

## LA GAMÉTOGÈSE DU MÂLE DE *NECTOPHRYNOÏDES OCCIDENTALIS* ANGEL (AMPHIBIEN ANOURE VIVIPARE)

### I. — ÉTUDE QUANTITATIVE AU COURS DU CYCLE ANNUEL CHEZ L'ADULTE

Jacqueline GAVAUD

Laboratoire de Zoologie,  
École normale supérieure,  
46, rue d'Ulm,  
75230 Paris Cedex 05

### RÉSUMÉ

Pendant les six mois que dure la saison sèche, la population des *N. occidentalis* mène une vie ralentie et l'activité spermatogénétique des mâles est réduite à la seule multiplication des spermatogonies primaires. Dès les premières pluies, les crapauds deviennent actifs et en quatre mois se déroulent la méiose puis la spermiogénèse. En vue d'une étude expérimentale du rôle des facteurs externes sur l'activité testiculaire il a été réalisé une étude quantitative de la gamétogénèse au cours du cycle annuel. L'oculaire intégrateur Zeiss I permet d'évaluer la part du volume du testicule occupée par chaque catégorie de cellules germinales et de préciser ainsi la succession des différentes étapes de la spermatogénèse :

1. La multiplication des spermatogonies primaires commence fin septembre et se termine fin mai ; elles occupent un volume maximal en mars : 32 p. 100 ;
2. La multiplication des spermatogonies II dure d'avril à juin ;
3. La méiose débute en juin ; les spermatoocytes I et II n'occupent jamais plus de 10 à 15 p. 100 du volume du testicule ;
4. La maturation des spermatozoïdes a lieu de mai à août ; groupés sur les cellules de Sertoli ils représentent jusqu'à 60 p. 100 du volume de la gonade ; ils sont évacués de la fin août à la fin octobre.

Le cycle sexuel des mâles de *N. occidentalis* est de type discontinu. La phase de faible activité testiculaire correspond aussi à une faible activité métabolique des individus.

### INTRODUCTION

Le Bufonidé vivipare *Nectophrynoïdes occidentalis* (ANGEL, 1943), dont la taille n'excède pas 22 mm pour les mâles, est seulement localisé dans la « prairie d'altitude » qui couvre la chaîne du Nimba en Guinée, à la limite de la Côte d'Ivoire et du Libéria.

Le climat y est caractérisé par l'alternance stricte d'une saison sèche, impropre à la survie de Batraciens, et d'une saison humide (ANGEL et LAMOTTE, 1944 ; LAMOTTE, 1959).

L'évolution de la structure des testicules et de la spermatogenèse de *N. occidentalis* laissait supposer l'existence de relations entre les variations saisonnières de la pluviosité et l'activité sexuelle (ZUBER-VOGELI et XAVIER, 1965). Pendant toute la saison sèche, de novembre à avril, l'activité spermatogénétique est réduite. Les crapauds sont alors enfouis dans les fissures de la cuirasse ferrugineuse qui couvre la montagne, où le taux d'humidité leur est plus favorable mais où ils ne se nourrissent pas. Au début du mois d'avril, avec les premières pluies, les femelles puis les mâles émergent et mènent une vie active. A partir de cette date se succèdent dans les testicules la multiplication des gonies, puis la spermiogenèse. La reproduction, avec accouplement et fécondation, a lieu de la fin du mois d'août à la fin octobre.

Une étude quantitative de la gamétogenèse a été entreprise afin de préciser les relations cycle saisonnier-cycle sexuel.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel

Cette étude quantitative de la spermatogenèse a été réalisée à partir d'une cinquantaine de *N. occidentalis* mâles arrivant directement du mont Nimba ou ayant passé moins de six mois au laboratoire, dans des conditions aussi proches que possibles de celles de la nature (tabl. 1). Le degré hygrométrique de la salle d'élevage est maintenu à saturation du mois d'avril au mois de novembre ; les animaux sont nourris tous les deux jours de jeunes grillons, de drosophiles et de vers de vase. Pendant la période de vie ralentie, les crapauds s'enfouissent dans des trous pratiqués dans la terre maintenue humide, sous la mousse et les écorces. Le taux d'humidité de la salle d'élevage n'est plus alors que de 35 p. 100 et les animaux ne sont nourris que tous les mois. Un cycle sexuel complet peut être obtenu dans ces conditions : à tout moment l'état des gonades des animaux d'élevage reste comparable à celui des animaux arrivant directement d'Afrique.

### Méthodes

Après avoir été mesurés (longueur du museau à la pointe de l'urostyle) et pesés, les crapauds sont tués au chloroforme et disséqués sous la loupe binoculaire. Avant le prélèvement, les deux dimensions maximales des testicules sont mesurées à l'aide d'un micromètre oculaire.

Un testicule, les deux corps adipeux et le foie sont ensuite pesés aussi rapidement que possible sur une balance électromagnétique Cahn, précise au  $\mu\text{g}$ , puis fixés au Bouin acétique pendant 24 à 48 heures selon leur taille. Les coupes, épaisses de  $5 \mu$ , sont colorées à l'hémalun-éosine et à l'Azan.

### Méthodes biométriques.

Sur les testicules prélevés aux différentes époques de l'année (tabl. 1), on a calculé les surfaces testiculaires assimilées à une ellipse et évalué le volume occupé par les différentes catégories de cellules sexuelles par la méthode des numérations ponctuelles. Cette dernière opération a été effectuée au grossissement 850, en utilisant l'oculaire intégrateur Zeiss I dont l'emploi en biologie a récemment été étudié et critiqué par SOLARI (1973). Cet oculaire superpose à la coupe histologique une grille de points. Le dénombrement des points correspondant aux différentes catégories cellulaires permet d'évaluer la part de volume occupée par ces constituants :

$$V_x/V = A_x/A = L_x/L$$

V, A : volume et surface de la coupe ;  
 L : nombre total de constituants de la coupe ;  
 V $\alpha$ , A $\alpha$  : volume et surface des constituants ;  
 L $\alpha$  : nombre de constituants de chaque catégorie.

Il a été dénombré entre 400 et 500 points par testicule suivant la taille de la gonade et la diversité des constituants cellulaires. Les champs comptés couvraient toute la surface de la coupe histologique et les coupes utilisées étaient espacées d'au moins 50  $\mu$ .

TABLEAU I

*Dates des autopsies, nombre et taille des mâles étudiés*

Date des autopsies	Nombre de mâles	Durée de la captivité	Taille en mm
22 avril	3	2 jours	17-19-19
9 mai	4	1 mois	16,5-17-19-19,5
2 juin	4	1 mois 1/2	14,5-15-15-17,5
16 juin	4	2 mois	19-19,5-20-19
2 juillet	4	3 mois	17,5-18-20-21
16 juillet	3	3 mois	19,5-19,5-20
22 juillet	3	3 mois 1/2	19-20-20
28 août	4	4 mois 1/2	19,5-19,5-20,5-20,5
16 septembre	2	5 mois	19-20
4 octobre	4	5 mois	17-17,5-20-20,5
4 novembre	3	2 mois	17-19,5-21
18 janvier	2	3 mois 1/2	18-18
5 février	3	4 mois	19-19-19
22 février	3	4 mois 1/2	18-19-20,5
22 mars	2	5 mois 1/2	19-20

*Abréviations utilisées*

GI : spermatogonie primaire ; GII : spermatogonie secondaire ; SI : spermatocyte primaire ; (l : leptotène ; z : zygotène ; p : pachytène ; d : diplotène) ; SII : spermatocyte secondaire ; SP : spermatides (Sr : rondes ; Sl : allongées ; Sg : groupées en faisceau) ; Sz : spermatozoïdes mûrs groupés sur les cellules de Sertoli ; Szl : spermatozoïdes en cours d'évacuation ; CF : cellule folliculaire ; CS : cellule de Sertoli.

## RÉSULTATS

### I. — Structure des testicules

Appendus aux corps adipolymphoïdes, les testicules sont situés dans la cavité générale au niveau des reins auxquels ils sont reliés par les canaux efférents et un fin mésentère. A l'intérieur de la glande ces canaux efférents sont localisés dans la partie médiane. Leur importance varie au cours du cycle : ils sont plus développés pendant la spermiogénèse et la période de reproduction. L'épithélium qui les borde est de type cubique (Pl. I a).

Les testicules sont organisés en tubes séminifères à l'intérieur desquels les cellules

germinales n'ont pas de répartition privilégiée. Par ailleurs, à l'exception des spermatogonies primaires, toutes les cellules sexuelles sont groupées en cystes ; à l'intérieur d'un même cyste, les divisions mitotiques et méiotiques sont synchrones. Les cellules folliculaires, petites et allongées, qui accompagnent les spermatogonies primaires s'accolent ensuite à la périphérie des cystes (Pl. I a et I b). Les cellules germinales ont déjà été décrites au cours d'une étude de l'organogenèse des gonades (LAMOTTE, GLACON et XAVIER, 1973).

De fines travées conjonctives limitent les tubes séminifères. Ce tissu contient des amas de pigments mélaniques dont l'importance fluctue au cours du cycle. La couleur externe des testicules s'en trouve modifiée : elle fonce à partir de décembre jusqu'à être complètement noire en mars, puis elle s'éclaircit.

Les études histochimiques révèlent qu'il n'existe pas de tissu interstitiel en tant que tel, entre les tubes séminifères. Seules des cellules de Sertoli, grandes cellules à contours plus ou moins triangulaires appliquées contre la travée conjonctive, et des cellules disséminées dans le conjonctif possèdent une  $\Delta_5\text{-}3\beta\text{-hydroxystéroïde}$  déshydrogénase.

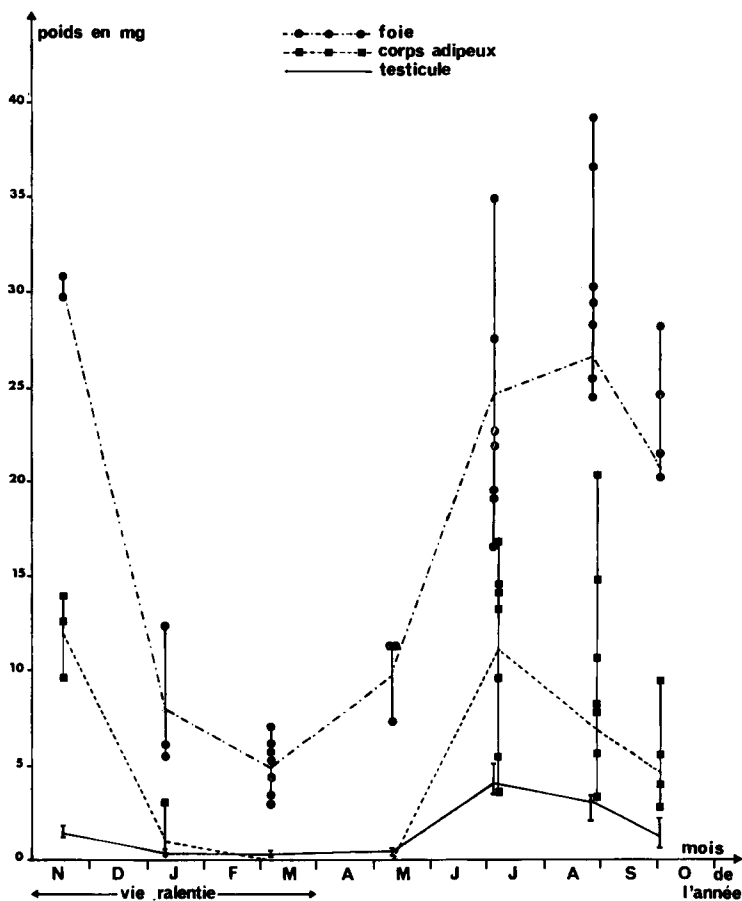


FIG. 1. — Évolution du poids du testicule, du foie et des corps adipeux au cours de l'année

2. — *Aspects biométriques de l'évolution du testicule au cours du cycle annuel*

Deux paramètres ont été utilisés pour définir l'évolution biométrique de la gonade mâle de *N. occidentalis* : le poids et la « surface » évaluée à partir de la mesure des deux plus grandes dimensions.

La courbe de la figure 1 traduit l'évolution dans le temps du poids testiculaire. Après une diminution importante au cours des deux premiers mois de la vie ralentie, le poids se stabilise entre 0,100 et 0,400 mg jusqu'au début du mois de mai. Les crapauds reprennent alors leur vie active et la croissance pondérale du testicule recommence.

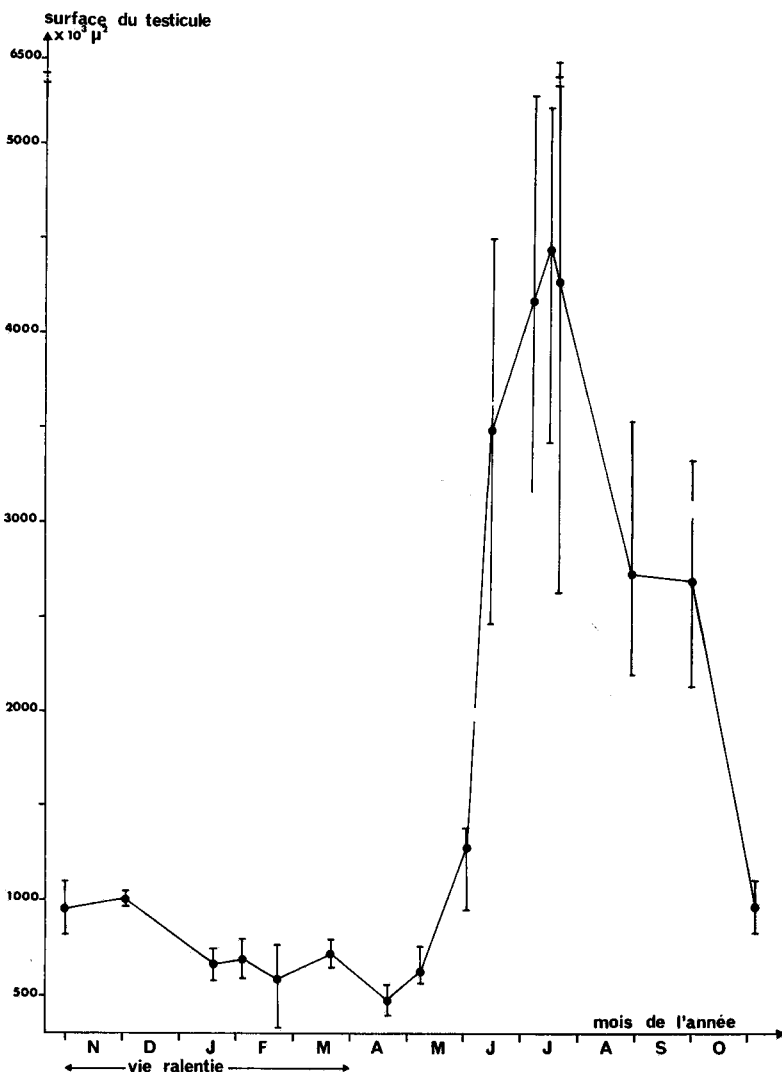


FIG. 2. — Évolution de la surface du testicule, assimilée à une ellipse, au cours de l'année

Cette croissance est très rapide et en deux mois les testicules atteignent leur poids maximal (3,5 à 5,0 mg) ; elle est suivie d'une décroissance qui s'accroît dès la fin du mois d'août, alors que commence la période de reproduction, par suite de l'évacuation des spermatozoïdes mûrs.

La « surface » du testicule a été assimilée à une ellipse et les variations de ce paramètre au cours du cycle sont figurées dans la figure 2. Il apparaît que le poids et la taille du testicule évoluent de la même façon : la surface décroît après l'enfouissement des mâles et reste minimale pendant toute la durée de la vie ralentie, puis augmente considérablement et rapidement au début de la saison des pluies. La surface atteint sa valeur maximale en juillet et diminue ensuite à mesure que s'avance la période de reproduction.

De même, le diamètre des tubes séminifères fluctue au cours du cycle : minimal pendant toute la durée de la saison sèche, il augmente rapidement au début de la période de vie active.

### 3. — Évolution de l'activité spermatogénétique au cours du cycle annuel : étude biométrique

#### a) Période de repos sexuel.

Dès le début du mois d'octobre, la population de *N. occidentalis* s'enfouit dans le sol pour se protéger de la chute du degré hygrométrique de l'air. Des conditions semblables au laboratoire (cf. Matériel et Méthodes) ont permis de suivre, pendant cette période, l'évolution de la spermatogenèse et des caractères sexuels secondaires tels que les callosités des pouces. Les épines qui constituent ces dernières perdent rapidement leur pigmentation et diminuent de taille. A partir de janvier elles sont petites et incolores chez la plupart des mâles, inexistantes pour d'autres.

Au début de l'enfouissement, les tubes séminifères sont béants et ne contiennent plus que quelques spermatozoïdes en dégénérescence. Les spermatogonies primaires et les cellules folliculaires accompagnatrices sont régulièrement disposées sur la trame conjonctive qui limite les tubes séminifères.

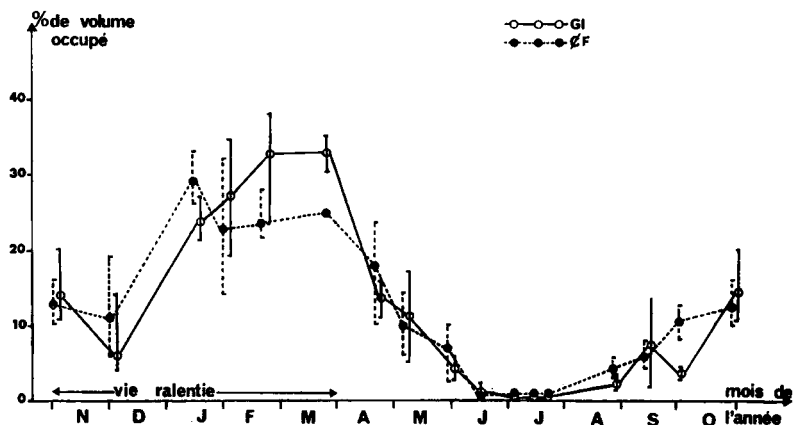


FIG. 3. — Pourcentage du volume du testicule occupé par les spermatogonies primaires (GI) et les cellules folliculaires (CF) au cours du cycle annuel

A la fin du mois de décembre les spermatogonies I présentent des figures de division : la part de volume qu'elles occupent augmente sensiblement, puis se stabilise entre 20 et 35 p. 100 du volume du testicule de la mi-janvier à la fin du mois de mars (fig. 3). Les spermatogonies I comblent alors partiellement la lumière des tubes tandis que les cellules folliculaires migrent de la périphérie vers le centre. Il est intéressant de noter que le volume occupé par ces cellules croît en même temps que celui des spermatogonies I et dans les mêmes proportions (fig. 3). Comparativement, de la mi-février à la fin mars, le volume des cellules folliculaires reste sensiblement constant (15 à 32 p. 100 du volume de la gonade). Aucune division n'a été observée parmi ces cellules. Les spermatogonies secondaires sont présentes dans le testicule mais en quantités faibles et variables.

b) *Période de multiplication des spermatogonies secondaires.*

Dès le mois d'avril, le volume qu'occupent les spermatogonies secondaires augmente considérablement. Les variations individuelles sont importantes. Les cystes, au cours de ces divisions mitotiques successives, augmentent de volume et finissent par obstruer complètement la lumière des tubes séminifères dont la section est de plus en plus grande. Cette période de multiplication intensive des gonies II dure d'avril jusqu'à la mi-juin (fig. 4).

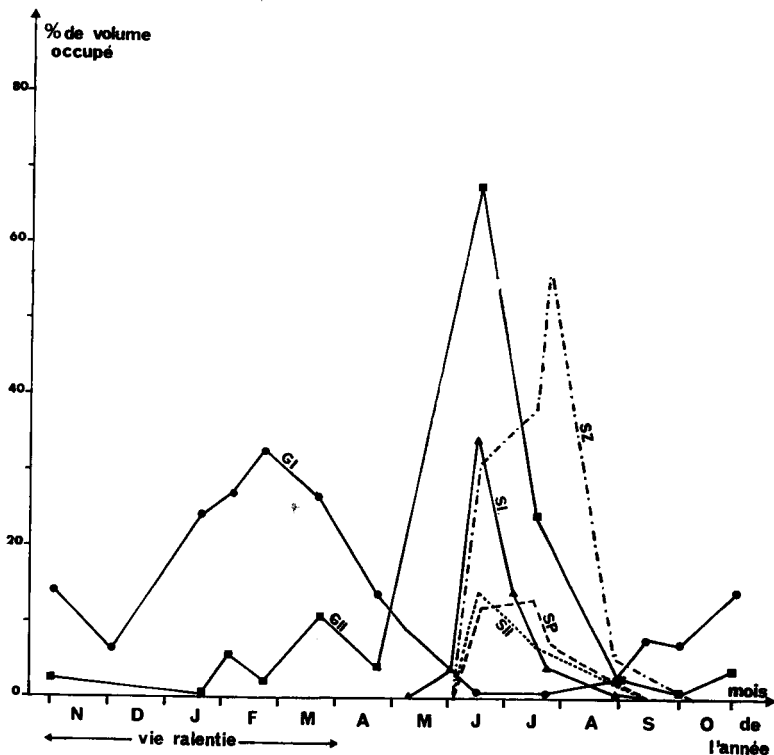


FIG. 4. — Diagramme résumant l'évolution de la spermatogenèse des mâles de *N. occidentalis* au cours du cycle annuel.

Spermatogonies I (G1), et II (GI1), spermatocytes I (SI) et II (SII), spermatides (Sp), spermatozoïdes en faisceaux sur les cellules de Sertoli (Sz)

Dès la mi-juin, la part de volume qu'elles occupent diminue jusqu'à tomber à moins de 1 p. 100 du volume du testicule ; les spermatogonies II commencent leur prophase méiotique. Entre la fin du mois d'avril et la mi-juin, période de grand développement des spermatogonies secondaires, la quantité de cellules pycnotiques augmente sensiblement. Cette dégénérescence atteint quelques cellules ; le pourcentage du volume du testicule qu'elles occupent n'est jamais très élevé (entre 0,6 et 4 p. 100) et reste très variable d'un individu à l'autre.

c) *Spermiogenèse et reproduction.*

Au début du mois de juin, les spermatogonies occupent encore 35 à 55 p. 100 du volume du testicule. On observe, à cette date, des cystes de cellules à tous les stades de la prophase de la méiose mais ni spermatocytes II ni spermatides (fig. 4). Quinze jours plus tard, les spermatogonies II sont encore nombreuses (7 à 50 p. 100) mais les spermatocytes II et les spermatides sont apparues et occupent un volume maximal. Chaque catégorie cellulaire représente un pourcentage du volume du testicule qui diminue jusqu'à 3 p. 100 et moins à la fin du mois d'août, puis devient nul à la mi-septembre (fig. 4). La quantité de spermatogonies secondaires chute brusquement entre la mi-juin et le début du mois de juillet, puis décroît encore tout en restant très fluctuante d'un animal à l'autre pendant la suite du cycle.

Les spermatozoïdes sont formés dans la première moitié du mois de juin, puis, vers la fin du mois de juillet, ils se détachent des cellules de Sertoli en emportant parfois un fragment de ces cellules. Les spermatogonies primaires et les cellules de Sertoli qui restent, sont disposées sur la trame conjonctive autour des spermatozoïdes mûrs en suspension dans la lumière des tubes séminifères dilatés. Les gamètes sont ensuite évacués par les canaux efférents qui se sont développés.

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'évolution biométrique du testicule de *N. occidentalis* est caractérisée par la rapidité de la décroissance en novembre et de la croissance en mai, par un net ralentissement de cette dernière phase au moment de la reproduction et par le maintien du testicule à une taille réduite durant toute la vie ralentie. L'étude du bilan énergétique du mâle de *N. occidentalis* a mis en évidence la même succession de phases d'augmentation, de diminution de poids et de chute d'activité trophique de l'animal pendant la période de reproduction alors que les conditions d'alimentation n'ont pas changé (LAMOTTE, 1972). Ces variations ont une signification métabolique puisque l'évolution pondérale du foie et des corps adipeux est identique à celle de l'animal lui-même et à celle du testicule (fig. 1).

Pendant les six mois que dure la saison sèche l'activité spermatogénétique des mâles de *N. occidentalis* est réduite à la seule multiplication des spermatogonies I et le métabolisme des animaux est minimal. En avril, à la multiplication des spermatogonies I succède nettement celle des spermatogonies II et la prophase de la méiose débute alors que cette poussée goniale est à peine commencée. C'est uniquement pendant cette dernière phase de divisions mitotiques que des phénomènes de pycnose apparaissent. De telles observations ont également été faites par VAN OORDT (1956)



chez *Rana temporaria* pendant la période de repos sexuel du mâle. CHAMPY (1913) utilisait le terme de « préspermatogenèse » pour définir cette période de pycnose.

Quinze jours après les premières divisions réductionnelles, les spermatocytes II, les spermatides et les spermatozoïdes apparaissent. Les spermatocytes I et II, et les spermatides n'occupent respectivement jamais plus de 45,25 et 15 p. 100 du volume de la gonade, alors que les spermatogonies II, pendant la même période, en occupent jusqu'à 80 p. 100. La méiose puis la maturation des spermatides n'ont donc lieu que sur une fraction des spermatogonies II pendant que la multiplication de ces dernières se poursuit. Fin octobre, alors que les gonades ne contiennent plus que de rares cystes de spermatides, peu de spermatozoïdes en faisceaux et beaucoup de spermatozoïdes en tourbillon dans la lumière des tubules, la multiplication des spermatogonies primaires recommence. Ces divisions, d'abord peu nombreuses, augmentent à partir de la seconde moitié de la période de vie ralentie.

Le terme de cycle sexuel discontinu, utilisé pour la première fois par CEI à propos de *Rana temporaria* (1942) convient donc bien pour caractériser l'activité des mâles de *N. occidentalis*. Cette espèce se distingue des formes tropicales et subtropicales pour lesquelles la spermatogenèse est continue (VOGELI et XAVIER, 1965). Seuls certains Amphibiens des régions tempérées, où les amplitudes thermiques sont importantes, étaient connus pour présenter une activité spermatogénétique réduite ou même interrompue pendant les mois d'hiver. Ce sont les variations de température et de rythme de nutrition qui jouent un rôle dans le déroulement de la spermatogenèse de *Rana esculenta* (GALGANO, 1935). Chez *Rana temporaria*, au contraire, seule la température intervient et ce de façon variable selon la saison (VAN OORDT, 1956). Enfin ce sont des facteurs endogènes qui règlent l'activité testiculaire de *Pleuroderma bufonica* (CEI et CODOCEO, 1957). En passant de la vie active à la vie ralentie la population de *N. occidentalis* est soumise à une diminution de l'hygrométrie de l'air, de la quantité de nourriture et de luminosité. Ce sont ces trois facteurs caractéristiques du biotope qui doivent intervenir dans la régulation de son cycle.

Reçu pour publication en juillet 1975.

## REMERCIEMENTS

Je remercie vivement M<sup>me</sup> F. XAVIER et M. R. BILLARD pour les conseils précieux qu'ils m'ont donnés. Je tiens également à remercier M<sup>me</sup> M. ZUBER-VOGELI qui a bien voulu mettre à ma disposition du matériel et M<sup>me</sup> C. GAUTHIER qui s'est occupée de l'élevage.

## SUMMARY

### GAMETOGENESIS OF MALE OF *NECTOPHRYNOIDES OCCIDENTALIS* ANGEL (ANOURAN VIVIPAROUS AMPHIBIAN).

#### I. — QUANTITATIVE STUDY DURING ANNUAL CYCLE OF MATURE MALE

During the six months of the dry season, the population of *Nectophrynoides occidentalis* leads an underground life and male spermatogenetic activity is reduced to mitotic division of primary spermatogonia. As soon as the rains begin, toads are active : meiosis and spermiation take place within four months.

The normal spermatogenetic cycle is studied quantitatively to determine the influence of external factors on spermatogenesis. A zeiss ocular integrator I is used to estimate the testicular volume filled by each type of germ cell, these volumes are expressed in per cent of gonad volume.

The successive spermatogenetic stages are :

1. Primary spermatogonia division begins at the end of September and ends in May. These spermatogonias occupy a maximum volume in March ;
2. Secondary spermatogonia division lasts from April to June ;
3. Meiosis begins in June. Spermatocytes I and II and spermatids never occupy more than 10 to 15 p. 100 of the testis ;
4. Spermatogenesis occurs from May to August.

Sperm cells constitute bundles at the top of Sertoli cells and represent up to 60 p. 100 of the volume of the gonad. Sperm is evacuated from the end of August to the end of October.

*N. occidentalis* males are seasonal breeding amphibians. The phase of low testicular activity also corresponds to low metabolic activity for the males.

### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANGEL F., 1943. Description d'un nouvel Amphibien Anoure vivipare de Haute Guinée française. *Bul. Mus. Paris*, **15**, 167-169.
- ANGEL F., LAMOTTE M., 1944. Un Crapaud vivipare d'Afrique occidentale, *Nectophrynoïdes occidentalis* (ANGEL). *Ann. Sci. Nat. Zool.*, **10**, 63-89.
- CHAMPY C., 1913. Recherches sur la spermatogenèse des Batraciens et les éléments accessoires du testicule. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, **52**, 13.
- CEI G., 1942. Prime osservazioni sui fattori regolano il ciclo spermatogenetico periodico sulla *Rana temporaria* ereditarietà e influenze ambientali. *Monit. Zool. Ital.*, **58**, 131-151.
- CEI J. M., CODOCEO M., 1957. Probelle discontinuidad del ciclo spermatogenetico de *Pleuroderma bufonica*. *Inv. Zool. Chilmas*, **4**, 77-82.
- GALGANO M., 1953. Interno all'influenza del clima sull spermatogenesi di *Rana esculenta*. *Arch. Ital. Anat. Embriol.*, **35**, 5-11.
- LAMOTTE M., 1959. Observations sur les populations naturelles de *Nectophrynoïdes occidentalis* ANGEL. *Bull. Biol. Fr. Bel.*, **93**, 314-355.
- LAMOTTE M., 1972. Bilan énergétique de la croissance du mâle de *Nectophrynoïdes occidentalis* ANGEL, Amphibien Anoure. *C. R. Acad. Sci. Paris, D*, **274**, 2074-2076.
- LAMOTTE M., GLACON R., XAVIER F., 1973. Recherches sur le développement embryonnaire de *Nectophrynoïdes occidentalis* ANGEL, Amphibien Anoure vivipare. II. Le développement des gonades. *Ann. Embryol. Morph.*, **6**, 271-296.
- SOLARI A., 1973. Étude quantitative d'organes ou de tissus. I. Méthodes d'estimation des volumes. *Ann. Biol. anim. Bioch. Bioph.*, **13**, 247-265.
- VAN OORDT P. G. W., 1956. *Regulation of the spermatogenetic cycle in the common the frog Rana temporaria*. G. W. Van Der Wiel and Co Arnhem, 116 p.
- VAN OORDT P. G. W., 1960. The influence of internal and external factors in the regulation of the spermatogenetic cycle in Amphibia. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, **2**, 29-52.
- ZUBER-VOGELI M., XAVIER F., 1965. La spermatogenèse du mâle de *Nectophrynoïdes occidentalis* ANGEL, au cours du cycle annuel. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **90**, 261-267.

PLANCHE

## PLANCHE I

*Détails de quelques cellules de la lignée germinale*

a) Repos sexuel (janvier) : spermatogonies primaires (\*)  
cellules folliculaires (CF).

b) Méiose (mi-juin) : cystes de spermatogonies secondaires (GII), de spermatocytes primaires au stade leptotène (L), de spermatocytes primaires à la métaphase (SI), cellule nourricière accompagnant les cystes (\*).

c) Spermiogenèse (début mai). Jonction de trois tubules séminifères. Cystes de spermatocytes secondaires (SII), de spermatides rondes (Sr) et allongées (SI), spermatozoïdes groupés sur les cellules de Sertoli (Sz).

d) Reproduction (fin du mois d'août) : spermatozoïdes en cours d'évacuation dans les canaux efférents (\*).

