

**APPORTS DE LA SQUELETTROCHRONOLOGIE
DANS LA DEMOGRAPHIE
DU CRAPAUD COMMUN,
BUFO BUFO (L.) (ANURA, BUFONIDAE)
DANS L'OUEST DE LA FRANCE**

Thierry FRETEY¹, Bernard LE GARFF¹

RESUME

Des coupes de phalange et de fémur d'un même animal présentent le même nombre de Lignes d'Arrêt de Croissance. Des phalanges prélevées sur un même animal, deux années consécutives, montrent une LAC supplémentaire la deuxième année. La résorption endostéale est plus importante chez les femelles que chez les mâles et variable selon les individus. Les plus jeunes reproducteurs ont 3 ans pour les mâles et 4 ans pour les femelles. L'âge maximum observé est de 9 ans pour les deux sexes. Les individus les plus vieux ne sont pas toujours les plus grands.

**CONTRIBUTION OF SKELETOCHRONOLOGY TO THE
DEMOGRAPHY OF THE COMMON TOAD, *BUFO BUFO* (L.)
(ANURA, BUFONIDAE)**

ABSTRACT

This study is based on a long-term study, started five years ago, of reproductive individuals of a population at its spawning site, in the forest of Rennes (Ille & Vilaine). Skeletochronology is at the present time the only credible method for age determination in Amphibians. This technique, in conjunction with this long-term study, has enabled us to characterize the population. - Cross-sections of phalange and femur of a given animal present the same number of visible resting-lines, therefore the generalized study of phalanges is totally reliable, without killing animals. - Phalanges from the same animal, taken in two consecutive years, show one extra resting line, which allows the use of skeletochronology as an absolute age indicator in the common toad. - The endosteal resorption is greater in females than in males ; moreover, it is variable according to individuals.

¹ Laboratoire d'Entomologie Fondamentale et Appliquée, Université de Rennes I, Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes Cedex.

- The youngest reproductive individuals collected in the field were three years old for males and four years old for females. - According to recaptures and skeletochronology, the maximum age observed was nine years, for males as well as for females. Concerning corporal growth, it proves that the oldest individuals are not always the biggest ones.

INTRODUCTION

La squeletteochronologie (Castanet *et al.*, 1977) est basée sur le dénombrement des marques histologiques enregistrées dans les tissus squelettiques en croissance. Dans l'os, l'action du périoste (couche la plus externe) entraîne une augmentation du diamètre de la diaphyse par apposition de tissu osseux nouveau. Ce mode de dépôt est qualifié de centrifuge (Francillon-Vieillot, 1987). Le dépôt de lignes d'arrêt de croissance (LAC) est fonctionnellement associé à la période d'activité réduite des animaux (Castanet, 1985). Le déterminisme de ces LAC est endogène (génétique), mais pour des animaux vivants dans des conditions naturelles, ce rythme endogène apparaît synchronisé avec le rythme des saisons et amplifié par celui-ci (Castanet *et al.*, 1977 ; Castanet, 1982). Cependant, la distinction des LAC n'est pas toujours en rapport avec la sévérité de l'hiver (Hemelaar, 1986).

Dans certains cas, on observe une érosion à la surface de la cavité médullaire, dite résorption endostéale. Elle attaque la couche d'os périostique la plus ancienne, réduisant ainsi l'épaisseur de la diaphyse. Lorsque la résorption s'arrête, un processus de dépôt endostéal peut se produire (croissance centripète), séparé de la couche périostique par une ligne chromophile appelée ligne de résorption. Cette ligne, souvent très sinueuse, témoigne donc d'une érosion qui a entamé les couches concentriques parallèles de l'os périostique (Francillon-Vieillot, 1987). Le dépôt endostéal secondaire enregistre lui aussi les LAC.

Chez les Amphibiens, la squeletteochronologie constitue actuellement une des seules méthodes crédibles de détermination de l'âge (Barbault *et al.*, 1979; Halliday et Verrel, 1988). En effet, l'âge des adultes ne peut pas être estimé à partir de la taille du corps. Bien que cette dernière augmente avec l'âge, on observe un très fort recouvrement entre les tailles chez des animaux de classes d'âge successives. De nombreux travaux ont utilisé cette technique, notamment chez le Crapaud commun. Ainsi Hemelaar (1986) a réalisé une étude sur des populations des Pays-Bas et effectué quelques comparaisons avec des populations de Norvège, d'Allemagne, de Suisse et du Sud de la France.

Cependant la démographie d'une population n'est pas obligatoirement semblable à celle d'une autre. C'est pourquoi, il nous a paru utile de reprendre des travaux sur la démographie de *Bufo bufo* dans l'Ouest de la France.

La présente étude s'appuie sur un suivi par marquage-recapture, de 1986 à 1990, de 2408 individus reproducteurs d'une population sur son lieu de ponte, un étang d'un hectare et demi, en forêt de Rennes (Ille et Vilaine).

Solitaires toute l'année, les Crapauds se rassemblent en grand nombre pour la reproduction dans les fossés inondés, les mares et les bords d'étangs (Frétey, 1975; Le Garff, 1989). Dans la région rennaise, la ponte, qui s'étale sur environ deux semaines, a lieu à la faveur d'un radoucissement de la température, de février à mars, selon la rigueur de l'hiver. La température de l'eau est d'environ 9°C et la température extérieure voisine de 10°C. Ces données concordent avec celles observées par

Guyétant (1975). La biométrie et la squelettochronologie, menées conjointement, ont permis de préciser la structure d'âge de la population, la maturité sexuelle, la longévité et quelques idées un peu plus générales sur la croissance.

MATERIEL ET TECHNIQUES

RECOLTE DU MATERIEL

Les captures sont réalisées la nuit, à l'aide d'une épuisette, pendant les périodes d'activité des crapauds.

Les animaux capturés sont mesurés du bout du museau au cloaque à l'aide d'une règle graduée. Lors du marquage par amputation de doigts, ceux-ci sont prélevés en vue d'une étude squelettochronologique. Les animaux sont ensuite relâchés sur place.

PRELEVEMENTS

Pour réaliser l'étude squelettochronologique et comparer des individus, il est nécessaire d'effectuer des coupes dans des os homologues. Par commodité, le plus gros doigt, c'est-à-dire le quatrième du membre postérieur a été choisi. Ce doigt possède quatre phalanges dont les trois dernières se dégagent de la palmure. Il est donc aisé de récupérer ces trois phalanges lors du marquage par amputation. Les coupes histologiques sont effectuées au niveau de la phalange 2, la plus favorable, car les deux phalanges les plus distales présentent une croissance un peu particulière et une forte résorption osseuse peu propice à l'analyse (Castanet com. pers.). Par ailleurs, des fémurs ont été prélevés sur quelques individus trouvés morts sur la route près de l'étang, dans le but de comparer leur structure à celle des phalanges des mêmes animaux.

TRAITEMENT

Les échantillons (phalanges et fémurs) sont gardés dans l'alcool à 70°, avant d'être décharnés et déminéralisés à l'acide nitrique pendant 12 heures (acide nitrique à 3 % pour les phalanges, 5 % pour les fémurs). Les échantillons sont ensuite rincés à l'eau courante pendant environ 24 heures, avant d'être conservés dans l'alcool à 70°.

- Les coupes d'une épaisseur de 20 mm sont réalisées dans la partie diaphysaire de l'os, à l'aide d'un microtome à congélation, à une température voisine de -15°C. Elles sont ensuite colorées à l'Hématoxyline d'Ehrlich pendant 35 minutes, puis rincées à l'eau pendant 30 minutes au moins et enfin montées entre lame et lamelle à l'Aquamount,
- Sur photographies agrandies à la même échelle, la longueur des lignes d'arrêt de croissance (LAC) est mesurée avec un curvimètre.

INTERPRETATION

L'estimation de l'âge de chaque animal ne peut pas se faire directement par simple comptage des LAC visibles, du fait de la résorption plus ou moins importante selon les individus. Par comparaison de coupes d'individus différents, en tenant compte des

mensurations de la ligne de résorption et de celles des LAC visibles, il est possible de déduire le nombre de LAC résorbées dans chaque cas. Ainsi par simple addition il est possible, pour l'immense majorité des animaux, de savoir leur âge précis. Dans le cas présent, les phalanges étant prélevées pendant la période de reproduction, juste après l'hibernation, les animaux n'ont pas eu le temps de grandir. La périphérie de l'os sera donc considérée comme la LAC enregistrée au cours du dernier hiver.

RESULTATS

Des coupes histologiques effectuées sur une centaine d'animaux nous ont permis d'obtenir les résultats suivants :

Homologie de structure entre fémurs et phalanges

Les coupes réalisées sur une phalange et un fémur d'un même animal (Pl I, Photo. 1 et 2) ne montrent pas de différences dans le nombre de LAC visibles. Cette concordance est très précieuse puisqu'elle permet d'étudier un grand nombre d'individus et donc de suivre la population en ne prélevant que des phalanges.

Dépôts annuels de LAC concentriques

Des coupes réalisées sur des phalanges d'un même animal deux années consécutives ont montré la mise en place d'une LAC supplémentaire (Pl I, Photo. 3 et 4). Ceci confirme donc qu'une LAC se forme chaque année dans cette population de *Bufo bufo* de l'Ouest de la France.

Légende de la Planche I. →

Photo. 1. Coupe transversale d'une phalange de *Bufo bufo* mâle. Quatre lignes d'arrêt de croissance (LAC) sont visibles (flèches). Cet individu a donc 4 ans (même individu que Photo. 2).

Photo. 2. Coupe transversale d'un fémur du même individu que Photo. 1. Quatre LAC sont visibles, comme sur la coupe de phalange.

Photo. 3. Coupe transversale d'une phalange de *Bufo bufo* femelle. Quatre LAC sont visibles. La résorption endostéale (R) a complètement érodé les deux premières et touche la troisième. Cet individu a donc 6 ans (même individu que Photo. 4).

Photo. 4. Coupe transversale d'une phalange de la même femelle que Photo. 3, un an plus tard. Cinq LAC sont visibles et deux sont résorbées. Il y a donc une LAC de plus que l'année précédente chez cet individu qui a maintenant 7 ans.

Photo. 5. Coupe transversale d'une phalange de *Bufo bufo* femelle. Neuf LAC sont visibles, la résorption n'affectant qu'en partie la première. Cet individu a donc 9 ans (maximum observé). On remarque un net resserrement des LAC après la 5^e, ce qui indique la maturité sexuelle puis un ralentissement de la croissance.

Toutes les photos sont à la même échelle.

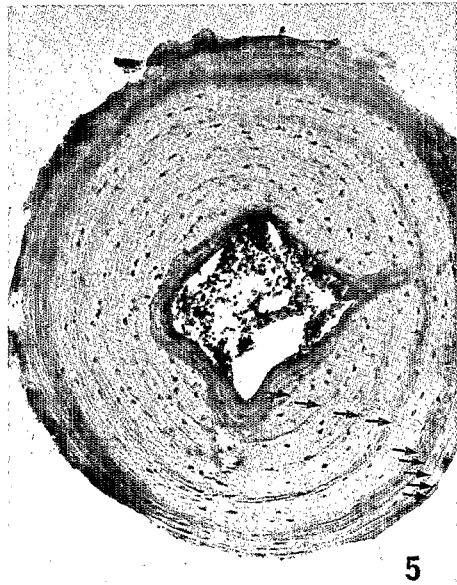
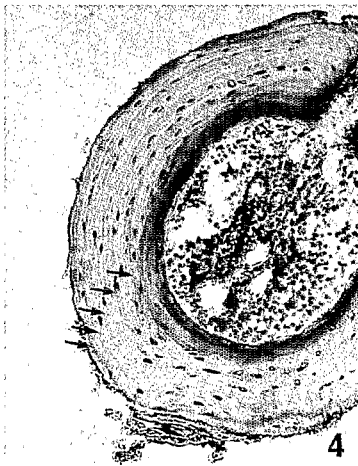
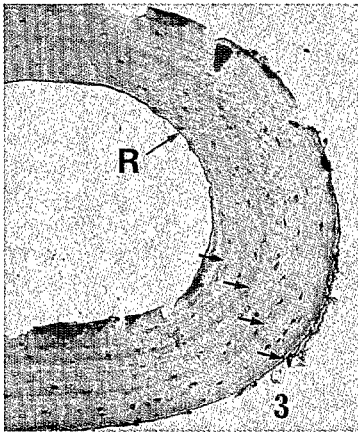
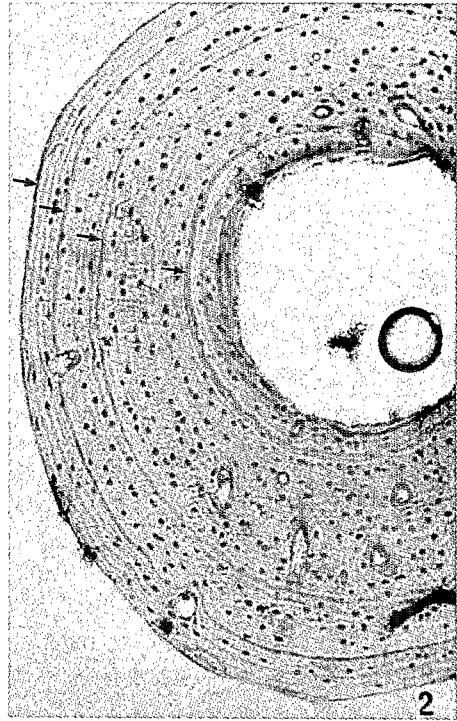
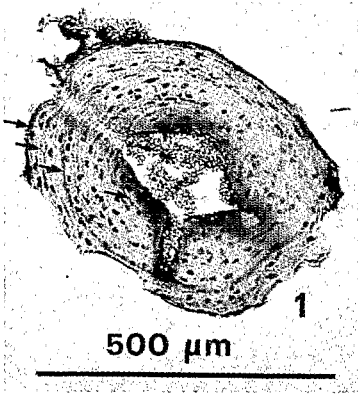


Planche I.

Sur les coupes, on observe des LAC concentriques de plus en plus grandes correspondant aux hivers successifs. La longueur de chaque LAC a été mesurée et a permis de dresser les courbes de croissance (figure 1) en fonction de l'âge pour les mâles et les femelles. Sur ces graphiques, on note un accroissement de taille des LAC, avec cependant un chevauchement des mesures de plus en plus important avec l'âge.

Résorption endostéale

Les premières LAC formées correspondant aux premières années peuvent disparaître par la suite, par résorption de l'os cortical périmédullaire tandis que s'en forment de nouvelles. Cette résorption endostéale a pour conséquence d'agrandir la lumière de l'os et de compliquer la lecture des coupes pour la détermination de l'âge. Cependant, l'examen de nombreuses coupes d'animaux d'âges différents, ainsi que les mensurations moyennes des LAC visibles permettent d'évaluer, dans la plupart des cas, le nombre de LAC ayant disparu. Ce nombre varie d'un individu à l'autre ; Le degré de résorption endostéale est plus important chez les femelles (jusqu'à 3 LAC résorbées) que chez les mâles (jusqu'à 2 LAC). De plus cette résorption n'est pas obligatoirement proportionnelle à l'âge des animaux : ainsi une femelle de 9 ans peut très bien présenter ses 9 LAC (PI I, Photo. 5) tandis qu'un animal de 6 ans peut ne présenter que 4 LAC visibles, les deux premières ayant disparu.

Maturité sexuelle

A la lumière de ce qui précède, il a été possible d'attribuer un âge précis aux plus jeunes individus reproducteurs récoltés : 3 ans pour les mâles et 4 ans pour les femelles (figure 2). Sur des coupes d'individus plus âgés, on constate que les dernières LAC sont de plus en plus rapprochées les unes des autres et contrastent ainsi avec les premières LAC qui sont plus espacées. Cette opposition permet de situer dans le temps l'acquisition de la maturité sexuelle (PI I, Photo. 5). Après cette dernière, la croissance se ralentit, c'est-à-dire après l'âge de 3 à 4 ans chez les mâles (rarement 2) et de 3 à 5 ans chez les femelles (le plus souvent 4).

Croissance et longévité

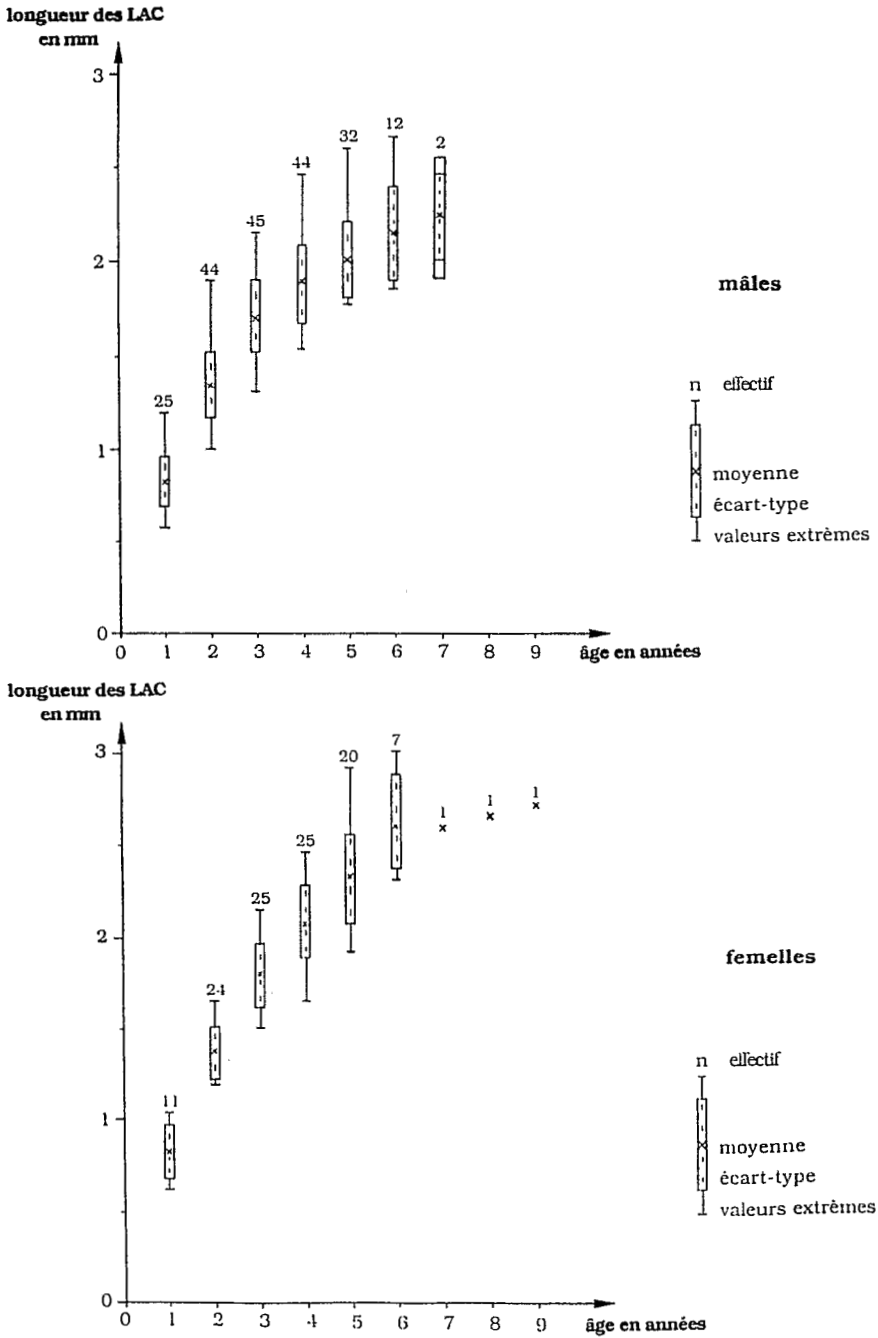
Bien qu'il y ait une certaine relation entre la taille et l'âge des animaux, ces deux critères ne sont pas directement corrélés; ainsi contrairement à une idée généralement répandue, les individus les plus vieux ne sont pas toujours les plus grands et réciproquement, aussi bien pour les mâles que pour les femelles. On peut donc en déduire que chaque individu présente une courbe de croissance qui lui est propre (figure 3).

Grâce aux données cumulées de la squelettochronologie et des recaptures d'animaux marqués, l'âge maximum observé dans la population a été évalué à 9 ans, tant pour les mâles que pour les femelles (figure 2 ; PI I, Photo. 5).

DISCUSSION-CONCLUSION

Homologie de structure entre fémurs et phalanges

La concordance observée entre les coupes de fémurs et de phalanges d'un même individu permet d'utiliser les phalanges, de façon fiable et de suivre la dynamique de la population, sans avoir besoin de sacrifier des animaux.



Un phénomène identique a été mis en évidence chez d'autres Anoures, notamment chez *Rana temporaria* (Guyétant *et al.*, 1984 ; Francillon-Vieillot, 1987). En revanche, chez des Urodèles (*Triturus cristatus*, *T. alpestris* et *T. helveticus*) Miaud (1990) a observé un nombre parfois moindre de LAC dans les phalanges par rapport aux fémurs.

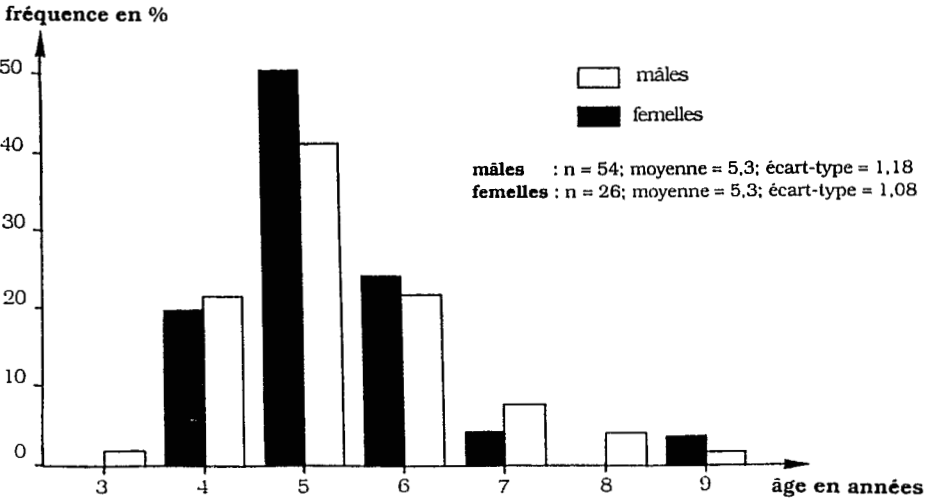


Figure 2. Structure par âge de la population reproductrice de *Bufo bufo* (L.) dans l'Ouest de la France (Forêt de Rennes)

Dépôts annuels de LAC concentriques

La présence d'une nouvelle LAC chaque année, dans notre population, est conforme aux travaux de Hemelaar (1986) réalisés aux Pays-Bas. Il semble donc que ce caractère soit général à l'espèce, et permet d'utiliser les marques de croissance comme indicateur de l'âge.

Résorption endostéale

La résorption endostéale (érosion de l'os cortical péri-médullaire) à l'intérieur des os longs est un facteur important dont il faut tenir compte lors du dénombrement des LAC pour la détermination de l'âge des individus (le problème étant étroitement lié à la reconnaissance de la première LAC). La progression de la résorption endostéale est marquée par la présence d'une ligne de résorption.

Comme l'avait mis en évidence Hemelaar (1986), le degré de résorption endostéale est plus important chez les femelles que chez les mâles d'une même population. Cet auteur et Castanet (1988) vont même plus loin en affirmant que le degré de résorption endostéale est caractéristique de chaque population et peut constituer un critère pour leur identification.

Le nombre de LAC résorbées chez les adultes n'augmente pas avec l'âge, ce qui confirme que la résorption diminue brusquement une fois la maturité sexuelle atteinte (Hemelaar, 1986). Ainsi la maturation différée des femelles irait de pair avec une plus grande résorption endostéale.

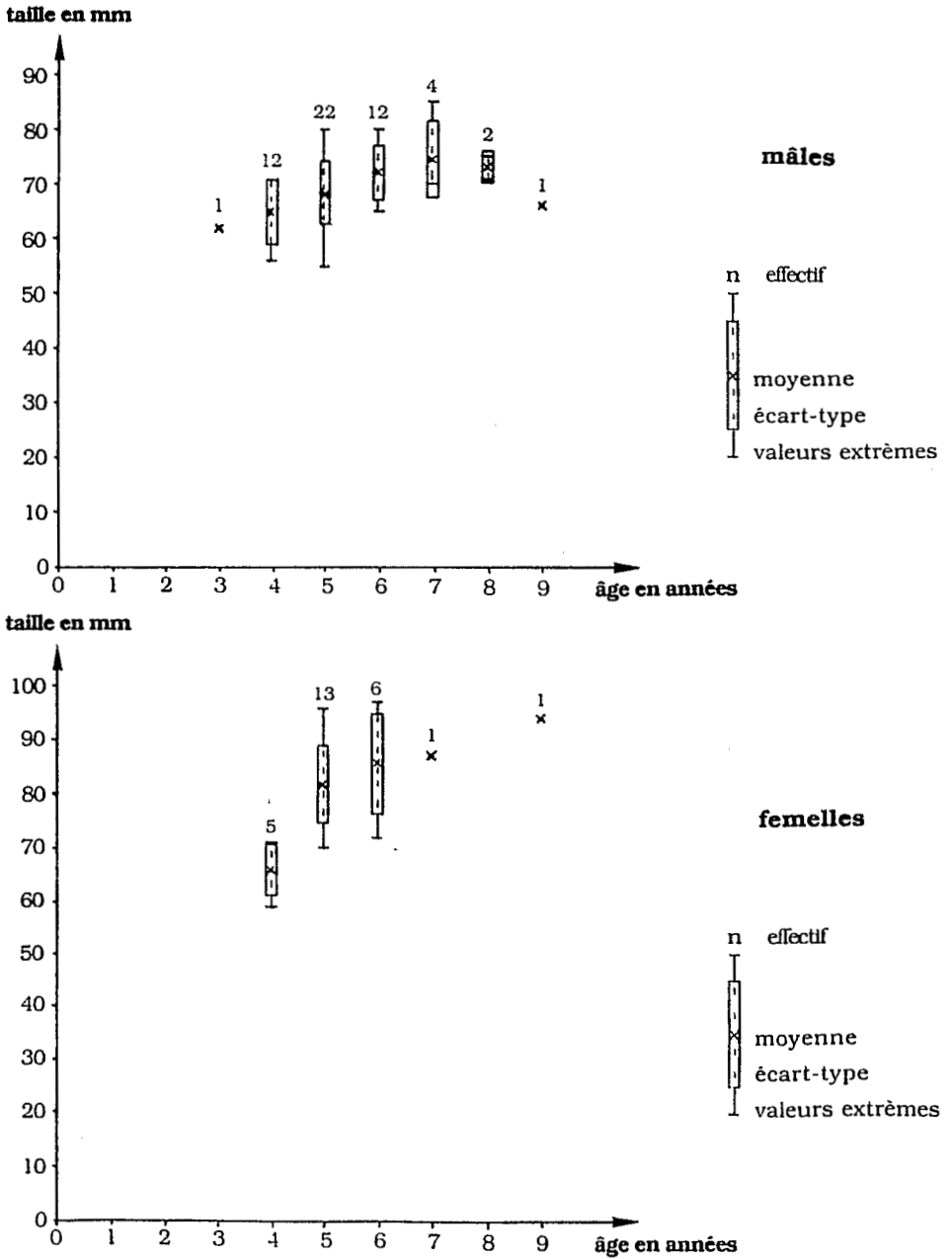


Figure 3. Relation entre l'âge et la taille corporelle des individus reproducteurs de *Bufo bufo* (L.)

Maturité sexuelle

Le ralentissement de croissance après l'acquisition de la maturité sexuelle se traduit par un rapprochement des LAC formées. Par ailleurs, l'âge auquel un crapaud atteint la maturité n'est pas uniquement contrôlé génétiquement. En effet, la taille du corps et donc les ressources disponibles influencent la maturation des gonades. Ainsi, la taille du corps serait un facteur plus important que l'âge dans le déterminisme de la maturité sexuelle (Jorgensen *et al.*, 1979 ; Jorgensen et Billeter, 1982). Hemelaar (1986), pour les Pays-Bas, observe l'acquisition de la maturité sexuelle à des âges situés entre 2 et 4 ans chez les mâles, et entre 3 et 5 ans pour les femelles, selon les individus et les populations. Dans tous les cas, on observe une maturité sexuelle plus précoce chez les mâles que chez les femelles, généralement de l'ordre d'un an. Ceci contribue à déséquilibrer la sex-ratio apparente sur les lieux de reproduction en faveur des mâles. Le déséquilibre est aussi dû au fait que les femelles quittent les lieux de reproduction dès qu'elles ont pondu, tandis que les mâles y séjournent plusieurs jours.

Croissance et longévité

Le constat que les plus vieux individus ne soient pas toujours les plus grands peut s'expliquer par le fait que la croissance diminue brusquement après la maturité sexuelle, et que la taille atteinte par un adulte est corrélée avec la taille à laquelle l'individu est devenu sexuellement mature (Hede et Jorgensen, 1978). Ceci indiquerait qu'après la maturité, lors de cycles annuels, la nourriture servirait à produire de l'énergie surtout utilisée pour la maintenance et pour la préparation de la reproduction suivante. Une croissance nette serait cependant encore observable chez certaines femelles à cycles bisannuels (Jorgensen *et al.*, 1979). Bien que l'âge maximum observé dans notre population soit de 9 ans pour les deux sexes, il n'est pas impossible que des femelles puissent devenir plus vieilles. En effet, les plus vieilles femelles observées en Suisse (à une altitude de 1850 m) et en Norvège (Hemelaar, 1986), atteignaient entre 14 et 18 ans. Il faut souligner que généralement les poikilothermes vivent plus longtemps dans les régions froides que dans les régions chaudes. Ceci probablement une des explications des différences obtenues par cet auteur et les résultats annoncés ici.

REMERCIEMENTS

Nos vifs remerciements vont à Jacques Castanet de l'Université de Paris VII, qui nous a initié à la squelettochronologie, Alain Canard et Frédéric Ysnel de l'Université de Rennes I pour leurs précieux conseils. Nous remercions Mesdames M. Rault, M.R. Allo et Monsieur M. Dedelot pour leur collaboration technique.

REFERENCES

- BARBAULT R., CASTANET J., FRANCILLON H., RICQLES A. DE, 1979. Détermination de l'âge chez un Anoure déserticole *Bufo pentoni* Anderson, 1893. *Terre Vie, Rev. Ecol.*, 33 : 129-141.

- CASTANET J., 1985. La squelettechronologie chez les Reptiles. I. Résultats expérimentaux sur la signification des marques de croissance squelettiques chez les Lézards et les Tortues. *Ann. Sci. Nat., Zool., sér 13, 7* : 23-40.
- CASTANET J., 1988. Nouvelles possibilités offertes par la squelettechronologie dans les recherches sur la biologie des Amphibiens et des Reptiles. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 47 : 1-9.
- CASTANET J., MEUNIER F.J., RICQLES A. DE, 1977. L'enregistrement de la croissance cyclique par le tissu osseux chez les Vertébrés poïkilothermes : données comparatives et essai de synthèse. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 111 : 183-202.
- FRANCILLON-VIEILLOT H., 1987. La croissance des os longs chez les Amphibiens. Son utilisation comme critère d'âge. Thèse, Paris VII : 175 p.
- FRETEY J., 1975. Guide des Reptiles et Batraciens de France. Hatier : 239 p.
- GUYETANT R., 1975. Etude des interactions intraspécifiques chez les têtards de quelques Amphibiens Anoures - Conséquences physiologiques-. Thèse, Besançon : 225 p.
- GUYETANT R., CASTANET J., PINSTON H., 1984. Détermination de l'âge de jeunes grenouilles, *Rana temporaria* L. par l'analyse des marques de croissance de coupes d'os compact. *C. R. Soc. Biol.*, 178 : 271-277.
- HALLIDAY T. R., VERREL P.A., 1988. Body size and age in amphibians and reptiles. *J. Herpetol.*, 22 : 253-265.
- HEDE K.E., JORGENSEN C.B., 1978. Growth and reproduction in a wild toad population. in : Comparative Endocrinology (Gaillard P.J. et Boer H.H.). Elsevier, Amsterdam : 113-116.
- HEMELAAR A.S.M., 1986. Demographic study on *Bufo bufo* L. (Anura, Amphibia) from different climates, by means of squelettechronology. Thèse, Nimègue (Hollande) : 135 p.
- JORGENSEN C.B., BILLETER E., 1982. Growth, Differentiation, and Function of the Testes in the Toad *Bufo bufo* (L.), with Special Reference to Regulatory Capacities : Effects of Unilateral Castration, Hypophysectomy, and Excision of Bidder's Organs. *J. Exp. Zool.*, 221 : 225-236.
- JORGENSEN C.B., LARSEN L.O., LOFTS B., 1979. Annual Cycles of Fat Bodies and Gonads in the Toad *Bufo bufo bufo* (L.), Compared with Cycles in other Temperate Zone Anurans. *K. Dan. Vidensk. Selsk. Biol. Skr.*, 22(5) : 1-37.
- LE GARFF B., 1989. *Bufo bufo*. In : Atlas de répartition des Amphibiens et des Reptiles de France (Castanet J. et Guyetant R.). Société Herpétologique de France : 72-73.
- MIAUD C., 1990. La dynamique des populations subdivisées: étude comparative chez trois Amphibiens Urodèles (*Triturus alpestris*, *T. helveticus* et *T. cristatus*). Thèse, Lyon : 205 p.