatogénèse est plus rapide chez *Rana esculenta* que chez *Rana lessonae*, notamment à 20° et 30°C. L'indice d'incorporation de la thymidine tritiée par les stades germinaux préméiotiques est sensiblement identique à 5°C chez les deux espèces. Par contre, à 20 et 30°C, il est plus important chez *Rana esculenta*. Il existe donc vraisemblablement des différences au niveau de la physiologie de la reproduction de ces deux espèces appartenant au même complexe, ce qui ne fait que conforter les données de la systématique.

Mots-clés : *Rana esculenta*, *Rana lessonae*, spermatogenèse, histoautoradiographie.

Summary — In July, at the end of breeding period, the spermatogenesis is accelerated by an increase of temperature in both *Rana esculenta* and *Rana lessonae*. In other way, our study corroborates that the spermatogenesis is faster in *Rana esculenta* than *Rana lessonae* at 20° or 30°C. Incorporation index of tritiated thymidin is equal for both species, at 5°C. At contrary, it is more important in *Rana esculenta* than *Rana lessonae*, at 20° and 30°C. It seems to exist physiological differences between the two species ; this fact corroborates the data of systematic.

Key-words : *Rana esculenta*, *Rana lessonae*, spermatogenesis, histoautoradiography.

I. INTRODUCTION

Les cycles spermatogénétiques de *Rana esculenta* et *Rana lessonae* sont de type potentiellement continu, c'est-à-dire que l'on observe en permanence des divisions de spermatogonies mais que la poursuite de la spermatogenèse est soumise aux facteurs externes et, en particulier, aux conditions de température. En hiver, on observe quelques spermatogonies en division et des spermatocytes primaires ; au printemps (avril-mai), toutes les catégories spermatogénétiques sont représentées (Delsol *et al.*, 1981 ; Guyétant, 1986). Divers travaux dans lesquels *Rana esculenta* est considérée comme une espèce unique ont permis de mettre en évidence les effets de la température sur la gamétogenèse. Pendant l'hiver, si des individus sont placés artificiellement dans des conditions de température estivale, la spermatogenèse est observée ; inversement, aux périodes normales d'activité sexuelle, la spermatogenèse est arrêtée chez des animaux qui sont élevés artificiellement dans des conditions de températures hivernales (Galgano, 1934 ; Lofts, 1964).

Depuis quelques années, on sait que *Rana esculenta* ne correspond pas à une espèce unique mais à un complexe regroupant trois espèces voisines : *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* et *Rana esculenta*, cette dernière étant en réalité l'hybride des deux autres (Berger, 1964, 1976 ; voir discussion in Dubois, 1977). Il nous est donc apparu intéressant de reconsidérer la cinétique de la spermatogenèse et ses modulations par la température chez les différentes espèces de ce complexe. Dans de précédents travaux, nous avons pu démontrer que la cinétique spermatogénétique globale des deux espèces *Rana esculenta* et *Rana lessonae* était comparable, bien que des variations notables apparaissent au niveau des temps de différenciation des stades gamétiques. En outre, il a pu être démontré que 20°C représente une limite thermique au-dessous de laquelle la spermatogenèse est ralentie aussi bien chez *Rana esculenta* que chez *Rana lessonae* (Neyrand de Leffemberg et Exbrayat, 1987). Enfin, l'évolution du marquage radio-actif par la thymidine tritiée des cellules germinales mâles chez des animaux capturés en avril, c'est-à-dire au début de la phase de reproduction, et soumis à des variations de température est sensiblement différente chez les deux espèces (Neyrand de Leffemberg, 1988).

Dans le travail présenté ici, nous avons étudié l'influence de la température sur la division des cellules germinales au cours de la spermatogenèse chez des mâles capturés en juillet, donc à la fin de la période de reproduction, appartenant aux deux espèces *Rana lessonae* et *Rana esculenta*.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les animaux étudiés, 24 *Rana lessonae* et 25 *Rana esculenta*, déterminés grâce à R. Guyétant, ont été capturés en juillet dans les Dombes (Ain, France), puis ramenés au laboratoire. 9 *Rana esculenta* et 9 *Rana lessonae* ont été élevées à l'extérieur, à 20°C, température moyenne normale de l'air mesurée pendant trois semaines à cette période. Deux autres lots, l'un de 10 *R. esculenta* et 9 *R. lessonae*, l'autre de 7 individus de chaque espèce ont été maintenus artificiellement à 5°C et 30°C respectivement. Ces animaux, tous des mâles adultes, ont reçu une injection intrapéritonéale de thymidine tritiée à raison de 0,7 $\mu\text{Ci/g}$ (don de D. Pansu, E.P.H.E., Lyon). La thymidine tritiée représente en effet un traceur radio-actif spécifique de l'ADN ; il est incorporé dans les cellules en division, c'est-à-dire au niveau des spermatogonies et des spermatocytes de premier ordre dans le cas de la lignée germinale mâle.

Les animaux ont été sacrifiés de 1 heure à 14 jours suivant l'injection. L'étude histologique quantitative a été réalisée par la méthode des numérations ponctuelles effectuées à l'intégrateur de Zeiss (Solari, 1973). Pour chaque temps d'expérimentation donné, cette étude a porté sur un ou deux animaux et, dans ce dernier cas, sur l'animal présentant le stade spermatogénétique marqué le plus évolué.

Deux indices chiffrés déjà utilisés dans de précédents travaux (Neyrand de Leffemberg, 1988) ont été déterminés. Ces indices, définis par De Fellice et

Rasch (1969) pour l'étude cinétique de la spermatogenèse chez des Poissons Téléostéens sont :

— la fréquence de marquage total

$$F_T = \frac{\text{nombre total de cellules germinales marquées}}{\text{nombre total de cellules germinales}}$$

— l'indice d'incorporation de chaque stade spermatogénétique :

$$I_i = \frac{\text{nombre de cellules germinales marquées d'une catégorie}}{\text{nombre total de cellules de chaque catégorie}}$$

Ces deux indices ont été définis pour chaque animal sur trente champs optiques dispersés dans la partie moyenne du testicule. 220 cystes en moyenne ont été considérés pour chaque animal.

III. OBSERVATIONS ET RÉSULTATS

A. Fréquence de marquage total F_t (Tab.I)

- Chez *Rana lessonae*, à 30°C, 7 jours après l'injection, F_t atteint 33% ; 12 jours après, elle atteint 47%. A 20°C, la F_t maximale (26%) est observée 8 heures après l'injection puis elle semble se stabiliser (17 à 21%). A 5°C, la F_t n'atteint jamais 20% et varie peu (14 à 19%), quel que soit le temps d'expérimentation.

- Chez *Rana esculenta*, à 30°C, la F_t atteint 27% dans l'heure qui suit l'injection. Après 10 jours, elle atteint 43% et finit par se stabiliser à 46-48% pour ne plus varier jusqu'à la fin de l'expérience. A 20°C, la F_t maximale (23%) est atteinte 4 heures après l'injection, puis elle subit quelques fluctuations : elle est égale à 25% quatre jours après l'injection, de 14 à 15% et plus sept jours après le début de l'expérience. A 5°C, enfin, la F_t maximale est atteinte quatre heures après l'injection (34%). Après 14 jours, elle finit par atteindre 32% après avoir subi quelques fluctuations. Quelques dégénérescences affectant 4% de l'ensemble des cellules germinales ont été observées dans ces dernières conditions de température.

B. Indice d'incorporation I_i

- Chez *Rana lessonae* (Tab.IIa, b, c)

A 30°C, le marquage radio-actif des cellules germinales est observé chez l'animal sacrifié une heure après l'injection. On constate alors que 20% des spermatocytes primaires sont marqués. Les spermatocytes secondaires radio-actifs apparaissent 4 heures après le début de l'expérimentation ; leur I_i est alors égal à 44%. Après quatre jours, l'indice d'incorporation correspondant aux spermatocytes secondaires est de 77%. Ce n'est que 12 jours après l'injection

Temps	Températures	<i>Rana lessonae</i>	<i>Rana esculenta</i>
1 heure	30°C	13%	27%
	20°C	17%	15%
	5°C	18%	19%
2 heures	30°C	14%	28%
	20°C	7%	5%
	5°C	10%	15%
4 heures	30°C	24%	28%
	20°C	23%	23%
	5°C	14%	34%
8 heures	30°C	15%	30%
	20°C	26%	17%
	5°C	—	—
2 jours	30°C	12%	35%
	20°C	23%	18%
	5°C	17%	12%
4 jours	30°C	20%	31%
	20°C	17%	25%
	5°C	18%	15%
7 jours	30°C	33%	30%
	20°C	17%	14%
	5°C	14%	20%
10 jours	30°C	21%	43%
12 jours	30°C	47%	46%
14 jours	30°C	—	48%
	20°C	21%	15%
	5°C	19%	32%

Tableau I : Comparaison des fréquences de marquage total dans la lignée germinale des testicules chez *Rana esculenta* et *Rana lessonae* ayant subi une injection de thymidine tritiée.

que l'on peut observer la présence de spermatides allongées marquées (Ii=83%). A cette température, aucun spermatozoïde marqué n'a été décelé pendant toute la durée de l'expérimentation (Tab.IIa).

a

Temps	Spermatogonies I	Spermatogonies II	Spermatocytes I	Spermatocytes II	Jeunes Spermatides	Spermatides allongées	Spermatozoïdes
1 h	17%	29%	20%	—	—	—	—
2 h	—	21%	50%	—	—	—	—
4 h	50%	40%	33%	44%	—	—	—
6 h	—	—	—	—	—	—	—
18 h	50%	6%	22%	59%	—	—	—
2 jours	—	10%	15%	29%	—	—	—
4 jours	—	14%	33%	77%	—	—	—
8 jours	—	69%	55%	74%	—	—	—
10 jours	50%	32%	45%	71%	—	—	—
12 jours	—	—	70%	89%	32%	83%	—
14 jours	—	—	—	—	—	—	—

b

Temps	Spermatogonies I	Spermatogonies II	Spermatocytes I	Spermatocytes II	Jeunes Spermatides	Spermatides allongées	Spermatozoïdes
1 h	71%	50%	30%	—	—	—	—
2 h	10%	29%	7%	—	—	—	—
4 h	40%	33%	41%	17%	—	—	—
6 h	—	—	—	—	—	—	—
18 h	—	24%	38%	50%	—	—	—
2 jours	60%	19%	35%	56%	—	—	—
4 jours	50%	14%	45%	65%	—	—	—
8 jours	—	10%	39%	42%	—	—	—
10 jours	—	—	—	—	—	—	—
12 jours	—	—	—	—	—	—	—
14 jours	50%	24%	31%	40%	—	—	—

c

Temps	Spermatogonies I	Spermatogonies II	Spermatocytes I	Spermatocytes II	Jeunes Spermatides	Spermatides allongées	Spermatozoïdes
1 h	42%	41%	21%	—	—	—	—
2 h	36%	27%	8%	—	—	—	—
4 h	—	—	—	—	—	—	—
6 h	27%	25%	—	—	—	—	—
18 h	—	—	—	—	—	—	—
2 jours	17%	65%	23%	—	—	—	—
4 jours	60%	46%	26%	—	—	—	—
8 jours	—	20%	27%	—	—	—	—
10 jours	—	—	—	—	—	—	—
12 jours	—	—	—	—	—	—	—
14 jours	27%	26%	46%	—	—	—	—

Tableau II : Fréquences de marquage et indices d'incorporation de chaque stade spermatogénétique chez *Rana lessonae*.

a) à 30°C ; b) à 20°C ; c) à 5°C.

A 20°C, dès la première heure qui suit l'injection, l'indice d'incorporation est maximal pour les spermatogonies primaires (71%) et secondaires (50%). Les spermatocytes de premier ordre sont marqués à raison de 30%. Dans la quatrième heure qui suit l'injection, les premiers spermatocytes de deuxième ordre marqués sont décelés (17%). A cette température, le marquage n'atteint pas les spermatides et les spermatozoïdes (Tab.IIb).

A 5°C, enfin, l'indice d'incorporation maximal des spermatogonies primaires (60%) est atteint le quatrième jour suivant l'injection. Celui des spermatogonies secondaires (65%) est atteint le deuxième jour seulement. A cette température, les spermatocytes de deuxième ordre ne sont jamais touchés par la radio-activité. En effet, 14 jours après l'injection, le marquage affecte 46% des spermatocytes de premier ordre (Tab.IIc).

• Chez *Rana esculenta* (Tab.IIIa, b, c)

A 30°C, 44% des spermatocytes de deuxième ordre sont marqués une heure après l'injection. La fréquence d'incorporation atteint 82% 12 jours après le début de l'expérimentation. 10 jours après l'injection, 43% des spermatides allongées sont marquées. 6% des spermatozoïdes sont marqués en 12 jours et 26% d'entre eux sont marqués en 14 jours (Tab.IIIa).

A 20°C, l'indice d'incorporation le plus élevé est atteint quatre heures après le début de l'expérimentation pour les spermatogonies primaires et secondaires. C'est également à ce moment que l'on observe 36% des spermatocytes secondaires marqués mais les spermatides et spermatozoïdes ne seront jamais atteints par la radio-activité, même après 14 jours (Tab.IIIb).

A 5°C, les spermatocytes secondaires ne sont jamais atteints par la radio-activité même après 14 jours d'expérimentation alors que les spermatocytes primaires ont atteint, à cette période, un indice de 51% (Tab.IIIc).

IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

A. Analyse de fréquence du marquage total Ft

Chez *Rana lessonae*, on constate que la température de 30°C semble favoriser la spermatogenèse. C'est à cette température que le nombre de cellules germinales marquées est le plus grand par rapport à leur nombre total. A 20°C, comme d'ailleurs à 5°C, la Ft au bout de quatorze jours est inférieure à la moitié de la Ft précédemment observée à 30°C ; les différences constatées entre les deux dernières températures au niveau de la Ft ne sont d'ailleurs pas très importantes.

Chez *Rana esculenta*, à 30°C, de nombreuses cellules germinales ont incorporé le traceur radio-actif dès la première heure qui suit l'injection. A 20°C, on a constaté une chute de la Ft à partir du septième jour qui suit l'injection. Il n'est guère possible de savoir si cette chute est due à une variabilité individuelle ou à un phénomène physiologique. A ce sujet, notons la présence de cellules germinales en dégénérescence au niveau des coupes étudiées. Curieusement, chez les animaux élevés à 5°C, la Ft est supérieure à

a

Temps	Spermatogonies I	Spermatogonies II	Spermatocytes I	Spermatocytes II	Jeunes Spermatides	Spermatides allongées	Spermatozoïdes
1 h	—	61%	48%	44%	—	—	—
2 h	20%	30%	50%	29%	—	—	—
4 h	—	23%	39%	69%	—	—	—
6 h	—	—	—	—	—	—	—
18 h	—	22%	42%	47%	—	—	—
2 jours	75%	36%	54%	53%	—	—	—
4 jours	—	47%	50%	54%	—	—	—
8 jours	14%	39%	47%	71%	—	—	—
10 jours	29%	33%	54%	78%	57%	43%	—
12 jours	25%	62%	63%	82%	71%	79%	6%
14 jours	—	58%	47%	64%	60%	95%	26%

b

Temps	Spermatogonies I	Spermatogonies II	Spermatocytes I	Spermatocytes II	Jeunes Spermatides	Spermatides allongées	Spermatozoïdes
1 h	57%	28%	21%	20%	—	—	—
2 h	—	5%	9%	—	—	—	—
4 h	67%	53%	24%	36%	—	—	—
6 h	—	24%	39%	48%	—	—	—
18 h	25%	22%	37%	19%	—	—	—
2 jours	23%	67%	44%	—	—	—	—
4 jours	14%	34%	21%	—	—	—	—
8 jours	—	18%	—	16%	—	—	—
10 jours	—	—	—	—	—	—	—
12 jours	—	—	—	—	—	—	—
14 jours	—	29%	48%	23%	—	—	—

c

Temps	Spermatogonies I	Spermatogonies II	Spermatocytes I	Spermatocytes II	Jeunes Spermatides	Spermatides allongées	Spermatozoïdes
1 h	22%	36%	25%	—	—	—	—
2 h	25%	46%	19%	—	—	—	—
4 h	—	—	—	—	—	—	—
6 h	—	38%	52%	—	—	—	—
18 h	—	—	—	—	—	—	—
2 jours	33%	31%	18%	—	—	—	—
4 jours	38%	41%	30%	—	—	—	—
8 jours	28%	37%	18%	—	—	—	—
10 jours	—	—	—	—	—	—	—
12 jours	—	—	—	—	—	—	—
14 jours	38%	47%	51%	—	—	—	—

Tableau III : Fréquence de marquage et indices d'incorporation de chaque stade spermatogénétique chez *Rana esculenta*.

a) à 30°C ; b) à 20°C ; c) à 5°C.

ce qu'elle était à 20°C, c'est-à-dire que le marquage, à cette température, affecte plus de cellules germinales qu'à la température de 20°C qui, rappelons-le, était voisine de la température extérieure normale de l'eau à la période envisagée.

Si on compare les deux espèces, on constate que, à 30°C, deux fois plus de cellules germinales ont incorporé la thymidine tritiée chez *Rana esculenta* par rapport à *Rana lessonae*, et ceci dès la première heure qui suit l'injection. Cependant, à la fin de l'expérimentation (dès le 12ème jour) les Ft sont identiques, ce qui montre que la spermatogenèse subit des modalités différentes chez les deux espèces. L'incorporation paraît en effet plus lente chez *Rana lessonae*. A 20°C (conditions naturelles) la Ft est sensiblement identique chez les deux espèces. A 5°C, on observe également des différences : cette baisse de température semble affecter de manière plus importante l'incorporation du traceur et donc la mitose et la méiose chez l'espèce *Rana lessonae*.

A l'examen de ces résultats, et en première approche, on peut dire que pour une température élevée, le nombre de cellules germinales entrant en division est plus important chez *Rana esculenta* que chez *Rana lessonae*. Il peut y avoir plus de cellules en division dans les cystes de la première espèce que dans ceux de la seconde ou plus de cystes affectés par la spermatogenèse chez *Rana esculenta* que chez *Rana lessonae*.

B. Analyse des indices d'incorporation Ii

Chez *Rana lessonae*, en juillet, période de l'année qui, rappelons-le, suit la ponte, et dans des conditions naturelles (20°C), le traceur radio-actif n'est pas incorporé au-delà des spermatocytes de deuxième ordre. Si on augmente la température (30°C), des spermatides allongées sont différenciées dès le 12ème jour où elles atteignent un Ii égal à 83%. Une élévation de température semble agir, chez cette espèce, au niveau de la spermiogenèse. Le froid, par contre, semble bloquer la méiose. Notons toutefois que c'est dans les conditions naturelles (20°C) que l'incorporation de thymidine tritiée est maximale dans les spermatogonies.

Chez *Rana esculenta*, on observe également un blocage de la spermiogénèse chez les animaux soumis à la température normale (20°C). Une température basse a le même effet. Par contre, une élévation de température (30°C), provoque la spermiogenèse jusqu'à la formation de spermatozoïdes.

Chez *Rana esculenta*, Rastogi *et al.* (1978) a pu montrer que l'arrêt de la spermatogenèse constaté en hiver est dû aux basses températures. La reprise de la production des gamètes est observée lorsque la température est à nouveau favorable, soit entre 15 et 25°C. Cette fourchette de températures représente également le facteur thermique optimal pour le maintien d'une spermatogenèse active. A des températures inférieures à 10°C, la vitesse de la spermatogenèse diminue ; on constate un retard au niveau de l'évolution des spermatogonies en spermatocytes primaires (Rastogi *et al.*, 1983). Ce modèle semble donc bien s'appliquer aux deux espèces du complexe considérées ici. Cependant, il est intéressant de constater que, en juillet, période de post-

reproduction, même à une température optimale (20°C, peu élevée pour le mois de juillet), la spermatogenèse est bloquée. En avril, à 20°C, période de reproduction vraie, chez *Rana esculenta*, on constatait la présence de spermatides marquées dix jours après l'injection (Neyrand de Leffemberg et Exbrayat, 1987 ; Neyrand de Leffemberg, 1988). Chez *Rana lessonae*, par contre, même en avril, période de pré-reproduction, le marquage était limité aux spermatocytes de deuxième ordre 21 jours après l'injection (Il était alors égal à 37%). On peut donc penser qu'il existe un phénomène de régulation lié en partie à la température mais aussi à d'autres facteurs externes et internes, peut-être génétiques permettant, à la période de post-reproduction, d'empêcher la formation de spermatozoïdes qui seraient inutilisés. Ce phénomène interviendrait au niveau du blocage de la spermatogenèse.

Si l'on compare les deux espèces du complexe, dans les conditions naturelles, les spermatocytes secondaires marqués apparaissent plus rapidement, chez *Rana esculenta*. La différence est accentuée si l'on soumet les animaux à 30°C. Par contre, une baisse de température estompe ce phénomène. La physiologie est donc sensiblement différente chez les deux espèces. Ces constatations peuvent être comparées à un travail précédent portant sur l'effet de la température chez les deux espèces étudiées en avril, période de reproduction (Neyrand de Leffemberg, 1988). A cette période, on pouvait constater que la première multiplication des spermatogonies conduisait directement à la formation des spermatozoïdes chez *Rana esculenta*. Par contre, chez *Rana lessonae*, il existait plusieurs phases de multiplication qui n'aboutissaient pas toutes à la formation des spermatozoïdes ; il y avait ainsi une phase de pré-spermatogenèse. Il semble qu'en juillet, dans les conditions naturelles (20°C), on ne retrouve pas une différence aussi nette, ce qui pourrait être dû au fait que la période de reproduction est terminée.

On peut donc penser que *Rana esculenta* et *Rana lessonae* ne présentent pas des vitesses spermatogénétiques identiques. Les conséquences de ces vitesses différentes sur l'apparition des spermatozoïdes sont particulièrement nettes chez les animaux étudiés en avril, période de reproduction ou de pré-reproduction (Neyrand de Leffemberg, 1988). En juillet, période de post-reproduction, il existe toujours des différences du même ordre mais, dans les conditions normales, les conséquences sont beaucoup moins frappantes puisque la spermiogenèse est bloquée à cette époque. Seule, l'utilisation d'une température élevée obtenue artificiellement (30°C) permet de démasquer, à cette période, des différences physiologiques existant entre les deux membres du complexe.

Il existe vraisemblablement des différences génétiques au niveau de la cinétique spermatogénétique et de sa régulation chez *Rana esculenta* et *Rana lessonae*. Cependant, ces différences concernant la gamétogenèse ne concernent pas l'hybridation interspécifique. Il est en effet connu que des individus appartenant à l'espèce *Rana lessonae* peuvent se croiser avec des *Rana esculenta* (Dubois, 1977). Pour approfondir ce travail, d'autres recherches concernant notamment le cycle des femelles seraient souhaitables. Cependant notre étude limitée aux mâles de deux espèces seulement du complexe conduit à supposer l'existence de différences au niveau de la physiologie de la reproduction, ce qui va dans le sens des données de la systématique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERGER, L. (1964) — Is *Rana esculenta lessonae* Camerano a distinct species ? *Ann. Zool.*, 22 : 45-61.
- BERGER, L. (1976) — Hybrids of B2 generations of European water frogs (*Rana esculenta* complex). *Ann. zool.*, 33 : 201-214.
- DE FELLICE, D.A. et RASCH, E.M. (1969) — Chronology of spermatogenesis and spermiogenesis in Poeciliid fishes. *J. Exp. Zool.*, 171 : 191-208.
- DELSOL, M., FLATIN, J., GUEYDAN-BACONNIER, M., NEYRAND de LEFFEMBERG, F. et PUJOL, P. (1981) — Action des facteurs externes sur les cycles de reproduction chez les Batraciens. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 106(4) : 419-431.
- DUBOIS, A. (1977) — Les problèmes de l'espèce chez les Amphibiens Anoures. *Mém. Soc. Zool. Fr.*, 39(2) : 161-284.
- GALGANO, M. (1934) — L'influenza della temperatura sulla spermatogenesi della *Rana esculenta*. *Monoit. zool. ital.*, 46 : 273-285.
- GUYETANT, R. (1986) — Les Amphibiens de France. *Rev. Fr. Aquariol.* 13ème année (1-2), 61 pp.
- LOFTS, B. (1974) — Reproduction *In* : Physiology of the Amphibia (B. Lofts éd.), pp.107-218, Academic Press, New York, London. 592 p.
- 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 spermatogénèse dans le complexe *Rana esculenta* (*Anura*, *Ranidae*) en fonction de la température. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 41 : 17-20.
- RASTOGI, R.K., IELA, L., DEL RIO, G., DI MEGLIO, M., RUSSO, A. et CHIEFFI, G. (1978) — Environmental influence on testicular activity in the green frog *Rana esculenta*. *J. Exper. Zool.*, 206(1) : 49-63.
- RASTOGI, R.K., IELA, L., DI MEGLIO, M., DI MATTEO, L., MINUCCI, S. et IZZO-VITIELLO, I. (1983) — Initiation and profiles of spermatogenesis in the frog *Rana esculenta* (*Amphibia*). *J. Zool. Lond.* 201 : 515-525.
- SOLARI, A. (1973) — Etude quantitative d'organes ou tissu. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Bioph.*, 2 : 247-265.

F. NEYRAND de LEFFEMBERG et J.-M. EXBRAYAT
Laboratoire de Biologie générale et
Histologie de l'Université catholique de Lyon
Laboratoire d'étude du développement postembryonnaire des Vertébrés
inférieurs
E.P.H.E., 25 rue du Plat
69288 LYON CEDEX 02 (FRANCE)

REMISE EN CAUSE DE LA BANDE LATÉRALE COMME CRITÈRE ABSOLU DE DISTINCTION ENTRE LA RAINETTE VERTE, *Hyla a. arborea* ET LA RAINETTE MÉRIDIONALE, *Hyla meridionalis* (Anura : Hylidae)

par

Hugues PINSTON et Emmanuelle CRANEY

Résumé — 5 observations se rapportant à des Rainettes vertes sans bande latérale sombre, effectuées entre 1965 et 1989 dans des régions de l'est de la France (Lorraine et Franche-Comté) où n'est connue que la Rainette verte *Hyla a. arborea*, prouvent que la bande latérale ne doit plus être considérée comme un critère absolu de distinction entre la Rainette verte *Hyla a. arborea* et la Rainette méridionale *Hyla meridionalis*.

Mots-clés : Morphologie externe, *Hyla a. arborea*, *Hyla meridionalis*.

Summary — 5 observations of Common tree Frogs without dark lateral stripe, made between 1965 and 1989 in north-east of France where only the Common tree Frog is known, prove that the lateral stripe does not more be considered as an absolute distinction feature between the Common tree Frog *Hyla a. arborea* and the Stripeless tree Frog *Hyla meridionalis*.

Key words : External morphology, *Hyla a. arborea*, *Hyla meridionalis*.

I. INTRODUCTION

Actuellement, deux critères principaux sont donnés dans la littérature (notamment : Arnold et Burton, 1978 ; Diesener et Reichholf, 1986 ; Matz et Weber, 1983) pour distinguer facilement dans la nature les deux espèces de Rainettes présentes en France continentale.

D'une part, il s'agit de la présence chez la Rainette verte *Hyla a. arborea* et l'absence chez la Rainette méridionale *Hyla meridionalis* d'une bande (ou ligne) noirâtre bilatérale partant de la narine et se continuant vers l'oeil puis sur le flanc, avant de décrire une courbe au niveau de la hanche.

D'autre part, c'est le chant des mâles qui est très différent chez les deux espèces, les appels étant nettement plus longs, d'une tonalité plus grave et répétés à un rythme plus lent chez la Rainette méridionale (au mieux, à peine un appel par seconde) que chez la Rainette verte (trois à cinq appels par seconde) (Paillette, 1967).

De la consultation des ouvrages cités plus haut, il ressort que chacun de ces caractères a une valeur absolue pour distinguer les deux espèces. Notons

cependant que Diesener et Reichholf (1986) indiquent que la bande latérale peut exister chez de jeunes Rainettes méridionales, mais sans la courbe au niveau de l'aine.

Plusieurs observations viennent aujourd'hui étayer l'affirmation (Guyétant, 1986) que la bande latérale n'est pas un critère absolu pour distinguer les adultes de la Rainette verte *Hyla a. arborea* et de la Rainette méridionale *Hyla meridionalis*.

II. MÉTHODE ET HISTORIQUE DES OBSERVATIONS

C'est la découverte d'une Rainette sans bande latérale sombre en 1989 dans les environs de Besançon (25) par les auteurs du présent travail qui a amené ces derniers à consulter les membres du Laboratoire d'Ecologie Animale de la Faculté des Sciences de Besançon, d'où la liste ci-dessous.

• Lorraine (est de la France)

1) Date : 1981

Observateur : Jean François

Commune : Saint-Benoît-en-Woevre (55)

Individu adulte sans bande latérale, observé sur un chemin forestier.

• Franche-Comté (est de la France)

2) Date : 23/3/1965

Observateur : Robert Guyétant

Commune : Dampierre (39), hameau des Minerais

Mâle isolé sans bande latérale et avec gorge verte au bord d'un étang (Guyétant et Robert, 1965). L'observateur attribue alors sa découverte à l'espèce *Hyla meridionalis*.

3) Date : 10/5/1968

Observateurs : Jean-Yves Cretin, Jean-Claude Robert

Commune : Gennes (25)

Individu adulte sans bande latérale, parmi quelques Rainettes vertes typiques avec bande.

4) Date : 1982

Observateur : Jean-Yves Cretin

Commune : Auxon-Dessus (25)

Individu adulte sans bande latérale, parmi une dizaine de Rainettes vertes typiques avec bande. Chants entendus spécifiques de la Rainette verte.

5) Date : 7/4/1989

Observateurs : Emmanuelle Craney, Hugues Pinston

Commune : Recologne (25)

Femelle sans bande latérale et avec gorge verte, observée de nuit sur une petite route par temps très pluvieux. Chants entendus à proximité typiques de la Rainette verte.

III. DISCUSSION

L'absence de la bande latérale sombre indique donc qu'il s'agit d'observations se rapportant à des Rainettes ayant plutôt l'allure de la Rainette méridionale dans des régions où n'est connue que la Rainette verte (Anonyme, 1989). Que penser alors de ces données ?

D'une part, le nombre non négligeable des observations, leur relative dispersion dans le temps (25 ans) et dans l'espace (y compris à l'intérieur du département du Doubs), ajoutés au fait que les observateurs reconnaissent ne pas capturer toutes les Rainettes vues et surtout entendues, confèrent à ces données une valeur significative, tout en excluant la possibilité d'animaux amenés d'une région où la Rainette méridionale est effectivement présente.

D'autre part, si l'on considère l'aire de répartition de la Rainette méridionale (Anonyme, 1989), très éloignée de la Lorraine et de la Franche-Comté, et sachant que les observations rapportées ci-dessus concernent des individus isolés et non des populations, il est raisonnable et logique de rattacher ces individus à l'espèce Rainette verte *Hyla a. arborea* malgré l'absence de la bande latérale.

IV. CONCLUSION

Ces observations indiquent que la présence (ou l'absence) d'une bande latérale sombre ne doit plus être considérée comme un critère absolu permettant de distinguer avec certitude dans la nature la Rainette verte *Hyla a. arborea* de la Rainette méridionale *Hyla meridionalis*.

Ainsi, l'utilisation d'une combinaison de critères, notamment le chant conjointement à la bande latérale, s'avère indispensable dans certaines conditions : régions où existent (ou bien sont susceptibles d'exister) les deux espèces et/ou découverte de un ou plusieurs individus sans bande latérale. A propos de critères, il convient éventuellement de se reporter à un travail de Héron-Royer (1884). Cet article pionnier pose déjà le problème de la distinction des deux espèces qui nous occupent par le chant du mâle et comporte en outre un tableau récapitulatif de différents critères morphologiques de distinction entre les deux espèces. Outre la bande latérale, il donne d'autres caractères de morphologie externe. La plupart paraissent vagues ou relatifs, mais pourraient être réexaminés par une étude biométrique rigoureuse. De même, des observations systématiques permettraient de préciser la valeur de la coloration de la gorge et celle de la présence de granulations (sur la gorge et sur les flancs).

Le critère éthologique du chant reste donc actuellement le seul caractère absolu pour distinguer facilement les mâles des deux espèces dans la nature.

Les observations rapportées ici restent fragmentaires et il est donc fait appel aux observateurs et chercheurs d'autres régions pour préciser la fréquence et la répartition de cette absence de bande latérale chez la Rainette verte *Hyla a. arborea*.

Remerciements. — Nous remercions Messieurs J.Y. Cretin, J. François, R. Guyétant et J.C. Robert qui ont mis leurs observations à notre disposition.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANONYME (1989) — Atlas de répartition des Amphibiens et Reptiles de France (Castanet, J. et Guyétant, R. eds.). Société Herpétologique de France, Paris, 191 p.
- ARNOLD, E.N., et BURTON, J.A. (1978) — Tous les Reptiles et Amphibiens d'Europe. Elsevier Séquoia, Paris-Bruxelles, 271 p.
- DIESENER, G. et REICHHOLF, J. (1986) — Les Batraciens et les Reptiles. Solar, Paris, 287 p.
- GUYÉTANT, R. et ROBERT, J.C. (1965) — Répartition des Amphibiens Anoures du Doubs, région de Besançon. *Ann. Sc. Univ. Besançon, Zool. Physio. anim.*, 1 : 16-18.
- GUYÉTANT, R. (1986) — Les Amphibiens de France. *Revue fr. Aquariol.*, Nancy, 60 p.
- HERON-ROYER, L.F. (1884) — Note sur une forme de Rainette nouvelle pour la faune française (*Hyla barytonus*). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 9 : 221-238.
- MATZ, G. et WEBER, D. (1983) — Guide des Amphibiens et Reptiles d'Europe. Delachaux et Niestlé, Neuchâtel-Paris, 292 p.
- PAILLETTE, M. (1967) — Valeur taxinomique des émissions sonores chez les *Hyla* (Amphibiens, Anoures) de la faune française. *C.R. Acad. Sc. Paris, sér.D*, 264 : 1626-1628.

H. PINSTON et E. CRANEY
Laboratoire de Biologie et Ecologie animales
La Bouloie, Route de Gray
25030 BESANÇON CEDEX (FRANCE)

MORPHOLOGIE DE L'ÉPITHÉLIUM BRANCHIAL DES EMBRYONS DE *Typhlonectes compressicaudus* (AMPHIBIEN GYMNOPHIONE) ÉTUDIÉ EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE A BALAYAGE

par

Jean-Marie EXBRAYAT et Souad HRAOUI-BLOQUET

Résumé — L'examen au microscope électronique à balayage de la surface branchiale des embryons de *Typhlonectes compressicaudus* montre que chez les individus de stade II l'épithélium est semblable à celui de l'épiderme. A partir des stades III, l'épithélium branchial se différencie en plusieurs types cellulaires. La face située du côté de l'embryon ne présente pas les mêmes catégories de cellules que la face en regard de la paroi utérine.

Mots-clés : Amphibien, Gymnophione, branchie, viviparité.

Summary — Scanning electron microscope observations of gill surface in *Typhlonectes compressicaudus* embryos shows that the epithelium of stage II looks like epidermis one. From stage III, gill epithelium contains several cell types. The cells situated on the surface in front of embryo are of different types from which are on the surface in front of uterine wall.

Key-words : Amphibian, Gymnophiona, gill, viviparity.

I. INTRODUCTION

A une certaine période de leur vie embryonnaire, tous les Gymnophiones, qu'ils soient ovipares ou vivipares, possèdent une paire de branchies (Parker et Dunn, 1964 ; Taylor, 1968 ; Wake, 1967, 1969, 1977). Ces dernières sont triradiées chez la plupart des espèces mais chez les Typhlonectidae, chacune d'entre elles a l'apparence d'une grande lame unique, vésiculeuse et nervurée. A la fin du développement, les branchies entourent complètement l'embryon et sont étroitement appliquées contre la paroi utérine (Peters, 1874, 1875 ; Taylor, 1968 ; Wake, 1977 ; Exbrayat, 1986 ; Exbrayat *et al.*, 1981 ; Delsol *et al.*, 1981, 1986). Si la présence de telles branchies a été souvent signalée, peu d'études microanatomiques ont été consacrées à ces organes bien particuliers. Signalons toutefois le travail de Delsol *et al.* (1986) dans lequel une première approche de la structure histologique de ces branchies a été donnée et celui de Sammoury *et al.* (1990) dans lequel le développement des branchies est précisé. Exbrayat (1986) publie également quelques données biométriques de la croissance linéaire de ces organes chez *Typhlonectes compressicaudus*.

Dans ce travail, nous donnons les résultats d'une étude effectuée au microscope électronique à balayage (MEB) de la surface branchiale de *Typhlonectes compressicaudus* au cours du développement. Les stades embryonnaires étudiés sont donnés selon la nomenclature de Delsol *et al.* (1981) (chiffre romain suivi d'un chiffre arabe) et de Sammouri *et al.* (1990) (chiffres arabes). Les différentes zones branchiales examinées au MEB sont celles qui ont été précédemment décrites par Delsol *et al.* (1986).

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les embryons étudiés proviennent de femelles en gestation capturées en Guyane française grâce à l'aide de la Fondation Singer-Polignac. Les embryons sont fixés au liquide de Bouin. Après dissection, les branchies ont été déshydratées par l'alcool à 70° puis l'acétone. Après dessiccation par la méthode de contournement du point critique (Pottu-Boumendil, 1989) et métallisation par le mélange or-palladium, les échantillons ont été observés au microscope électronique à balayage Jeol 35 CF ou Hitachi S 800. L'ensemble de ce travail a été effectué au C.M.E.A.B.G. de l'Université Lyon I, 43 Bld du 11 novembre 1918, 69621 Villeurbanne CEDEX.

III. OBSERVATIONS

Les branchies de *Typhlonectes compressicaudus* sont différentes de celles des autres Amphibiens chez qui elles présentent un axe principal soutenant des ramifications latérales. Chez cette espèce, les arcs branchiaux 3 et 4 apparaissent au stade 18 (II₁₁) formant deux bourgeons se développant de part et d'autre du futur cerveau postérieur de l'embryon. A partir du stade 21 (II₁₃), elles fusionnent au-dessus de la tête en une racine dorsale unique. Au stade 26 (III₁), elles prennent un aspect vésiculeux et ressemblent à des palettes flottantes. Chez les individus de stades 32 à 34 (IV), les branchies toujours vésiculeuses sont plissées et richement vascularisées (Fig.1)

Stade 14 à 25 (II)

Sur l'ensemble de la surface branchiale, des cellules ciliées alternent avec des cellules présentant des microvillosités. Des sécrétions recouvrent certaines zones de cet épithélium. Les mêmes types cellulaires sont observés sur toute la surface de la peau de l'embryon (Fig.2).

Stade 26 (III₁)

De nombreuses cellules ciliées se trouvent en bordure de la branchie. Les cellules qui les jouxtent ont une surface convexe couverte de microvillosités. Quelques rares cellules ciliées pouvant piéger des boules de sécrétion sont également observées. Des amas de sécrétions adhèrent également aux microvillosités. Du côté utérin de la branchie, c'est-à-dire du côté de la face branchiale en regard de la paroi de l'utérus, la plupart des cellules présentent des expansions cytoplasmiques. Du côté embryonnaire (autre face branchiale), l'épithélium comporte des cellules pavimenteuses avec de fins prolongements cytoplasmiques paraissant plus denses sur les contours cellulaires. Quelques cellules ciliées sont dispersées sur cette face. Les sécrétions sont peu abondantes (Fig.2).

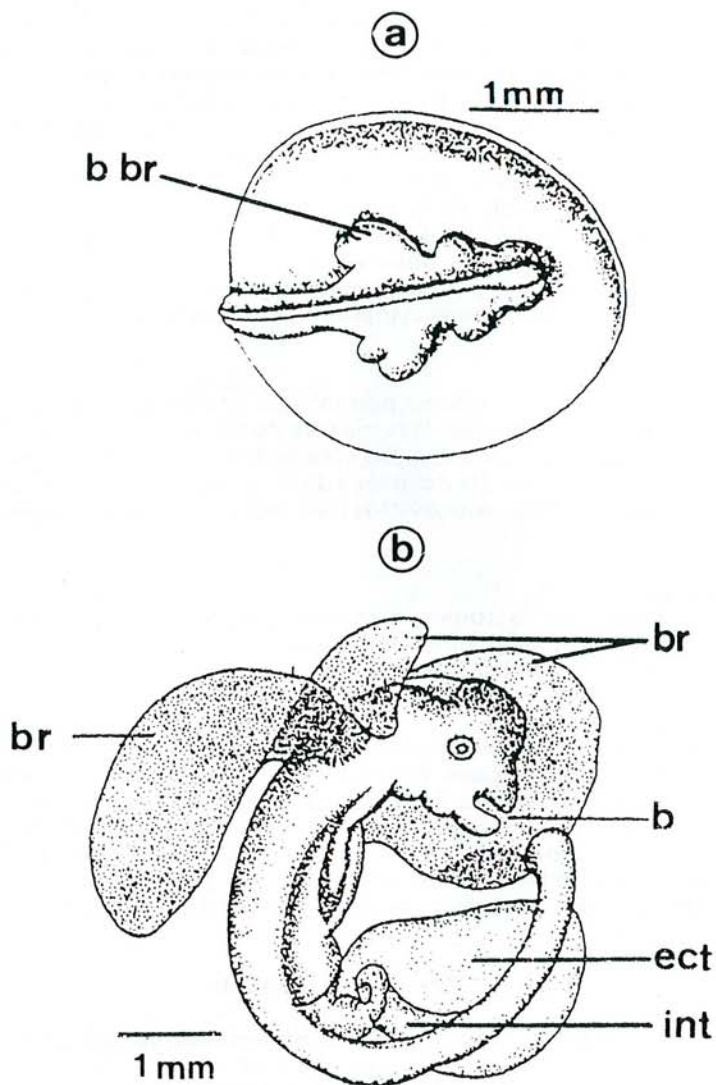


Figure 1 : Représentation schématique des embryons de *Typhlonectes compressicaudus* (d'après Delsol et al., 1981).
 (a) : embryon de stade II₁₂ (20) ; (b) : embryon de stade III₁ (26).
 b : bouche ; b br : bourgeon branchial ; br : branchie ; ect : ectoderme ventral (ectotrophoblaste) ; int : intestin.

Stade 28 (III₂)

Du côté utérin, les cellules de la zone centrale sont plus ou moins aplaties. Les microvillosités sont denses et les prolongements cytoplasmiques peu développés. A l'extrémité postérieure de la branchie, le cytoplasme apical des cellules fait fortement saillie vers l'extérieur et se termine par un long prolongement ramifié. La surface libre des cellules est toujours recouverte de microvillosités. Des sécrétions peuvent adhérer à l'extrémité des prolongements cytoplasmiques. Sur les bords latéraux des branchies, les cellules sont également ramifiées. Les longs prolongements principaux envoient dans tous les sens de nombreux prolongements secondaires qui se développent sur l'ensemble de la surface cellulaire et qui s'entremêlent. Des sécrétions sont accrochées à l'extrémité de certains prolongements. Des microvillosités sont toujours observées sur la surface cellulaire. Du côté embryonnaire, les cellules pavimenteuses sont bombées et recouvertes d'un grand nombre de prolongements cytoplasmiques (Fig.2).

Stade 29 (III₃)

Du côté utérin, les cellules portent des prolongements cytoplasmiques très développés et enchevêtrés. Des masses de sécrétions masquent souvent la surface des cellules sous-jacentes. Du côté embryonnaire, on retrouve le même type de cellules qu'au stade précédent ; cependant, les expansions cytoplasmiques et les microvillosités sont plus développées et plus nombreuses.

Stade 31 (III₅)

A ce stade, on retrouve le même type de cellule. Les expansions cytoplasmiques sont particulièrement longues et enchevêtrées. Des masses de sécrétions sont toujours observées.

Stade 32 (IV₁)

Du côté utérin, les cellules de la zone moyenne paraissent dépourvues de prolongements cytoplasmiques. Elles sont couvertes de microvillosités. Dans la zone antérieure, les cellules épithéliales émettent toujours de nombreuses expansions cytoplasmiques ramifiées sur lesquelles adhèrent des sécrétions (Fig.2). Du côté embryonnaire, certaines cellules paraissent "sortir" de l'épithélium auquel elles ne sont rattachées que par leur base en pédoncule. Leur surface libre est couverte d'une masse de sécrétions (Fig.2).

IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les branchies de *Typhlonectes compressicaudus* possèdent un aspect général bien particulier, différent de ce qui a été observé chez les embryons et les larves des autres Gymnophiones (Parker et Dunn, 1964 ; Wake, 1967, 1969, 1977). L'examen au M.E.B. de l'épithélium de surface de la branchie a permis de montrer que cette dernière est le siège de variations morphologiques au cours du développement. Cet épithélium présente une succession de différenciations qui sont étroitement liées aux trois grandes phases de la vie embryonnaire précédemment décrites par Exbrayat *et al.* (1981) et Delsol *et al.* (1981).

Aux stades 14 à 25 (II), la surface branchiale est similaire à la surface générale de l'épithélium embryonnaire (Sammouri *et al.*, 1990). A partir du

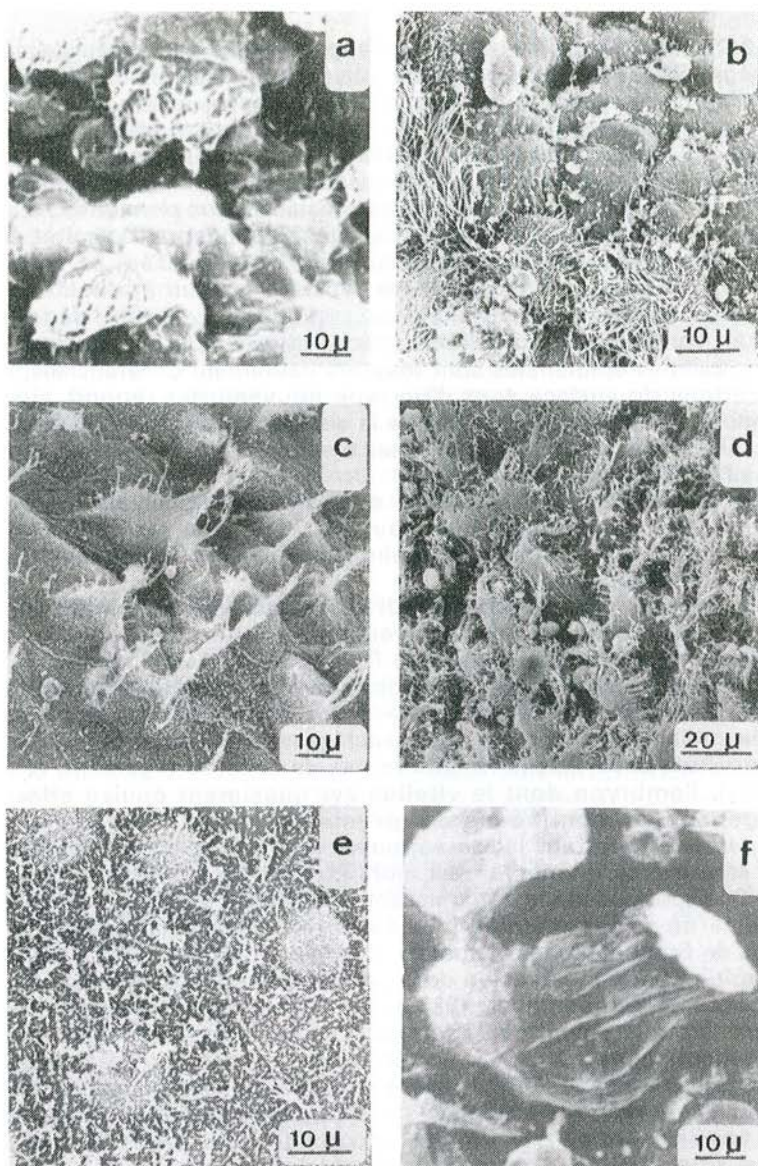


Figure 2 : Aspect, en M.E.B., de la surface branchiale des embryons de *Typhlonectes compressicaudus* au cours du développement.

(a) : stade II₁₁ (19) ; (b) : stade III₁ (26) : face utérine ; on observe la présence simultanée de cellules ciliées et de cellules pavimenteuses avec quelques microvillosités. Des sécrétions peu abondantes sont également présentes. (c) : stade III₂ (28) : face utérine : présence de cellules à prolongements. (d) : stade III₂ (28) : bord de la branchie : nombreuses cellules à prolongements arborescents. (e) : stade III₃ (29) : face embryonnaire : présence de cellules pavimenteuses recouvertes d'expansions. (f) : stade IV₁ (32) : face embryonnaire : cellule pédonculée avec une masse de sécrétion apicale.

stade 26-27 (III₁), des spécialisations apparaissent au niveau de certaines cellules épithéliales de la face utérine ; la face embryonnaire, dirigée vers le flanc de l'embryon, reste toujours moins différenciée et les types cellulaires sont moins nombreux. Au fur et à mesure que l'embryon atteint les différents stades 26 à 31 (III), les cellules épithéliales du côté utérin émettent des spécialisations de plus en plus nombreuses et diversifiées en fonction de la zone cellulaire où elles sont situées. Ces spécialisations permettent d'accroître la surface cellulaire. Les résultats biométriques donnés par Delsol *et al.* (1986) conduisent à une conclusion identique. Aux stades 32 à 34 (IV), la face branchiale embryonnaire est toujours recouverte d'un épithélium de type pavimenteux avec des microvillosités ; quelques cellules "pédunculées" (cellules en voie de rejet ou cellules spécialisées ?) sont intercalées. Du côté utérin, les cellules épithéliales sont toujours hautement différenciées, mais les spécialisations de surface sont d'un type nouveau par rapport aux stades précédents. Par ailleurs, l'ensemble de la surface paraît plus homogène et les cellules épithéliales, toujours recouvertes d'expansions, donnent un aspect plus régulier à l'épithélium.

Les différenciations successives de la surface branchiale des embryons de *Typhlonectes compressicaudus* peuvent être mises en relation avec les besoins nutritifs et respiratoires de l'animal, besoins qui, logiquement, évoluent au cours du développement.

Aux stades 14 à 25 (II), l'embryon effectue sa première phase de morphogenèse. Il acquiert progressivement sa forme définitive. Il est alors protégé par une enveloppe muqueuse (Delsol *et al.*, 1981 ; Exbrayat, 1986 ; Sammouri *et al.*, 1990) et son développement s'effectue essentiellement à partir des réserves vitellines. A ce stade, les échanges avec le milieu utérin sont vraisemblablement réduits. Les branchies ne sont pas encore différenciées et leur structure superficielle ne diffère pas de celle du tégument. A partir de 26-27 (III₁), l'embryon dont le vitellus est quasiment épuisé effectue son organogenèse et commence sa première phase de croissance. Ce développement important laisse supposer que ses besoins énergétiques et nutritifs sont accrus. L'embryon est alors libre de se déplacer à l'intérieur de l'utérus. Des spécialisations apparaissent à différents niveaux ; on observe par exemple le développement d'une dentition foetale caractéristique des embryons de Gymnophiones vivipares (Exbrayat et Delsol, 1988 ; Wake, 1977). Cette dentition permet l'abrasion de la paroi utérine qui est alors le siège d'une abondante sécrétion (Exbrayat, 1988a). C'est à cette période que l'on observe également l'accroissement de la surface épithéliale des branchies qui flottent alors librement dans l'utérus. Cet accroissement qui est dû à des spécialisations morphologiques très particulières laisse supposer que les branchies deviennent un lieu privilégié pour les échanges entre l'environnement utérin et l'embryon dont les besoins sont de plus en plus importants. Aux stades 32 à 34 (IV), les branchies sont accolées contre la paroi utérine (Exbrayat, 1984, 1988a). La surface branchiale située au contact de l'utérus présente un aspect général homogène aplati qui est bien en accord avec une telle disposition. A ce stade, l'animal a acquis sa forme définitive et sa croissance devient maximale. Les besoins en éléments nutritifs et respiratoires sont donc vraisemblablement très importants. L'apport de nourriture se fait sans aucun doute par voie buccale (des cas d'oophagie et d'adelphophagie ont été signalés, Delsol *et al.*, 1986) mais la paroi utérine n'est plus sécrétrice et sa constitution cellulaire est différente (Exbrayat, 1988a). A cette période, les branchies sont donc certainement particulièrement impliquées dans les échanges avec la mère, par

l'intermédiaire d'une sorte de pseudoplacentation. Notons, pour conforter ces hypothèses, que des échanges gazeux respiratoires entre la mère et des embryons de stades avancés ont été décelés chez *Typhlonectes compressicaudus* par Toews et MacIntyre (1977) ; par ailleurs, dans un travail antérieur, il a été montré que, durant cette période, les organes de réserve maternels possédaient un volume minimal (Exbrayat, 1988b).

Les différenciations morphologiques de l'épithélium branchial des embryons de *Typhlonectes compressicaudus* paraissent uniques parmi les Amphibiens. En réalité, peu d'études portent sur l'observation au M.E.B. des branchies de ces animaux. Chez *Salamandra salamandra*, Greven (1980) montre que, à la fin du développement, la surface branchiale des larves intra-utérines présente un aspect général similaire à celui de l'épiderme. Mais chez cette espèce d'Urodèle, les échanges avec l'utérus paraissent réduits (Greven, 1977, 1981). Bien que certains Anoures pratiquant le marsupialisme possèdent des branchies fortement modifiées (Lamotte et Lescure, 1977 ; Gipouloux, 1986), la structure morphologique des branchies de *Typhlonectes compressicaudus* apparaît pour l'instant comme un cas de différenciation lié aux échanges foeto-maternels qui pourrait être caractéristique du groupe des Typhlonectidae.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DELSOL, M., FLATIN, J., EXBRAYAT, J.-M., BONS, J. (1981) — Développement de *Typhlonectes compressicaudus*, Amphibien Apode vivipare. Hypothèse sur sa nutrition embryonnaire et larvaire par un ectotrophoblaste. *C.R. Acad. Sci., Paris, sér.III*, 293 : 281-285.
- DELSOL, M., EXBRAYAT, J.-M., FLATIN, J., GUEYDAN-BACONNIER, M. (1986) — Nutrition embryonnaire chez *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron, 1841), Amphibien Apode vivipare. *Mém. Soc. Zool. Fr.*, 43 : 39-54.
- EXBRAYAT, J.-M. (1984) — Quelques observations sur l'évolution des voies génitales femelles de *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron, 1841), Amphibien Apode vivipare, au cours du cycle de reproduction. *C.R. Acad. Sci., Paris, sér.III*, 298 : 13-18.
- EXBRAYAT, J.-M. (1986) — Quelques aspects de la biologie de la reproduction chez *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron, 1841), Amphibien Apode. Thèse Doct. Etat ès Sci. nat., Univ. Paris VI, 308 p.
- EXBRAYAT, J.-M. (1988a) — Croissance et cycle des voies génitales femelles chez *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron, 1841), Amphibien Apode vivipare. *Amphibia-Reptilia*, 9 : 117-137.
- EXBRAYAT, J.-M. (1988b) — Variations pondérales des organes de réserve (corps adipeux et foie) chez *Typhlonectes compressicaudus*, Amphibien Apode vivipare au cours des alternances saisonnières et des cycles de reproduction. *Ann. Sci. nat., Zool., Paris, 13ème série*, 9 : 45-53.
- EXBRAYAT, J.-M., DELSOL, M. (1988) — Oviparité et développement intra-utérin chez les Gymnophiones. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 45 : 27-36.
- EXBRAYAT, J.-M., DELSOL, M., FLATIN, J. (1981) — Premières remarques sur la gestation chez *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron, 1841), Amphibien Apode vivipare. *C.R. Acad. Sci., Paris, Sér.III*, 292 : 417-420.

- GIPOULOUX, J.D. (1986) — Phorésie et marsupialisme. In : *Traité de zoologie*. Tome XIV (IB), Batraciens. (P.P. Grassé et M. Delsol, eds.) pp.457-469. Masson et Cie. Paris. 828 p.
- GREVEN, H. (1977) — Comparative ultrastructural investigations of the uterine epithelium in the viviparous *Salamandra atra* Laur. and the ovoviviparous *Salamandra salamandra* (L.) (*Amphibia Urodela*). *Cell Tissue res.*, 18 : 215-237.
- GREVEN, H. (1980) — Ultrastructural investigations of the epidermis and the gill epithelium in the intrauterine larvae of *Salamandra salamandra* (L.) (*Amphibia, Urodela*). *Z. mikr. anat. Forsch.*, 94(2) : 196-208.
- GREVEN, H. (1981) — Na-pump sites on the oviduct of *Salamandra salamandra* (L.) (*Amphibia, Urodela*). *Experientia*, 37 : 771-772.
- LAMOTTE, M., LESCURE, J. (1977) — Tendances adaptatives à l'affranchissement du milieu aquatique chez les Amphibiens Anoures. *La terre et la vie*, 31 : 225-311.
- PARKER, H.W., DUNN, E.R. (1964) — Dentitional metamorphosis in the Amphibia. *Copeia*, 1964 (1) : 75-86.
- PETERS, W. (1874) — Observations sur le développement du *Caecilia compressicauda*. *Ann. Sci. nat. Zool., sér.5*, 19 : art.13, 2 p.
- PETERS, W. (1875) — Über die Entwicklung der Caecilien. *Monats. Akad. Wiss. Berlin*, 1875 : 483-486.
- POTTU-BOUMENDIL, J. (1989) — Microscopie électronique, principes et méthodes de préparation. Editions INSERM, 221 p.
- SAMMOURI, R., RENOUS, S., EXBRAYAT, J.-M., LESCURE, J. (1990) — Développement embryonnaire de *Typhlonectes compressicaudus*. *Ann. sci. nat. Zool. Paris*, 13ème sér. 11(3) : 135-163.
- TAYLOR, E.H. (1968) — The Caecilians of the world. A taxonomic review. Univ. Kansas press Ed., Lawrence, 848 p.
- TOEWS, D., MacINTYRE, D. (1977) — Blood respiratory properties of a viviparous Amphibian. *Nature*, 266 : 464-465.
- WAKE, M.H. (1967) — Gill structure in the Caecilian genus *Gymnopsis*. *Bull. Sc. Calif. Acad. Sci.*, 66(2) : 109-116.
- WAKE, M.H. (1969) — Gill ontogeny in embryos of *Gymnopsis* (*Amphibia, Gymnophiona*). *Copeia*, 1969(1) : 183-184.
- WAKE, M.H. (1977) — The reproductive biology of Caecilians. An evolutionary perspective. In : *The reproductive biology of Amphibians*. (D.H. Taylor and S.I. Guttman, eds.) pp.73-100. Miami Univ., Oxford, Ohio.

J.-M. EXBRAYAT et S. HRAOUI-BLOQUET
Laboratoire de Biologie générale et
Histologie de l'Université catholique de Lyon
Laboratoire d'étude du développement postembryonnaire des Vertébrés
inférieurs
E.P.H.E., 25 rue du Plat
69288 LYON CEDEX 02 (FRANCE)

ANOMALIES ET RÉGÉNÉRATION DES MEMBRES CHEZ *Triturus marmoratus* (Latreille, 1800)

par

Maria Helena CAETANO

Résumé — L'examen de 819 *Triturus marmoratus* provenant du Portugal a montré que 7,4% des individus du sud présentent des anomalies morphologiques. Les plus fréquentes affectent le nombre de doigts sous forme de polydactylie ou d'oligodactylie. Un spécimen possédant un membre supplémentaire a été découvert. Les facteurs responsables de ces anomalies sont évoqués.

Mots-clés : *Triturus marmoratus* - anomalies - polydactylie - oligodactylie - membre supplémentaire.

Summary — The study of 819 *Triturus marmoratus* from Portugal has revealed that 7,4% in south have anomalies. The most common anomalies affect the number of digits : polydactyly and oligodactyly. One case of supernumerary limbs occurred. The factors which could account for this anomalies are discussed.

Key-words : *Triturus marmoratus* - polydactyly - oligodactyly - supernumerary limb.

I. INTRODUCTION

La présence d'anomalies chez les Amphibiens *in natura* est connue depuis longtemps (Rostand, 1951 ; Griffith, 1981 ; Malkmus 1981 ; Roberts et Verrel 1984 ; Meyer-Rochow et Asashima, 1988). Cependant le pourcentage des cas anormaux dans les différentes populations considérées n'est pas toujours indiqué. Quelques anomalies ont déjà été observées chez les Urodèles, expérimentalement dans les doigts amputés et régénérés au laboratoire (Scadding, 1981a et b). Chez les Urodèles sauvages, des cas anormaux ont été observés (Malkmus 1981 ; Roberts et Verrel, 1984), mais des cas de membres supplémentaires ont été décrits seulement chez *Salamandra maculosa* par Hellmich (1929) et chez *Cynops pyrrhogaster* par Meyer-Rochow et Asashima (1988). Ces derniers ont noté que, chez un individu, le membre supplémentaire était en position dorsale et projeté d'une vertèbre cervicale. Chez les Anoures, les anomalies tératologiques semblent plus fréquentes que chez les Urodèles et la présence de membres supplémentaires a déjà été observée chez six espèces (voir Borkin et Pikulik, 1986).

Par ailleurs, les causes endogènes et exogènes de ces anomalies posent encore de nombreux problèmes.

Ce travail présente des cas d'anomalies observées dans trois populations (deux au Nord et une au Sud) de *Triturus marmoratus* provenant de différentes régions du Portugal et étudiées par ailleurs de 1979 à 1986 (Caetano, 1988).

II. MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les présentes observations ont été réalisées sur 819 individus adultes capturés dans les mares, étangs et ruisseaux de cinq stations du Nord du Portugal (Parc National Peneda Gerês) et dans trois stations au Sud (Algarve Oriental). Tous les animaux anormaux ont été examinés et quelques-uns transportés au laboratoire. Un spécimen récolté en 1984 présentait un membre supplémentaire. Cet animal a été conservé en aquaterrarium pendant quelques mois. Après sa mort naturelle il a été radiographié. Les doigts de 32 *Triturus marmoratus*, jeunes et adultes, ont par ailleurs été coupés afin d'observer leur régénération et de déterminer l'âge des spécimens auxquels ils appartenaient.

III. RÉSULTATS

Chez les Tritons du Nord (N=262) nous n'avons pas trouvé d'anomalie. Chez les Tritons de la région Sud (N=557), 7,4% de cas anormaux ont été observés. Les anomalies détectées sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Polydactylie	Doigts supplémentaires	0,7%
	Bifurcation	1,6%
Oligodactylie	Absence des doigts	2%
	Doigts atrophiés	1,6%
	Membrane interdigitale	1,3%
Polymérie	Membre supplémentaire	0,2%
Total des anomalies		7,4%

Tableau I : Anomalies observées chez 557 *Triturus marmoratus* dans trois stations au Sud.

La présence d'un doigt supplémentaire a été notée dans 0,7% des animaux observés (Tab.I). La bifurcation, observée au niveau des phalanges, des métacarpes ou des métatarses, était plus fréquente et affectait 1,6% des animaux. Les extrémités bifurquées sont, soit symétriques, soit asymétriques, ceci étant la conséquence de la division du même os ou de la formation de deux os distincts à partir de l'épiphyse proximale.

L'absence d'un doigt fut observée chez 2% des individus anormaux. Dans ce cas les autres doigts occupent tout l'espace disponible. Des doigts atrophiés furent également rencontrés chez 1,6% des animaux. Dans ces cas, l'atrophie porte, soit sur un seul doigt, soit sur le 2ème et le 3ème doigt du membre antérieur ou le 2ème, le 3ème et le 4ème doigt du membre postérieur. Une pseudo-membrane interdigitale fut observée chez 1,3% des animaux.

Le cas le plus remarquable, noté pour la première fois chez *Triturus marmoratus*, est la présence à droite, d'un membre postérieur supplémentaire (Fig.1 A et B). Ce phénomène a été observé chez un individu, âgé de trois ans. Les deux membres, le normal et le supplémentaire, participent à la locomotion. A terre, l'animal utilise principalement le membre en position la plus antérieure. Les deux membres s'insèrent dans une ceinture pelvienne ossifiée et agrandie dans le sens de sa longueur. Le pubis et l'ischion sont fusionnés, mais il y a une différence structurale entre eux. L'ilion est proportionnellement plus réduit à droite, mais il a une position normale. Le membre le plus postérieur est formé par un fémur élargi sur lequel s'insèrent deux tibias et deux fibulas. C'est lui qui représente le membre supplémentaire. Le membre normal, plus antérieur, s'insère plus haut dans la ceinture pelvienne. Son fémur est plus fin par rapport au fémur du membre gauche (Fig.1B). Le nombre des éléments osseux du basipode reste normal dans ces deux membres postérieurs droits, les modifications portent dans le nombre des doigts : le membre normal présente seulement quatre doigts, tandis que les deux "pattes" du membre bifurqué ont respectivement cinq et quatre doigts réduits (Fig.1A).

Notons que, chez les animaux amputés au laboratoire, seuls les jeunes, âgés d'un à deux ans, régénèrent les doigts amputés. De plus, les doigts régénérés n'atteignent pas la même taille que celle d'un doigt normal. Chez les animaux âgés, il n'y a pas de régénération, même partielle.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

Les explications proposées pour les cas de polydactylie ou d'oligodactylie sont diverses : Griffiths (1981) et Scadding (1981a) considèrent que la cause principale est la régénération anormale d'une structure originellement détruite. Scadding (1981) suggère que la capacité de régénération au niveau des membres des Urodèles est fréquente et dépend de la taille des animaux. En analysant les résultats obtenus chez 32 *Triturus marmoratus*, nous pouvons penser que la capacité de régénération ne dépend pas de la taille des animaux, mais plutôt de leur âge. Cependant, les anomalies trouvées dans la nature ne seraient pas seulement expliquées par la perte accidentelle suivie de régénération plus ou moins partielle de l'élément considéré. Elles seraient également dues à des troubles du développement (Cooke, 1981 ; Roberts et Verrel, 1984) par suite de la présence dans l'environnement de substances polluantes, de l'absence d'oxygène ou d'un mauvais régime alimentaire.

Borkin et Pikulik (1986), pour les anomalies observées en masse (18% chez des ranidés adultes) considèrent qu'il y a des facteurs exogènes (probablement un virus) capables d'induire une polydactylie. Ce virus pourrait être rapporté à la présence de poissons (*Anguilla*). Dans la région où *Triturus marmoratus* a été capturé, pendant l'hiver, quelques anguilles ont effectivement été entraînées dans les mares, ce qui pourrait nous faire croire à une cause virale, bien que le pourcentage de cas anormaux observé ne soit pas très élevé.

Le système endocrinien joue aussi un rôle important dans la formation et régénération des membres (Sliwa, 1981 ; Scadding 1981b). Chapron (1986) considère que la régénération des membres chez les Urodèles est contrôlée par la vascularisation, par les hormones, par l'épithélium cicatrisant et par

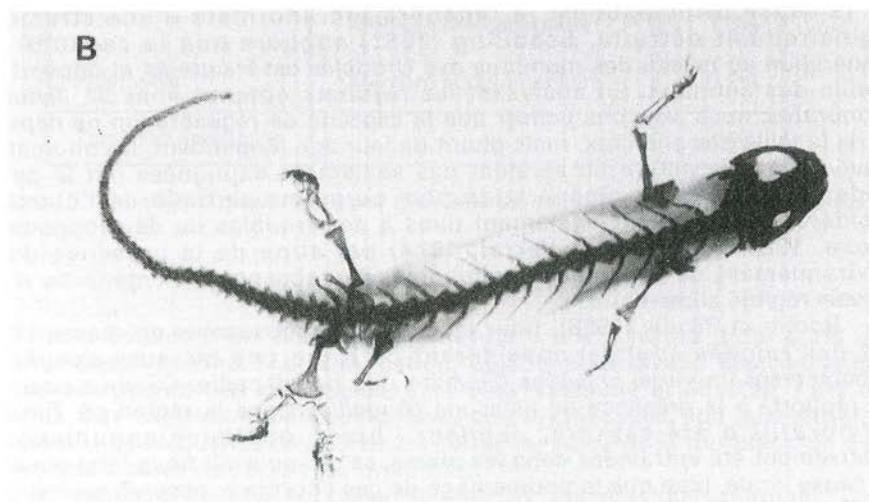
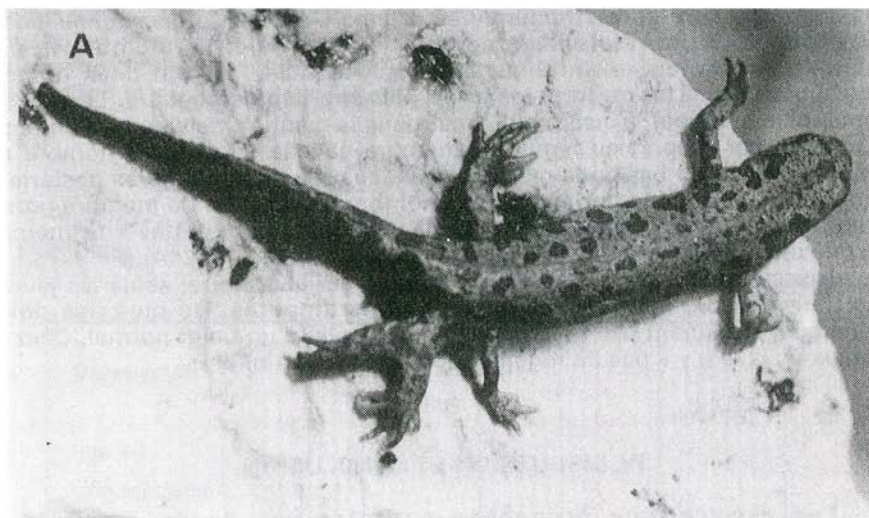


Figure 1 A : Formation d'un membre supplémentaire, bifurqué chez *Triturus marmoratus* adulte, mâle. Oligodactylie sur le membre postérieur en position plus antérieure sur la deuxième patte du membre supplémentaire.
 B : Le rayon-X montre le degré d'ossification et l'insertion des membres postérieurs sur la ceinture pelvienne.

l'innervation. Une altération de ces systèmes pourrait conduire à des formes aberrantes. Il est aussi important de ne pas oublier les facteurs génétiques dans la détermination des cas tératologiques. L'analyse des cas de polydactylies suggère que ceux-ci peuvent être acquis par héritage, comme un caractère récessif ou dominant (voir Rostand, 1951 ; Dubois, 1974). En ce qui concerne la présence d'un membre supplémentaire, on pourrait aller jusqu'à une erreur chromosomique ou un problème survenant au cours du développement embryonnaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BORKIN, L.J. et PIKULIK, M.M. (1986) — The occurrence of polymely and polydactily in natural populations of anurans of the USSR. *Amphibia-Reptilia*, 7(3) : 205-216.
- CAETANO, M.H. (1988) — Estudo sobre a biologia das populações portuguesas de *Triturus marmoratus* (Latreille, 1800) e *Triturus boscai* (Lataste, 1879). Morfologia, Ecologia, Crescimento e Variabilidade. Tese de Doutoramento Univ. Lisboa. 360 p.
- CHAPRON, C. (1986) — La régénération. In : *Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie*. 14(I) (P.P. Grassé et M. Delsol. éds.) pp. Masson. Paris.
- COOKE, A.S. (1981) — Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. *Environmental Pollution Series A*, 25 : 123-133.
- DUBOIS, A. (1974) — Polydactylie massive, associée à la clinodactylie, dans une population de *Rana graeca*. Remarques sur la polydactylie faible et la clinodactylie chez *Bufo bufo* (Amphibien Anoures). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 99(3) : 505-521.
- GRIFFITHS, R.A. (1981) — Physical abnormalities and accessory limb growth in the smooth newt, *Triturus vulgaris*. *Brit. J. Herp.*, 6 : 180-182.
- HELLMICH, W. (1929) — Mehrfachbildungen von extremitäten bei Amphibien (Naturfunde). W. Roux, *Arch. Entwickl. Mechanik*, 115 : 409-414.
- MALKMUS, R. (1981) — Bemerkungen zu einer *Triturus boscai* Population in einem Brunnenbecken der Serra de Sintra. *Boll. Soc. Port. Ciên. Nat.*, 20 : 25-40.
- MEYER-ROCHOW, B. et ASASHIMA, M. (1988) — Naturally Occurring Morphological abnormalities in wild populations of the Japanese newts *Cynops pyrrhogaster* (Salamandridae ; Urodela ; Amphibia). *Zool. Anz.*, 221(1/2) S : 70-80.
- ROBERTS, J.M. et VERREL, P.A. (1984) — Physical abnormalities of the limbs of smooth newts (*Triturus vulgaris*) (Short note). *Brit. J. Herp.*, 6 : 416-418.
- ROSTAND, J. (1951) — Sur la polydactylie des Batraciens Anoures. *Bull. Biol. France Belg.*, 85(2) : 113-136.
- SCADDING, S.R. (1981a) — Limb regeneration in adult amphibia. *Can. J. Zool.*, 59 : 34-46.
- SCADDING, S.R. (1981b) — Role of prostaglandins in amphibian limb regeneration. *Can. J. Zool.*, 59 : 136-137.

SLIWA, L. (1981) — The activity of the nucleus preopticus during limb regeneration in adult newts, *Triturus vulgaris*. *Folia Biol. (Krakov)*, 29(2) : 11-117.

M.H. CAETANO
Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências
C-2 Campo Grande
1700 LISBOA (PORTUGAL)

Bulletin de la Société Herpétologique de France

1^{er} trimestre 1991

n° 57

NOTES - VIE DE LA SOCIÉTÉ - INFORMATIONS

VIE DE LA SOCIÉTÉ

• Rapport moral de la S.H.F. pour 1989 Jean-Marc FRANCAZ.....	60
• Rapport financier pour 1989 Michel LEMIRE.....	63
• Compte-rendu de l'assemblée générale d'Amiens (30 Juin 1990) Jean-Marc FRANCAZ.....	66
• Compte-rendu des journées annuelles d'Amiens (28-30 Juin 1990) Roland VERNET.....	70

VIE DE LA SOCIÉTÉ

• RAPPORT MORAL DE LA SHF pour 1989

Le rapport moral est l'occasion de faire, chaque année, l'état des lieux de toute association et d'en rendre compte à l'ensemble des adhérents.

L'année 1989 a été marquée par la dimension internationale avec le Congrès Mondial d'Herpétologie de Canterbury (Angleterre) en septembre, où notre S.H.F. a eu une participation remarquée, tant pour les communications scientifiques que pour la contribution des terrariophiles. Nous avons désormais des adhérents dans 4 continents sur 5 (puisque seule l'Océanie ne compte pas d'adhérents), dans une vingtaine de pays.

Le **nombre d'adhérents** a repris une croissance ascendante, puisque nous approchons maintenant de **570 membres**, ce chiffre reste assez relatif, car il est très sensible, d'une part à la rapidité avec laquelle le secrétariat traite les nouvelles adhésions et procède à la radiation des adhérents en retard de cotisation. Autre point de satisfaction : nous avons maintenant très peu de pertes d'adhérents ("N'habite plus à l'adresse indiquée") en raison de la mise à jour régulière du fichier informatique, du souci qu'ont nos adhérents de communiquer leurs nouvelles adresses et du moyen prodigieux que constitue, pour la France, le MINITEL, qui permet de retrouver un certain nombre d'adhérents (dans la mesure où leur nom propre n'est pas trop commun).

Faisons un rapide tour d'horizon :

— **la commission d'Ethnoherpétologie et d'Histoire de l'Herpétologie (Mlle BODSON)**, se réunit régulièrement ; elle continue son enquête sur les "Connaissances et traditions populaires relatives à l'herpétofaune des pays européens francophones" qui doit recevoir l'appui de tous les membres de la S.H.F. Si vous manquez d'observations ou de souvenirs personnels, recherchez dans les bibliothèques régionales, dans "Arts et traditions populaires", dans les livres d'histoire et de traditions régionales existants (il s'en publie beaucoup ces temps-ci !). C'est souvent beaucoup plus rentable que l'interview de personnes (je l'ai moi-même vérifié). Il en est de même pour le travail de recherche sur les rumeurs concernant les lâchers de vipères, où l'exploitation de la presse régionale peut être efficace...

— **la commission Répartition (J. CASTANET, R. GUYÉTANT)**, a terminé l'Atlas herpétologique (si longtemps attendu !) et le livrera aux souscripteurs pour l'Assemblée générale 1990. Ces derniers seront récompensés de leur longue attente et oublieront, je l'espère, leur légitime impatience !

— **la commission Terrariophilie**, sous l'impulsion de **P. DAVID**, est toujours aussi active ; elle regorge d'initiatives ; c'est d'ailleurs, par son effectif, la commission la plus nombreuse de la S.H.F...

— **la circulaire d'annonces (P. DAVID)**, est maintenant bien connue et intéresse de plus en plus nos membres. N'oubliez pas, si vous êtes intéressés, d'envoyer à P. DAVID, une provision d'enveloppes affranchies au tarif "Lettre".

— **la section parisienne (D. TROMBETTA)** réunit un groupe de fidèles, avec des sujets variés, un samedi matin de chaque mois, à l'Ecole Normale Supérieure, rue d'Ulm. Lançons toutefois un appel à des conférenciers d'une part, à une assistance plus grande d'autre part, car près de 230 circulaires sont expédiées chaque trimestre !

— **la commission Protection (J. LESCURE)** a une activité tout à fait soutenue, bien souvent orientée sur la protection des biotopes.

— **le groupe Cistude (J. VEYSSET)** diffuse régulièrement à ses membres sa lettre du groupe "Cistude", dont certaines informations mériteraient publication dans le Bulletin.

— **le Club "Junior"** a été repris par **Mlle Y. VASSE**, aidée par **M. LE DU**, et ses activités se poursuivent. Rappelons que tout membre actif du Club Junior devient membre de la S.H.F. lorsqu'il atteint 16 ans. Ce club prépare donc la S.H.F. de l'an 2000, à la condition que ce passage à l'âge de 16 ans dans la "grande" S.H.F. se fasse sans déperdition anormale !

Une disparition toutefois à signaler : **le groupe audio-visuel**, qui a eu des réalisations remarquables (cassette audio-visuelle, maintenant épuisée ; plusieurs expositions photos). Remercions ses animateurs (COATMEUR, FAUCHEUX, HEUCLIN), qui, après toutes ces réalisations, ont laissé une situation parfaitement saine. Les membres de ce groupe seront inscrits par le secrétariat au sein de la commission Protection (dont le groupe Audio-Visuel était d'ailleurs une émanation).

Quelques commissions ou groupes n'ont pas encore vraiment démarré. Que ceux qui s'y intéressent, réfléchissent à la meilleure manière de les dynamiser.

A ce propos, tout membre de la S.H.F., où qu'il réside, peut participer à la commission de son choix, à condition de contribuer à son travail (y compris par courrier). Le nombre des commissions auxquelles peut participer un adhérent a été limité à 2 (non compris les sections locales), car nous nous sommes aperçus que s'inscrire à toutes les commissions aboutissait, en pratique, à ne participer à aucune... Si l'une de vos inscriptions antérieures n'a pas abouti, écrivez au responsable de la commission qui vous intéresse (adresses dans le Bulletin), avec copie au Secrétaire général pour inscription au fichier.

— **Le Bulletin de la S.H.F. (VERNET, GUYÉTANT et al.)**, doit être à la fois un périodique d'une haute tenue scientifique, dans sa première partie, et un échange d'informations à l'intérieur de la S.H.F. dans sa deuxième partie. Il est reconnu comme un véritable Bulletin scientifique, tout en demeurant à un coût modique et apprécié de tous. R. VERNET a cherché à égayer sa présentation en y introduisant des dessins, R. GUYÉTANT en assure l'impression et le routage, mais les contraintes de l'imprimerie, et notamment la réalisation de l'Atlas, ont augmenté son retard, certes chronique, mais qui commençait à se résorber. Que

tous essayent de fournir des articles : ainsi, son contenu paraîtra plus équilibré...

Les Journées Annuelles de 1989, à Besançon, ont été un succès, grâce à l'organisation assurée par notre président, R. GUYÉTANT.

Merci encore à Robert GUYÉTANT et son équipe bisontine, pour ce Congrès, et, d'une façon générale, pour tout ce qu'ils font, tout au long de l'année, pour la S.H.F.

"Keine Rose ohne Dornen" ("Il n'y a pas de roses sans épines"), dit un proverbe allemand.

Pourquoi en serait-il différemment à la S.H.F. ?

Des points restent toujours à améliorer, notamment la réduction des délais de réponse à des demandes de renseignements ou d'admissions qui parviennent directement à notre siège social (Université PARIS 7), la réduction des délais d'admission des nouveaux membres et surtout leur accueil au sein de la S.H.F. une fois leur admission prononcée. Je conçois fort bien que ceux qui ne peuvent participer à nos réunions (section parisienne, commissions ou congrès annuel) doivent plus se sentir abonnés à un bulletin, à parution parfois irrégulière, que véritablement membres d'une association. Enfin, secrétaire et trésoriers ont souvent du mal à faire face, au moins à certaines périodes, notamment en matière de suivi et de gestions des cotisations. Certains rappels non justifiés s'expliquent souvent par ce fait ; que nos adhérents veuillent bien nous excuser.

Une chose que nous ne pourrons jamais faire dans nos documents, c'est décrire la convivialité de nos Journées annuelles, bien connue de nos adhérents les plus anciens... Nous avons en effet la prétention d'être une société scientifique où l'on ne s'ennuie pas...

Les membres du Conseil estiment faire tout ce qu'ils peuvent, compte-tenu de leurs autres occupations, pour continuer un développement tranquille et régulier de la S.H.F., pour lui assurer un renom international et en faire, sans hâte, mais avec persévérance l'une des grandes sociétés herpétologiques mondiales.

Longue vie à la S.H.F. Merci à vous tous !

J.-M. FRANCAZ

Effectifs des différents groupes et commissions

(selon renseignements en ma possession au 07/05/90)

N.B. Les Membres du C.A. sont réputés appartenir à tous et ne sont donc pas comptabilisés dans les effectifs des groupes et commissions - sauf membres du C.A. demeurant en Ile de France pour la section parisienne -.

@ - Section Parisienne : 236

O - Groupe Audio Visuel : 6

C - Conseil d'administration : 11

E - Commission d'Ethnoherpétologie : 44 (dont 9 extérieurs à la SHF)

J - Club Juniors :

23 adhérents simples, auxquels il faut ajouter

20 abonnés au Bulletin.

- Comité de lecture : 11
 P - Commission de Protection : 63
 K - Groupe de Cistude (codifié K ; ne pas confondre avec K ou k suivant le chiffre de la dernière cotisation payée, et qui correspond à l'envoi de la carte).
 R - Commission de Répartition : 38
 T - Commission de Terrariophilie : 99
 V - Groupe Venins : 11 (Création récente 07/87).

Effectif SHF : 561 (non-compris les Juniors et les abonnés)

• Rapport financier année 1989

La Société Herpétologique de France se porte bien car la comptabilité, pour cette année, comme pour l'année précédente, apparaît excédentaire :

Montant des recettes : 148.964,48 Frs

Mont des dépenses : 128.220,83 Frs

soit un excédent sur le compte CCP de la Société de 20.743,83 Frs.

Toutefois, le solde CCP de l'année dernière était au 1er janvier 1989 de 39.745,27 Frs, ce qui signe une légère perte de vitesse dans la croissance économique de la Société : perte de vitesse que nous avons compensée, dans le courant de l'année, en plaçant la subvention du Ministère de l'Environnement, pour l'Atlas de répartition (les retards de parution ne sont pas toujours néfastes !).

D'autre part, les comptes du Bulletin (qui sont inclus dans les chiffres globaux précédents) laissent apparaître un déficit de 3.113,98 Frs (recettes : 22.448,26 Frs ; dépenses : 25.582,24 Frs).

Compte-tenu de l'augmentation du coût de l'impression et du routage du Bulletin (avec l'augmentation du tarif des PTT), je propose une augmentation de la cotisation de 105 Frs à 120 Frs, soit l'affiliation à la SHF 60 Frs + le Bulletin à 60 Frs (au lieu respectivement de 50 et 55 Frs).

Cela doit nous mettre à l'abri de l'augmentation du coût de la vie. Par ailleurs, cette augmentation (raisonnable) doit nous permettre de financer le traitement des données informatisées, de façon à alléger le secrétariat et la comptabilité, tout en regroupant les diverses données sur un mode unique d'informatisation et en évitant ainsi des transmissions successives de chèques d'une personne à une autre, d'où des erreurs ou des omissions dont les trésoriers vous prient de bien vouloir les excuser.

Par ailleurs, la Société possède un livret de Caisse d'Epargne avec 25.471,89 Frs de réserve et le compte Souscription Atlas de répartition avec un avoir de 30.678,95 Frs à la fin de l'année 1989.

Enfin, dernière précision, sauf omission (involontaire), la Société règle ses factures dans la quinzaine qui suit leur réception ; donc pas d'arriérés !

Un tout dernier mot, ce fut un plaisir pour moi d'aligner des chiffres... mais tout plaisir a des limites que je ne saurai transgresser. En conséquence, je vous fais savoir que je rends le tiroir-caisse, en souhaitant bon courage au nouveau trésorier (attention, il s'use vite !).

Michel LEMIRE

DETAIL DES DEPENSES DE L'ANNEE		DETAIL DES RECETTES DE L'ANNEE	
chèques imputés	315,00	Compte d'attente	0,00
ACHAT LIVRES-BROCHURES	0,00	Virements internes	5 715,00
Les Serpents de France	600,00	VENTES DE LIVRES ET BROCHURES	
Maladies des Reptiles (Point Vêto)	0,00	Les Lézards de France	65,00
Tortues d'eau douce et terrestres (Point Vêto)	0,00	Les Serpents de France	1 790,00
Serpents de Guyane (ORSTOM)	0,00	Les Amphibiens de France	1 210,00
Serpents du Laos (ORSTOM)	0,00	Article venin Chippaux	400,00
REMBOURSEMENTS AU S.F.F.	1 245,96	La Hulotte (n° Crapaud accoucheur + Tortue)	0,00
Livre rouge des espèces menacées	0,00	Via des Rept. de France centrale (Rollinat)	290,00
Biographie de l'Herpétologie française	350,00	Reproduction Reptiles (Matz)	0,00
ACHATS ET REALISATIONS DIVERS	0,00	Fascicules élevages (Beron)	0,00
Affiche Reptiles et Amphibiens	0,00	Serpents de Guyane	110,00
Depilant livres et brochures S.H.F.	0,00	Serpents du Laos	110,00
Cassette "Chants Amphibiens"	0,00	Atlas Linguado-Roussillon	150,00
Achats divers (Diaporama VASSE)	495,00	Colloque Ornitho + faune 14/09/89	1 590,00
Brochures Zorana	0,00	Atlas Rept-Amphib. Bretagne	0,00
Faune du Sahara	1 575,00	DEPOT LIVRES S.F.F.	850,00
FOURNITURES ADMINISTRATIVES :	4 782,20	encart publicitaire dans Bulletin	250,00
CHARGES :	72 476,87	Biographie de l'Herpétologie française	600,00
Remboursement trop perçu	125,00	VENTES DIVERSES :	
Frais de Conset	6 809,12	Affiche Reptiles et Amphibiens	130,00
Frais de Colloques - Stand S.H.F.	0,00	Vidéo-cassette Amphibiens	2 000,00
Frais complétabilité	1 248,50	Publications (anciens n° du bulletin)	681,00
Journées annuelles 1989 Besançon	16 966,25	Autocollants S.H.F.	370,00
Stage Juniors (assurance, cotis. CPN)	408,00	Enveloppe "Caméleon"	0,00
Reversement souscription Atlas	420,00	Cassette "Chants Amphibiens"	520,00
Versement sur compte BNP	46 500,00	Pathologie des reptiles (Point Vêto)	894,00
AUTRES CHARGES :		Elevage Tortues (Point Vêto)	600,00
ACTIVITES INTEGRES :	15 609,99	Faune du Sahara	2 250,00
Section parisienne S.H.F.	1 806,70	AUTRES PRODUITS :	1 624,00
Enquête Répartition Reptiles-Amphibiens	0,00	Régénération frais d'envois facturés	124,00
Cartographie européenne	7 865,88	Régénération avance sur subvention Besançon	1 500,00
Commissions internes de la S.H.F.	2 042,16	SUBVENTIONS D'EXPLOITATION :	
Club Juniors S.H.F.	3 895,25	1° MINISTERE de l'environnement :	
Groupe Audio-Visuel	0,00	Enquête répartition Reptiles et Amphibiens	40 000,00
AUTRES SERVICES EXTERIEURS :	5 606,24	2° COTISATIONS versées par les membres :	
Honoraires Avocat	0,00	Cotisations année 1987	50,00
Frais postaux et télécommunications	4 461,24	Cotisations année 1988	2 915,00
Services bancaires et assimilés	5,00	Cotisations année 1989	15 273,80
Cotisations versées et concours divers	1 140,00	Cotisations année 1990	960,00
TOTAL DEPENSES SOCIÉTÉ	103 056,26	Cotisations année 1991	100,00
Disponible trésorerie :	-15 867,46	Cotisations année 1992	50,00
TOTAL DEPENSES BULLETTIN	25 582,24	PRODUITS ACCESSOIRES :	11 986,00
TOTAL DEPENSES	128 638,50	Souscription Atlas répartition	420,00
LESSURE (avance déplacement CPN)	-417,85	Subvention Congrès Besançon	11 566,00
TOTAL DEPENSES	128 220,65	PRODUITS EXCEPTIONNELS (la reverser)	
SOLDE CCP au 28/12/89	20 743,83	Souscription Tortue des Maures (SOPOTM)	220,00
		TOTAL RECETTES SOCIÉTÉ	87 188,80
		Solde C.C.P. au 01/01/89	39 745,27
		TOTAL RECETTES BULLETTIN	22 448,26
		TOTAL RECETTES	149 382,33
		LESSURE (avance déplacement CPN)	-417,85
			148 964,48

C O M P T E B U L L E T I N 1 9 8 9		C O M P T E B U L L E T I N 1 9 8 9	
Détail des RECETTES DE L'ANNEE		Détail des DEPENSES DE L'ANNEE	
ABONNEMENTS		FACTURES DES BULLETINS 1987	
Bulletins Année 1987 (n° 41-42-43-44)	120,00	Imprimerie n° 44 (4e tr. 87)	4 072,50
Bulletins Année 1988 (n° 45-46-47-48)	361,83	FACTURES DES BULLETINS 1988	16 910,00
Bulletins Année 1989 (n° 49-50-51-52)	1 094,43	Imprimerie n° 45 (1e tr. 88)	4 155,00
Bulletins Année 1990 (n° 53-54-55-56)	342,00	Imprimerie n° 46 (2e tr. 88)	4 200,00
PACT BULLETIN SURCOTISATIONS	20 630,00	Imprimerie n° 47 (3e tr. 88)	4 852,50
De l'année 1987	45,00	Imprimerie n° 48 (4e tr. 88)	3 702,50
De l'année 1988	3 385,00		
De l'année 1989	15 835,00	FACTURES DES BULLETINS 1988	2 967,04
De l'année 1990	1 100,00	Affranchissement du n° 46 (2e tr. 88)	797,72
De l'année 1991	110,00	Affranchissement du n° 47 (3e tr. 88)	1 340,80
De l'année 1992	55,00	Affranchissement du n° 48 (4e tr. 88)	828,52
TOTAL RECETTES	22 448,26	CHARGES DIVERSES	1 632,70
		Composition, tirage d'articles	800,00
		Charges du comité de lecture	832,70
		TOTAL DEPENSES	25 582,24
Versement de la Société	2 133,36	TOTAL GENERAL	25 582,24
TOTAL GENERAL	25 582,24		

• **Compte rendu de l'assemblée générale d'Amiens (30 Juin 1990)**

Séance ouverte à 14h50

I. Constitution du Bureau de l'Assemblée, de la Commission de Scrutateurs et du Collège des Commissaires aux Comptes

Bureau :

Président : R. GUYÉTANT (Président S.H.F.)
Secrétaire : P. DAVID (Secrétaire-Adjoint)

Scrutateurs : MM. J. DETRAIT

R. VERNET

Mlle V. GOOSSE

Commissaires aux comptes : Mlle M. ALCOBENDAS

M. J. BOISARD

II. Présentation du Rapport moral 1989

par le Secrétaire-adjoint, P. DAVID, qui donne lecture du document (voir p.60-62), qui a été rédigé par le Secrétaire Général, J.-Marc FRANCAZ (excusé).

Vote du Rapport moral :

Pour : 59 (adopté)

Contre : 0

Abstentions : 0

III. Rapport financier et fixation de la cotisation 1991

Rapport des Commissaires aux comptes : "La comptabilité est bien tenue et il n'y a pas de remarques particulières à formuler".

Le rapport financier est **adopté à l'unanimité**, l'A.G. donnant quitus au Trésorier (Pour : 59 ; Contre : 0 ; Abstentions : 0).

Proposition pour augmenter la cotisation **1991**, qui passerait de 105 à **120 F**. Certains membres proposent de porter la cotisation à 150 F, ce qui resterait bas par rapport à d'autres sociétés du même type. Après débat, la proposition à 120 F est mise au vote :

Pour : 54 (adopté)

Contre : 1

Abstentions : 4

M. LEMIRE fait part de sa démission du poste de trésorier-adjoint à compter de la présente A.G.

IV. Elections pour le renouvellement du Conseil d'Administration

R. GUYÉTANT rappelle le nombre de poste à pourvoir, le nombre de candidats et leur nom, la possibilité de modifier la liste proposée et de remplacer certains candidats par d'autres.

Sortants non rééligibles : néant.

Sortants rééligibles : J.-M. EXBRAYAT, R. GUYÉTANT (ne se représente pas).

5 candidatures ont été reçues en temps utile par le Secrétaire général.
Candidats : Mme MORRIER Christine, Mme VASSE Yannick, MM. BARON Jean-Pierre, CHABAUD Raymond et EXBRAYAT Jean-Marie.
Le nombre de sièges à pourvoir est de cinq.
Les bulletins doivent donc compter au plus cinq noms.

V. Comptes-rendus des Commissions

A. Commission de Protection

Rapport présenté par J. LESCURE (voir rapport rédigé par le responsable). Sont évoqués les points suivants :

- création d'un village pour la gestion et la protection de la Tortue d'Hermann en Corse ;
- protection des biotopes à *Vipera ursinii* par l'Office National de la Chasse. Des stages de formation des gardes seront effectués par J.-P. BARON au nom de la S.H.F. ;
- intervention sur l'installation d'une ferme à crocodiles dans les Landes.

J. LESCURE signale la rédaction de deux motions, concernant respectivement la protection de la plaine des Maures et le captage d'une source pour alimenter un canon à neige sur un biotope à *Lacerta agilis*.

J. CASTANET signale à l'A.G. que la S.H.F. a participé à une exposition à CHATILLON SOUS BAGNEUX sur les espèces menacées avec présentation de panneaux sur le Crapaud vert, la Vipère d'Ursini et la Tortue d'Hermann.

B. Groupe Cistude

Rapport présenté par A. VEYSSET.

Le groupe Cistude a été réactivé et six lettres de liaison ont été envoyées pour tenir les membres informés et stimuler les activités.

Une motion sur le commerce des Tortues de Floride a été préparée. L'activité du groupe Cistude a été saluée par R. GUYÉTANT et son responsable vivement remercié.

C. Commission de Terrariophilie

Le rapport est présenté pour l'année 1989 par P. DAVID.

L'activité pendant les premiers mois de 1990 ne s'est pas ralentie. En particulier, la commission de Terrariophilie a rédigé une motion, approuvée par le Conseil en janvier 1990, sur l'importance de la terrariophilie et qui sera présentée à l'A.G. (au point VIII de l'ordre du jour).

D. Commission de répartition

Rapport présenté par J. CASTANET.

L'assemblée générale a remercié J. CASTANET et R. GUYÉTANT pour leur activité de coordinateurs nationaux pour l'Atlas de la S.H.F.

E. Club "Juniors"

Rapport présenté par Y. VASSE.

Le Club Junior a organisé durant l'année scolaire deux réunions et deux sorties. Des stages pour les jeunes sont envisagés sous la responsabilité de E. HEROLD et A. PINSTON.

Il faut également signaler la parution de deux numéros de "La Muraille Vivante" et la création d'un badge du "Club Junior".

C. Commission d'Ethnoherpétologie

Rapport rédigé par Mlle BODSON et lu par J. LESCURE.

VI. Résultats du vote pour le renouvellement du C.A.

Votants : 115

(37 présents + 28 pouvoirs + 50 votes par correspondance validés)

Suffrages exprimés : 107

Ont obtenu :	M. J.-P. BARON :	101 voix	Elu
	Mme Ch. MORRIER :	96 voix	Elue
	Mme Y. VASSE :	90 voix	Elue
	M. J.-M. EXBRAYAT :	89 voix	Elu
	M. R. CHABAUD :	66 voix	Elu

(non-candidats) : H. ST-GIRONS 5 voix ; R. GUYÉTANT : 3 voix ; MM. DE HAAN, DORÉ, DUPRÉ, MAURIN : 1 voix chacun.

VII. Prochaines Journées annuelles

Pour 1991, proposition de tenir les Journées annuelles à **ORSAY** (Université de Paris-Sud), dans l'Essonne. Les dates proposées, et apparemment les seules possibles d'après l'organisateur (J. HOURDRY) sont à la période du 17 au 20 juin. Le thème principal n'est pas encore fixé.

Pour 1992, proposition pour **SIGÉAN**. Thème : la faune du littoral méditerranéen, en particulier des garrigues et du cordon littoral.

Date proposée : du 4 au 11 juillet 1992, ou bien courant juin. M. BOISARD signale la possibilité de logement en bungalows revenant à 2300 F la semaine pour 4 personnes, et la possibilité de camping.

Pour 1993 : LIÈGE ou NANCY.

Pour 1991, la proposition d'ORSAY est retenue par l'A.G.

VIII. Motions ; questions diverses

1) Motion sur la plaine des Maures, présentée par J. LESCURE.

Pour : 59 (adoptée à l'unanimité)
Contre : 0
Abstentions : 0

2) Motion sur le captage d'une source de montagne pour un canon à neige, présentée par J. LESCURE.

Pour : 59 (adoptée à l'unanimité)
Contre : 0
Abstentions : 0

3) Motion sur le rôle de la Terrariophilie, présentée par P. DAVID.

Cette motion émane de la commission de Terrariophilie. Après un long débat ne concernant que la rédaction d'une phrase de cette motion, le texte suivant est soumis au vote :

"La Société Herpétologique de France souligne le rôle joué par les herpétologistes non-professionnels dans le développement des connaissances sur la Biologie et la Pathologie des Amphibiens et des Reptiles.

Dans ce cadre, la Société Herpétologique de France reconnaît l'importance, d'une part des naturalistes de terrain, et, d'autre part, de l'observation et de l'élevage en captivité des Amphibiens et des Reptiles".

Pour : 59 (adoptée à l'unanimité)
Contre : 0
Abstentions : 0

4) Motion sur l'importation de la Tortue de Floride, présentée par J. CASTANET et A. VEYSSET.

Dans le texte original, il est demandé l'interdiction de l'importation de cette espèce. Cette demande a suscité un débat dans lesquels les **principaux** intervenants

furent, par ordre alphabétique : J. CASTANET, P. DAVID, M. LIANO, H. MAURIN, G. NAULLEAU, H. SAINT-GIRONS et A. VEYSSET.

Le texte a été modifié, et la demande d'interdiction a été remplacée par un critère de taille minimale, à définir, lors de l'importation, afin d'éviter des achats inconsidérés. La pollution de la faune locale par suite de relâchers ou de fuites d'animaux de cette espèce a été souligné.

La motion modifiée, avec critère de taille minimale, a été mise au vote.

Pour :	53 (adoptée)
Contre :	0
Abstentions :	6

5) Divers

R. GUYÉTANT, président démissionnaire, remercie les membres de la S.H.F. pour leur participation à la bonne marche de la société et pour leur collaboration à l'élaboration de l'Atlas.

G. NAULLEAU, membre fondateur et président d'honneur, remercie R. GUYÉTANT pour son mandat de président, son rôle de coordinateur pour l'Atlas et comme responsable du Bulletin. G. NAULLEAU remet à R. GUYÉTANT une médaille de remerciements.

L'Assemblée Générale, par ses acclamations, adresse ses félicitations et remerciements à Christine MORRIER pour la remarquable organisation de ces Journées Annuelles 1990.

Fin de l'A.G. à 17h20.

Le Secrétaire-Adjoint
Patrick DAVID

Pour approbation, le Président
Robert GUYÉTANT

• Compte-rendu des Journées annuelles d'Amiens (28-30 juin 1990)

La Réunion annuelle de la Société Herpétologique de France, s'est déroulée du 28 au 30 Juin 1990, à la maison de la Culture d'Amiens.

Christine MORRIER et ses collaborateurs ont accueilli 86 participants inscrits à ce colloque.

Le programme de ces journées a été chargé ainsi qu'en témoigne le résumé ci-dessous. Les communications ont été publiées dans les n^{os} 56, 57 et 58 du Bulletin.

Jeudi 28 Juin (matin) - Président de séance : C. MORRIER

- 9h00 Accueil des congressistes - Petit Théâtre de la Maison de la Culture - Place Léon Gontier
Allocutions de bienvenue :
Monsieur Robert GUYÉTANT, Président de la S.H.F.
Christine MORRIER, Chargée de la Culture Scientifique à la ville d'Amiens.
- 9h30 Jacques H. DUMÉRIL - WWF - Suisse -ZURICH
Evocation sur la famille DUMÉRIL, originaire d'Amiens.
- 10h00 Jean LESCURE - Museum d'Histoire Naturelle de Paris.
"A.M.C. DUMÉRIL, père de l'Herpétologie".
- 10h30 Jacques CASTANET - Université de Paris VII
"Identification de 2 espèces de lézards fossiles de l'île de Hierro (Canaries) à l'aide de l'histologie osseuse".
- 10h45 Annie ZUIDERWIJK - Institut de Zoologie - Amsterdam
"Les stratégies sexuelles chez *Triturus cristatus* et *Triturus marmoratus*".
- 11h15 Cassian BON - Institut Pasteur - Paris
"Les venins de serpents".
- 12h00 Réception à l'Hôtel de Ville.
Allocution de M. Fred THOREL, Adjoint au Maire, Chargé des Affaires Culturelles.
- 13h00 Repas au restaurant universitaire de la Hotoie.

Jeudi 28 Juin (après-midi) - Présidents de séance : J. LESCURE, puis R. GUYÉTANT

- 14h30 M. PONTROUE - Centre Culturel St Fuscien - Amiens
"Les Serpents dans l'art religieux".
- 15h00 Elisabeth MONDINI - Muséum de Paris, Laboratoire des Reptiles et Amphibiens
"Les Tortues de France : images et utilisations d'hier et d'aujourd'hui".
- 15h30 Hugues PINSTON - Université de Besançon, Laboratoire de Biologie et d'Ecologie
"Restauration de la valeur biologique et esthétique des sources, fontaines, abreuvoirs, lavoirs... Le cas des Amphibiens et Reptiles".
- 16h00 Sophie POUJOL - Muséum de Paris, Laboratoire d'Ethno-Biologie
"Quelques croyances populaires sur les serpents chez les Soninké du Mali".
- 16h30 Geneviève CALAME-GRIAULE - C.N.R.S. Paris
"Polyvalence symbolique du Serpent chez les Dogons du Mali".
- 17h00 Elisabeth REMY - Muséum de Paris, Laboratoire d'Ethno-Biologie
Communication dite par Jean LESCURE
"La rumeur des lâchers de vipères".
- 20h00 Dîner au L.E.P. Hôtelier Edouard Gand, 25 boulevard de Guyencourt.

Vendredi 29 Juin (matin) - Présidents de séance : H. MAURIN, puis H. SAINT-GIRONS.

- 9h30 Guy NAULLEAU-CEBAS, Beauvoir-sur-Niort
"Données écologiques d'une population de Cistudes (*Emys orbicularis*) fréquentant un milieu aquatique à grandes variations de niveau".
- 10h00 Maria Hélène CAETANO - Muséum de Sciences Naturelles de Lisbonne
"Anomalies et régénération des membres chez *Triturus marmoratus*".
- 10h30 Salvador BAÏLON - Muséum de Paris, Laboratoire d'Anatomie comparée
"Le genre Malpolon (Serpents, Colubridae) dans les gisements français".
- 11h15 Claude MIAUD, Université de Lyon I, Laboratoire de Biologie animale et d'Ecologie
"Les caractéristiques démographiques des Tritons du genre *Triturus*".
- 11h45 Christian DOURNON - Faculté des Sciences de Nancy
"Différenciation sexuelle et prolifération des cellules germinales chez l'amphibien *Pleurodeles Walti*".
- 12h15 Jean-Marie EXBRAYAT - Faculté catholique des Sciences de Lyon
"Anatomie du cloaque chez quelques Gymnophiones".
- 13h00 Déjeuner au restaurant universitaire de la Hotoie.

Vendredi 29 juin (après-midi) - Présidents de séance : Guy NAULLEAU puis B. LE GARFF.

- 14h30 Robert DORÉ - Beaumont (Puy de Dôme)
"La Vipère péliade en Picardie".
- 15h00 Hervé MAURIN, Muséum de Paris, secrétariat Faune-Flore et Flore et Marc CHEYLAN, EPHE/USTL, Montpellier
"Objectifs et état d'avancement de l'observatoire du patrimoine naturel, cas des Reptiles et Amphibiens".
- 16h00 Patricia FOURCADE - Muséum de Paris, Laboratoire d'Ethno-Biologie
"Survivance de thériques et d'alcools de vipères dans la pharmacopée populaire française de la fin du XIXe siècle".
- 16h45 Dominique GODET - Muséum de Paris, Laboratoire d'Ethno-Biologie
"Données écologiques, légendes et traditions populaires relatives à l'herpétofaune dans la Somme".
- 17h15 François TERRASSON - Muséum de Paris, Laboratoire d'évolution des systèmes naturels et modifiés
"Crapauds, lézards, herpétologistes : même destin, même image sociale".
- 18h00 Visite guidée de la cathédrale (facultative).
- 20h00 Banquet au Pré Porus - 95 rue Voyelle, Amiens.

Samedi 30 juin 1990

- 9h30 Réunions des Commissions de la S.H.F.
- 12h30 Déjeuner au restaurant universitaire de la Hotoie.
- 14h00 Réunion du Conseil d'Administration.
- 14h30 Assemblée générale "Salle Jean Vilar" (M.C.A.)
- 17h00 Réunion du nouveau Conseil d'Administration.
- 17h30 Clôture du congrès avec un concert du Trio de jazz MICHELI.

Expositions

Au cours de ce congrès, plusieurs expositions sur le thème de l'Herpétologie furent rassemblées dans le Hall de la Maison de la Culture.

1) Une exposition d'art, regroupant :

— Des sculptures céramiques de Joanna HAIR - Atelier de Céramique de CHINON (37).

— Des sculptures en terre cuite de Hervé MAURIN - Muséum National d'Histoire Naturelle.

- Des céramiques réalisées par le Centre d'Art Amiens Nord.
 - Des sculptures en ébène prêtées par François DEBIAIS (ALLIANCE)
- 86 - Civray.
- Deux cires anatomiques sous cadre bois du XVIIIe siècle prêtées par le Muséum National d'Histoire naturelle.
 - Des aquarelles de Denise WEBER (76- Dieppe).
 - Des aquarelles de Jean CHEVALLIER (94 - Fresnes).
 - Des livres, portraits et documents prêtés par Jacques DUMERIL (Zürich).
 - Une gravure représentant les armoiries de COLBERT prêtée par Madame de COLBERT (80 - Vergies).
- 2) Une exposition sur **Jules VERNE et les Reptiles**, réalisée par les Départements Culture et Enfance de la ville d'Amiens.
- 3) Une exposition sur les **Amphibiens et les Reptiles de Picardie**, réalisée par le Département Culture de la ville et le Groupe Environnement et Protection des Oiseaux de Picardie (G.E.P.O.P.).

En résumé, un congrès bien sympathique, mené de longue haleine et de main de maître par Christine MORRIER, tant sur le plan de l'organisation que de l'accueil et qui a réussi par ailleurs, à agrémenter ces journées d'une diversité d'activités artistiques, culturelles et... gastronomiques.

Roland VERNET

SOCIÉTÉ HERPÉTOLOGIQUE DE FRANCE

Association fondée en 1971
agrée par le Ministre de l'Environnement le 23 février 1978

Siège Social

Université de Paris VII, Laboratoire d'Anatomie comparée
2 Place Jussieu - 75251 PARIS Cedex 05

Secrétariat

Jean-Marc FRANCAZ, U.F.R. Sciences, B.P. 6759 - 45067 ORLÉANS Cedex 2

CONSEIL D'ADMINISTRATION

Président : Jean LESCURE, Laboratoire Amphibiens-Reptiles. M.N.H.N. 25 rue Cuvier, 75005 PARIS

Vice-Présidents : Jean-Pierre BARON, Ecole Maternelle Annexe, Rue de Jericho prolongée, 17000 LA ROCHELLE
Daniel TROMBETTA, 7 Avenue R. Schuman, 77184 EMERAINVILLE

Secrétaire général : Jean-Marc FRANCAZ, U.F.R. Sciences, B.P. 6759 - 45067 ORLÉANS Cedex 2

Secrétaire adjoint : Patrick DAVID, 14 Rue de la Somme - 94230 CACHAN

Trésorier : Bernard EMLINGER, 9 rue de l'Eglise, Sancy les Meaux, 77580 CRECY-LA-CHAPELLE

Trésorier adjoint : Raymond CHABAUD, 17 Cité Joly, 75011 PARIS

Autres membres du conseil : Jean-Marie EXBRAYAT, Bernard LE GARFF, Michel LEMIRE, Christine MORRIER et Yannick VASSE.

Membres d'Honneur : Guy NAULLEAU (CEBAS/CNRS, 79360 CHIZÉ) ; Gilbert MATZ (Fac. Sciences, ANGERS)

ADMISSIONS

Les admissions à la S.H.F. sont décidées par le Conseil d'Administration sur proposition de deux membres de la Société (art.3 des Statuts). N'envoyez votre cotisation au secrétaire général qu'après avoir reçu l'avis d'admission du conseil.

COTISATIONS 1991 / MEMBERSHIP

Tarifs (France, Europe, Afrique) :	Taux annuel		Bulletin		Total
— adhérents de moins de 20 ans	20	+	60	=	80 FRF
— adhérents de plus de 20 ans	60	+	60	=	120 FRF
— bienfaiteurs : minimum				=	200 FRF
— membre conjoint				=	60 FRF
 Tarifs (Amérique, Asie, Océanie) :	15	+	15	=	30 US\$

ABONNEMENTS/ SUBSCRIPTION to SHF Bulletin

France, Europe, Afrique	=	140 FRF
Amérique, Asie, Océanie	=	35 US\$

Le service de la revue est assuré aux membres à jour de leur cotisation.

To our members in America, Asia or Pacific area :

The SHF Bulletin is a quarterly. Our rates include the airmail postage in order to ensure a prompt delivery.

CLUB JUNIOR

Adhésion + Abonnement au journal (La Muraille vivante)	=	40 FRF
Abonnement au Bulletin de la SHF (facultatif)	=	60 FRF
Total	=	100 FRF

Modalités de règlement :

1. Chèque postal : à l'ordre de la SHF, CCP 3796-24 R Paris.
2. Chèque bancaire à l'ordre de la SHF. Envoi direct au secrétaire général (adresse ci-dessus).
3. Nous rappelons que les dons ou cotisations de soutien sont les bienvenus.

Changement d'adresse :

N'omettez pas de signaler sans retard au secrétariat tout changement d'adresse.

BIBLIOTHÈQUE

Les périodiques obtenus par la S.H.F. en échange avec les autres sociétés (liste publiée dans le bulletin) ainsi qu'une bibliothèque de tirés-à-part sont regroupés au Laboratoire de Biologie animale, Faculté des Sciences, 2 Bld Lavoisier - 49045 Angers Cedex. Les articles de ces périodiques peuvent être consultés sur demande adressée à G. MATZ. En outre, nous demandons aux auteurs d'envoyer leurs travaux récents en 2 exemplaires à cette bibliothèque.

**SOCIÉTÉ HERPÉTOLOGIQUE
DE FRANCE**

Association fondée en 1971
agrée par le Ministre de l'Environnement le 23 février 1978

Siège Social

Université de Paris VII, Laboratoire d'Anatomie comparée
2 Place Jussieu - 75251 PARIS Cedex 05

Secrétariat

Jean-Marc FRANCAZ, U.F.R. Sciences, B.P. 6759 - 45067 ORLÉANS Cedex 2
Tél. : 38.41.70.94
Télécopie (Fax) : 38.41.70.69
Télex : 783388 F UNIVORL

ADRESSES UTILES

Directeur de la publication : R. GUYÉTANT, Université de Besançon, Faculté des Sciences - 25030 BESANÇON Cedex

Responsable de la rédaction : R. VERNET, Ecole Normale Supérieure, Laboratoire d'Écologie, 46 rue d'Ulm - 75230 PARIS Cedex 05

Responsable enquête de répartition (Amphibiens) : R. GUYÉTANT (adresse ci-dessus)

Responsable enquête de répartition (Reptiles) : J. CASTANET, Université de Paris VII, Laboratoire d'Anatomie comparée, 2 place Jussieu - 75251 PARIS Cedex 05

Responsable de la commission de protection : J. LESCURE, Laboratoire Amphibiens-Reptiles, Muséum National d'Histoire Naturelle, 25 rue Cuvier - 75005 PARIS

Responsable de la commission d'ethnoherpétologie et histoire de l'herpétologie : L. BODSON, 33 rue Bois-l'Evêque - B 4000 LIÈGE, Belgique

Responsable de la commission de terrariophilie : P. DAVID, 14 rue de la Somme - 94230 CACHAN

Responsable de la circulaire d'annonces : P. DAVID (adresse ci-dessus)

Responsable des Archives et de la Bibliothèque : G. MATZ, Université d'Angers, Laboratoire de Biologie animale, 2 Bld Lavoisier - 49045 ANGERS Cedex

Responsable section parisienne : D. TROMBETTA, 7 Avenue R. Schumann, 77184 EMERAINVILLE

Responsable de la photothèque SHF : D. HEUCLIN, La Morcière - Vaux en Couhé - 86700 COUHÉ-VÉRAC

Responsables du Club Junior SHF : Y. VASSE, 35 rue de Wattignies - 75012 PARIS

Responsable du Groupe Cistude : A. VEYSSET, 3 rue Archimède - 91420 MORANGIS

Responsable du Groupe Venins :

Couverture : Hervé MAURIN
Sculpture en terre cuite de nouveau-né de tortue Luth
(*Dermochelys coriacea*)