

DETECTION HISTOCHIMIQUE DES GLUCIDES DANS
L'OVAIRE D'UN AMPHIBIEN GYMNOPHIONE :
BOULENGERULA BOULENGERI
PENDANT LA PERIODE DE REPRODUCTION

Hanan SERCLERAT¹, John MEASEY², *Jean-Marie EXBRAYAT¹, Christine CHEVALIER¹
*jmexbrayat@univ-catholyon.fr

¹ Université de Lyon, UMRS 449, Laboratoire de Biologie Générale, Université Catholique de Lyon et Laboratoire de Reproduction et Développement des Vertébrés, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 25 rue du Plat, F-69288 LYON Cedex 2

² DST-NRF Centre of Excellence for Invasion Biology, Faculty of Science, Stellenbosch University, Private Bag XI, Matieland 7602, South Africa

RESUME

Une étude histochimique a été effectuée afin de préciser la nature des composés chimiques présents dans les tissus ovariens de *Bouleengerula bouleengeri* au cours de l'ovogenèse et de la folliculogénèse. Le tissu conjonctif des nids germinatifs présente une faible réactivité à l'APS et une coloration également faible au bleu alcian à pH 2,5, indiquant la présence de protéoglycannes carboxylés. Les proléoglycannes neutres et/ou carboxylés ont également été détectés grâce à la réaction à l'APS et à la coloration au bleu alcian à pH 2,5 au niveau de la couche externe de la zone pellucide, située contre les cellules de la granulosa des follicules vitellogéniques. Dans les ovocytes en prévitellogenèse, des

granules corticaux ont été mis en évidence par l'APS et le bleu alcian à pH 2,5. Les plaquettes vitellines sont APS positives et colorées intensément par l'orangé G molybdique et le rouge nucléaire mais pas par le bleu alcian, ce qui indique qu'elles sont constituées, au moins partiellement, de glycoprotéines neutres. La détection des protéoglycannes sulfatés par le bleu alcian à pH 0,5 n'a par contre donné aucun résultat.

INTRODUCTION

Les Gymnophiones également connus sous le nom d'apodes ou de cécilies, constituent le troisième ordre de la classe des Amphibiens conjointement aux Anoures et aux Urodèles. Ces Amphibiens à

l'allure serpentiforme, au mode de vie fouisseur font aujourd'hui l'objet d'un intérêt en lien avec la conservation de la biodiversité [1]. Plusieurs classifications de ces animaux ont été établies [2]. *Boulengerula boulengeri* est une espèce atteignant 300 mm de longueur à l'âge adulte, endémique aux montagnes de l'est Usambara en Tanzanie [3]. Elle vit principalement à environ 300 mm sous le sol où elle est protégée de la chaleur et des prédateurs [4] et remonte en surface pendant les périodes pluvieuses. Son mode de reproduction est celui d'une espèce ovipare [5] mais avec développement direct caractérisé par l'absence de stade larvaire. A l'éclosion, il y a ainsi naissance d'un animal juvénile déjà formé. Chez les Amphibiens et notamment les Gymnophiones, l'ovogenèse est un processus caractérisé par la multiplication par mitose des ovogonies dans le nid germinatif [6]. Le stock du nid germinatif est renouvelé chez l'Amphibien adulte [6-8]. Comme chez les Anoures et les Urodèles, la folliculogénèse des Gymnophiones débute quand les ovogonies se différencient en ovocytes primaires. Ces ovocytes restent bloqués au stade diplotène de la prophase I [7]. Au cours de ce stade, les chromosomes sont très actifs, les chromatines sont décondensées et l'ovocyte accumule des réserves vitellines [6]. La plupart de ces ovocytes sont nus, d'autres sont entourés d'une fine couche de cellules folliculaires, issues du tissu conjonctif de l'ovaire, ce qui constitue l'ébauche de la granulosa [8,9]. Après la description de l'ovaire de *Boulengerula boulengeri* [10], le présent travail est consacré à l'identification de la nature histochimique des tissus ovariens

de cette même espèce. La détection des polysaccharides et des protéoglycannes, molécules qui interviennent pour une grande part dans la constitution des réserves, des structures protectrices des ovocytes et qui sont aussi les récepteurs des molécules de surface des spermatozoïdes à la fécondation, a été réalisée. Pour cela, la réaction de l'acide périodique-Schiff (APS) et la coloration au bleu alcian à pH=2,5 ou pH=0,5 ont été mises en œuvre. L'examen de coupes colorées à l'azan modifié a permis de compléter la détection de la nature chimique des éléments ovariens.

MATERIELS ET METHODES

Matériel biologique

Vingt-six femelles *Boulengerula boulengeri* (Figure 1A) ont été capturées lors de campagnes mensuelles de décembre 2002 à novembre 2003, dans les forêts de la réserve Kwomkoro à l'Est de la Tanzanie. Les prélèvements biologiques, sur des animaux anesthésiés par le tricaine méthane-sulfonate (MS 222), ont été effectués dans les 4 heures suivant la capture, puis fixés dans le formol à 10% et conservés dans l'éthanol à 70°. Les ovaires des femelles ont été inclus dans une gélose à 1,3% puis dans la paraffine. Après déshydratation, ils ont été débités longitudinalement au microtome de Minot en coupes de 5 µm qui ont ensuite été collées à l'eau distillée sur des lames «Super Frost plus».

Etude histochimique

Plusieurs lames ont été colorées à l'azan modifié [10] où le rouge nucléaire remplace l'azocarmin G.

Pour la réaction à l'APS, les coupes

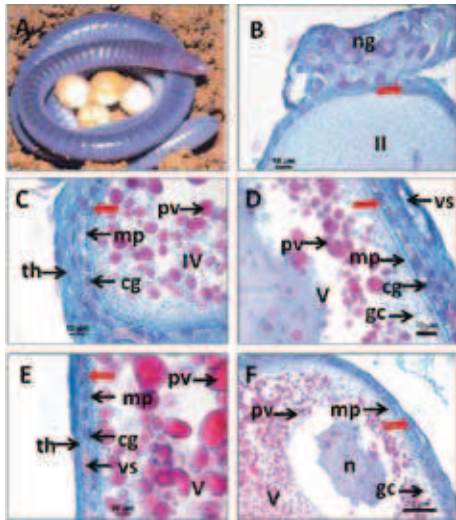


Figure 1 : Observations histochimiques des différents stades folliculaires dans un ovaire de *Bouleengerula boulengeri*. Détections des peptidoglycannes carboxylés. Coloration au bleu alcian pH 2,5 et rouge nucléaire. Échelle = 10 µm.

A : *Bouleengerula boulengeri* femelle après la ponte, enroulée autour de ses embryons en cours de développement (photographie John Measey).

B : stade A, nid germinatif auprès d'un follicule de stade B (prévitellogénique).

C : follicule au stade D1 (vitellogénique).

D : Follicule au stade D2 (vitellogénique)

E : follicule au stade D2.

F : follicule au stade D2 (vitellogénique).

Gc: granules corticaux; cg: cellule de la granulosa; mp: membrane vitelline (ou membrane pellucide); n: noyau; ng: nid germinatif; pv: plaquettes vitellines; th: thèque; vs: vaisseau sanguin; II: ovocyte de follicule au stade B; IV: ovocyte de follicules au stade D1; V: ovocyte de follicule au stade D2. Les flèches rouges indiquent les marquages par le bleu alcian.

d'ovaires déparaffinées et hydratées ont été immergées dans de l'acide périodique à 1 % pendant 10 min, puis rincées à l'eau courante pendant 10 min et à l'eau distillée. Ensuite elles ont été placées dans le réactif de Schiff pendant 10 min, rincées à

l'eau courante pendant 5 min puis contre-colorées 5 min à l'hématoxyline de Groat. Enfin, elles ont été rincées à l'eau courante pendant 5 min. Les glucides apparaissent colorés en rouge fuchsia.

Une coloration histochimique au bleu alcian à pH 2,5 a été réalisée, afin de mettre en évidence les protéoglycannes carboxylés (R-COOH), une coloration au bleu alcian à pH 0,5 a également été réalisée pour mettre en évidence les protéoglycannes sulfatés (R-OSO₃H). Dans les deux cas, les molécules d'intérêt apparaissent colorées en bleu intense. Pour cela, les coupes d'ovaires déparaffinées et hydratées ont été immergées dans le bleu alcian pendant 20 min, puis rincées à l'eau et disposées pendant 5 min dans le rouge nucléaire. Elles ont ensuite été rincées à l'eau courante pendant 5 min.

Les lames colorées ont ensuite été déshydratées dans l'éthanol à 96° pendant 5 min, puis dans l'éthanol à 100° pendant 7 min, dans le butanol pendant 5 min et dans le cyclohexane pendant 10 min. Le montage des coupes a été réalisé en fixant une lamelle (Menzel Glaser) sur la coupe par une goutte de résine (Eukitt) en évitant les bulles d'air. Une fois montées, les coupes ont été observées au microscope photonique aux grossissements 40, 100, 400 et 1000.

RESULTATS

Observations macroscopiques

Les ovaires de Gymnophione *Bouleengerula boulengeri* sont pairs et allongés, parallèles aux oviductes, aux reins et au tube digestif. Ils sont liés aux corps adipeux allongés et segmentés. Les follicules ovariens aux divers stades apparaissent à la

surface des ovaires, formant des boursouffures en forme de perles visibles à l'œil nu ou au stéréomicroscope à faible grossissement.

Etudes histologiques et histochimiques

La structure histologique des ovaires, l'ovogenèse et la folliculogenèse ont été précédemment décrites [10]. L'évolution des follicules a été divisée en plusieurs stades déterminés selon la classification proposée par EXBRAYAT [9]. Dans cette classification, le stade A correspond aux nids germinatifs et les stades B et C aux follicules prévitellogéniques. Pour le besoin de notre étude, le stade D, correspondant aux follicules vitellogéniques, a été divisé en D1 et D2. Le stade E correspond aux follicules atrétiques et le stade F aux corps jaunes. Les résultats des colorations histochimiques à l'APS, au bleu alcian aux pH=2,5 et 0,5 ont été analysés afin de déterminer la présence ou non de polysaccharides simples et les peptidoglycannes carboxylés ou sulfatés dans les follicules ovariens. La présence de structures colorées par l'orangé G molybdique a permis de préciser la nature protéique de certaines substances.

Nids germinatifs (stade A)

Les nids germinatifs sont situés à la périphérie des ovaires, contre les follicules à différents stades d'évolution. Ils comportent des ovogonies en division et des ovocytes primaires. Les cellules germinales sont noyées dans le tissu conjonctif. L'observation montre la présence de quelques polysaccharides APS légèrement positifs et de peptidoglycannes carboxylés faible-

ment marqués, situés dans le tissu conjonctif autour des jeunes follicules (Figures 1B et 2A). La coloration au bleu alcian à pH 0,5 n'a donné aucun résultat.

Follicules en prévitellogénèse

Stade B. (Figures 1B et 2B). Ce sont les premiers follicules observés. Leur forme est irrégulière. Ils contiennent un ovocyte primaire au gros noyau central ou avec une vésicule germinative contenant plusieurs nucléoles acidophiles. Ces ovocytes sont entourés d'une simple couche de cellules folliculaires aplaties plus ou moins jointives. Au stade B, les polysaccharides simples et les peptidoglycannes carboxylés n'ont pas été détectés parmi les réserves de l'ovocyte. On en retrouve par contre au niveau de la thèque conjonctive externe. La coloration au bleu alcian à pH 0,5 n'a donné aucun résultat.

Stade C. (Figure 2C). Ce stade est caractérisé par l'épaississement des couches folliculaires dont les cellules de la granulosa deviennent plus jointives. Une membrane vitelline, correspondant à la zone pellucide des mammifères, non encore colorable par la réaction à l'APS et la coloration au bleu alcian à pH 2,5 ou pH 0,5 est mise en place.

Follicules en vitellogénèse

Stades D1 et D2. Les follicules des stades D1 et D2 diffèrent par des caractéristiques morphologiques mais non histochimiques. Au stade D1, l'ovocyte est volumineux, son cytoplasme est rempli de nombreuses plaquettes vitellines de différentes tailles, APS positives, colorées par le rouge nucléaire ou par l'orangé G molybdique mais pas par le bleu alcian quel que soit le pH,

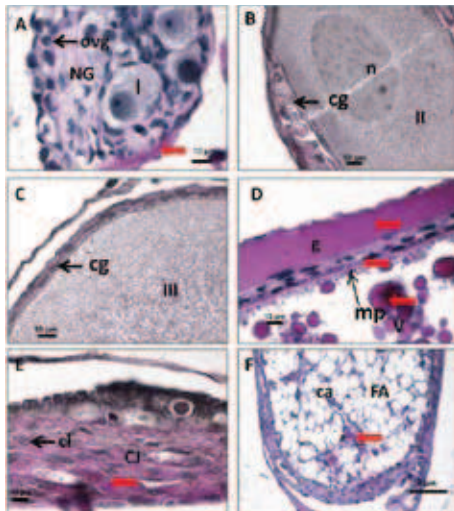


Figure 2: Observations histochimiques des différents stades folliculaires dans un ovaire de *Bouleengerula bouleengeri*. Détection des polysaccharides simples. Coloration APS et hématoxyline.

Echelle = 10 μ m.

A : stade A, nid germinatif contenant des ovogonies et des ovocytes primaires.

B : follicule au stade B.

C : follicule au stade C.

D : follicule au stade D2 (vitellogénique) avec une vésicule germinative excentrée.

E : corps jaune.

F : follicule atrétique.

ca: cellules adipocytaires; cg: cellule de la granulosa; CJ: corps jaune; cl: cellule lutéale; FA: follicule atrétique; g: structure périphérique en forme de gangue; mp: membrane vitelline (ou membrane pellucide); n: noyau; NG: nid germinatif; ovg: ovogonies; pn: polynucléaire; I: ovocyte primaire; II: ovocyte de follicule au stade B; III: ovocyte de follicule au stade C; V: ovocyte de follicule au stade D2. Les flèches rouges indiquent les marquages APS positifs.

ce qui montre qu'ils sont composés de glucides neutres et de protéines. Des granules corticaux sont APS positifs et colorés par le bleu alcian à pH 2,5, ce qui indique leur nature glucidique carboxylée. La membra-

ne vitelline constituée de trois couches est APS positive et colorée par le bleu alcian à pH 2,5 (Figure 1C).

Au stade D2, les follicules sont mûrs et volumineux, le noyau de l'ovocyte est particulièrement excentré. Les plaquettes vitellines qui envahissent le cytoplasme présentent les mêmes caractéristiques tinctoriales qu'au stade D1. Les cellules de la granulosa sont maintenant disposées sur trois couches (Figures 1D, 1E, 1F, 2D) et séparées de la membrane plasmique de l'ovocyte par une membrane vitelline, APS positive (Figure 2D), composée de trois couches concentriques et colorable par le bleu alcian à pH 2,5 (figures 1D, 1E, 1F) mais pas à pH 0,5. Certains follicules sont entourés par une épaisse couche APS positive à l'aspect de gangue, délimitée extérieurement par une séreuse aplatie qui représente vraisemblablement un artéfact dû à la fixation.

Follicules atrétiques (stade E)

Ce sont les follicules issus de la dégénérescence des ovocytes non ovulés. Ils sont caractérisés par la prolifération des cellules folliculaires vers le centre et la présence de cellules d'aspect phagocytaire ou adipocyttaire (Figure 2F). Des îlots APS positifs situés près de cellules sanguines telles que des polynucléaires pourraient correspondre à des produits de dégradation.

Corps jaunes (stade F)

Ce sont les follicules dont l'ovocyte a été expulsé à l'ovulation. Ils sont caractérisés par la réduction progressive de leur taille, la prolifération des cellules de la granulosa et l'apparition de cellules lutéales APS positives (Figure 2E).

CONCLUSION

Boulengerula boulengeri est une espèce de Gymnophione encore très peu connue et constitue un matériel biologique rare. La biologie de sa reproduction n'a jusqu'à présent fait l'objet d'aucun travail spécifique publié. En particulier, même si une description de la structure histologique des ovaires avait été donnée dans un précédent travail [10], les caractéristiques histochimiques de l'ovaire sont ici décrites pour la première fois. Ces caractéristiques rappellent les résultats obtenus chez d'autres Gymnophiones, chez *Boulengerula taitanus*, une espèce proche de *B. boulengeri*, vivant au Kenya [11,12] mais aussi chez d'autres espèces provenant d'Asie ou d'Amérique du Sud [8,9]. La structure de l'ovaire des Gymnophiones représente ainsi une constante. Chez toutes les espèces étudiées, l'ovocyte se développe dans plusieurs nids germinaux qui, sur chaque ovaire à la forme allongé, sont disposés de manière segmentée rappelant la métamérie ancestrale également réminiscente dans d'autres organes (testicules chez les mâles, corps adipeux associés aux gonades des deux sexes [13,14], foie [15] et, de manière plus discrète, structure des reins [16-18]). Le tissu conjonctif de ces nids germinatifs contient des polysaccharides et des protéoglycannes. Chez plusieurs espèces, il possède également une fonction stéroïdogène mise en évidence par la détection de la $\Delta 5$ 3β hydroxystéroïde déshydrogénase [19] ou encore par la mise en évidence de 17β œstradiol par immunohistochimie [8,9]. Lorsque les ovogonies se multiplient, les ovocytes primaires qui en résultent augmentent de taille. Le follicule se constitue

alors par migration des cellules conjonctives dont la mise en place a été décrite chez *Typhlonectes compressicauda* [20, 21]. L'ovocyte primaire va augmenter de volume, son cytoplasme se chargera de substances de nature essentiellement acide lui conférant une sensibilité aux colorants basiques. Le follicule finira par atteindre un stade où les couches entourant l'ovocyte seront complexes. Une membrane vitelline d'abord peu chargée en substances de nature glucidique, va s'épaissir puis s'organiser en trois couches reconnaissables par leur texture. La plus externe de ces trois couches, celle qui sera impliquée au démarrage de la fécondation, sera APS positive et colorable par le bleu alcian à pH 2,5, c'est-à-dire que sera révélée sa nature glycoprotéique acide carboxylée. Le tissu conjonctif sous-jacent comportera toujours des substances APS positives et colorables par le bleu alcian à pH 2,5. Les cellules de la granulosa, d'abord aplaties, puis devenant cubiques finiront par être disposées sur trois rangs autour de l'ovocyte, lors de la maturation. Divers travaux portant sur de nombreuses espèces ont pu montrer la présence d'activité stéroïdogène (voir par exemple [19]) ou d'œstrogènes révélés par immunohistochimie [22]. La thèque conjonctive, contenant également des substances APS positives et colorables par le bleu alcian à pH 2,5 deviendra également plus abondante. A la vitellogenèse, le cytoplasme de l'ovocyte se chargera de plaquettes vitellines composées entre autres de glucides neutres révélés par leur réaction positive à l'APS mais jamais colorées par le bleu alcian, et de protéines révélées par la coloration à l'orangé G mo-

lybrique de l'azane ou encore par le rouge nucléaire qui leur confère une coloration particulièrement intense. A la vitellogénèse, des granules corticaux, dont la nature polysaccharidique acide en lien avec leur origine golgienne, sont mis en place, juste au-dessous de la membrane plasmique. Ces granules, connus pour contenir des glycoprotéines, des glycosaminoglycannes et diverses enzymes sont des lysosomes qui auront une activité au moment de la fécondation. La structure globale et les caractéristiques histochimiques de l'ovaire rappellent ainsi celles des autres espèces de Gymnophiones étudiées [9]. La présence de follicules atrétiques tels que ceux qui ont été observés chez *B. boulengeri* représente également une constante chez l'ensemble des Amphibiens. Chez ces espèces dont l'ovogénèse est continue, les follicules arrivés à maturité en dehors des périodes de reproduction dégénèrent *in situ* et donnent lieu à la formation de follicules atrétiques. Chez certaines espèces telles que *Typhlonectes compressicauda* [19], d'autres types de follicules atrétiques peuvent être observés. Ils concernent de jeunes ovocytes qui dégénèrent au cours de leur croissance et qui n'atteindront donc jamais leur maturité. Ces follicules atrétiques sont caractérisés par des cellules qui ont l'aspect d'adipocytes, ce qui est certainement lié à la dégénérescence des contenus cellulaires. Ils comportent aussi des cellules d'origine sanguine telles que des macrophages et des polynucléaires. Ces cellules participent à la régression de l'ovocyte, notamment la dégradation des plaquettes vitellines, rappelant ce qui a été observé chez d'autres espèces de Gymnophiones

[8,9,12]. Enfin des corps jaunes ont été observés chez *Boulengerula boulengeri*. Ces structures sont issues de la modification du follicule après l'expulsion de l'ovocyte au moment de l'ovulation. En effet, la fécondation de cette espèce, comme de toutes les espèces connues de Gymnophiones, est interne et se déroule dans l'oviducte antérieur, ce qui a été démontré notamment chez *Typhlonectes compressicauda* [23]. Ces corps jaunes persistent jusqu'à ce que les œufs soient expulsés chez les espèces ovipares et à développement direct, ou après la naissance des jeunes Gymnophiones chez les espèces vivipares. Les cellules constituant les corps jaunes sont remplies de substances APS positives chez *Boulengerula boulengeri*, ce qui n'est pas une règle générale [9]. Ces structures persistent chez les espèces vivipares pendant toute la durée du développement *in utero* de l'embryon [8,9], puis elles dégénèrent et prennent l'aspect d'une cicatrice conjonctive à la surface de l'ovaire.

L'examen des caractéristiques histochimiques de l'ovaire de *Boulengerula boulengeri* apporte un élément complémentaire à la connaissance des Gymnophiones qui représente un groupe encore peu connu, certainement fragile devant les modifications de biotope et qui mérite plus que jamais d'être étudié, ce qui est si bien exprimé par Marvalee Wake (2006) : *I hope that we are not engaging in examination of the biology and evolution of caecilians too late – it will be a tragedy to simply document their decline, as we try to understand their essence.*[1]

BIBLIOGRAPHIE

1. WAKE M.H. : A brief history of research on Gymnophionan reproductive biology and development. Pp. 1-37. In J.-M. Exbrayat, (ed), Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona (Caecilians), Vol. 5 of series edited by B.G.M. Jamieson, Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth, 2006.
2. WILKINSON M., NUSSBAUM, R. A. : Caecilian phylogeny and classification. Pp. 39-78. In J.-M. Exbrayat, (ed), Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona (Caecilians), Vol. 5 of series edited by B.G.M. Jamieson, Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth, 2006.
3. GOWER, D. J; LOADER, S. P; MONCRIEFF, C. B et WILKINSON, M. : Niche separation and comparative abundance of *Boulengerula boulengeri* and *Scolecophorus vittatus* (Amphibia: Gymnophiona) in an East Usambara forest, Tanzania. African Journal of Herpetology. 2004, 53 (2): 183-190.
4. MEASEY G.J., BAROT S. : Evidence of seasonal migration in a tropical subterranean vertebrate. J. Zool., 2006, 269: 29-37.
5. EXBRAYAT, J.-M. : Modes of parity and oviposition. Pp. 303-323. In J.-M. Exbrayat, (ed), Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona (Caecilians), Vol. 5 of series edited by B.G.M. Jamieson, Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth, 2006.
6. KO, C. : Etude des récepteurs des œstrogènes et des androgènes chez l'amphibien *Pleurodeles walt*, Thèse de Doctorat d'Université Henri Poincaré Nancy 1. 2008. 449 p.
7. BEYO, R.S., SREEJITH, P., DIVYA, L., OOMMEN, O.V. et AKBARSHA, M.A. : Assembly of ovarian follicles in the caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii*: light and transmission electron microscopic study. Zygote. 2007, 15: 199- 213.
8. EXBRAYAT, J.-M. : Oogenesis and female reproductive system in Amphibia – Gymnophiona. Pp. 305-342. In M. Ogielska (ed), Reproduction of amphibians, Jersey, Plymouth, 2009.
9. EXBRAYAT, J.-M. : Oogenesis and folliculogenesis. Pp. 275-290. In J.-M. Exbrayat, (ed), Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona (Caecilians), Vol. 5 of series edited by B.G.M. Jamieson, Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth, 2006.

10. SERCLERAT, H., MEASEY, J., EXBRAYAT, J.-M., CHEVALIER, C.: Etude histologique des ovaires d'un Amphibien gymnophione *Boulengerula boulengeri* pendant la période de reproduction. Rev. Fr. histotechnol, 2011. 24 (1)39-45.
11. RAQUET, M. Modalités de la reproduction chez les femelles de *Boulengerula taitanus*, Amphibien Gymnophione. Dipl. EPHE, Lyon. 2008. 129 p.
12. RAQUET, M., MEASEY, J., EXBRAYAT, J.-M.: Premières observations histologiques de l'ovaire de *Boulengerula taitanus* Loveridge 1935, Amphibien Gymnophione. Rev fr. histotechnol. 2006, 19: 9-15.
13. WAKE, M.H.: Evolutionary morphology of the Caecilian urogenital system. Part I: the gonads and fat bodies. J. Morph. 1968, 126: 291-332.
14. EXBRAYAT, J.-M., ESTABEL, J.: Anatomy with particular reference to the reproductive system. Pp 79-155. In J.-M. Exbrayat, (ed), Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona (Caecilians), Vol. 5 of series edited by B.G.M. Jamieson, Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth, 2006.
15. DELSOL, M., EXBRAYAT, J.-M., FLATIN, J., LESCURE, J. Particularités du groupe des Batraciens Apodes. Bull. mens. Soc. Linn. Lyon., 1980, 49 (6): 370-379.
16. WAKE, M.H.: Evolutionary morphology of the Caecilian urogenital system. Part II: the kidneys and urogenital ducts. Acta anatomica. 1970, 126: 321-358.
17. SAKAI, T., BILLO, K., KRIZ; W.: The structural organization of the kidney of *Typhlonectes compressicauda* (Amphibia, Gymnophiona). Anat. Embryol. 1986, 174: 243-252.
18. CARVALHO, E.T.C., JUNQUEIRA, L.C.U.: Histology of the kidney and urinary bladder of *Siphonops annulatus* (Amphibia, Gymnophiona). Arch. Histol. Cytol. 1999, 62: 39-45.
19. EXBRAYAT, J.-M., COLLENOT, G.: Quelques aspects de l'évolution de l'ovaire de *Typhlonectes compressicauda* (Duméril et Bibron, 1841), Batracien Apode vivipare. Etude quantitative et histochimique des corps jaunes. Repr. Nutr. Dev. 1983, 23: 889-898.

20. ANJUBAULT, E., EXBRAYAT, J.-M.: Contribution à la connaissance de l'appareil génital de *Typhlonectes compressicauda* (Duméril et Bibron, 1841), Amphibien Gymnophione. I. Gonadogenèse. Bull. Mens. Soc. Linn. Lyon. 2004, 73 : 379-392.
21. ANJUBAULT, E., EXBRAYAT, J.-M. : Development of gonads. Pp.291-302. In J.-M. Exbrayat, (ed), Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona (Caecilians), Vol. 5 of series edited by B.G.M. Jamieson, Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth, 2006.
22. EXBRAYAT, J.-M.: Reproduction et organes endocrines chez les femelles d'un Amphibien Gymnophione vivipare, *Typhlonectes compressicauda compressicaudus*, Bull. Soc. Herp. Fr. 1992, 64 : 37-50.
23. EXBRAYAT, J.-M. : Fertilization and embryonic development. Pp. 359-386. In J.-M. Exbrayat, (ed), Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona (Caecilians), Vol. 5 of series edited by B.G.M. Jamieson, Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth, 2006.