

## ETUDE DES PARAMETRES MICROSCOPIQUES DE LA BIOLOGIE DE REPRODUCTION CHEZ LA SQUILLE *SQUILLA MANTIS* DES EAUX TUNISIENNES

Sami MILI<sup>(1,2)\*</sup>, R. ENNOURI<sup>(2)</sup>, O. JARBOUI<sup>(2)</sup> et H. MISSAOUI<sup>(2)</sup>

(1) Unité Exploitation des Milieux Aquatiques. Institut Supérieur de Pêche et d'Aquaculture de Bizerte, BP 15, 7080 Menzel Jemil, Tunisie.

(2) Institut National des Sciences et Technologies de la Mer, 28, rue 2 mars 1934 Salammbô, 2025, Tunisie.

\* [sami\\_mili@yahoo.fr](mailto:sami_mili@yahoo.fr)

**دراسة المعايير المجهرية لبيولوجيا التكاثر لدى الشيقالي بالمياه التونسية:**  
المقاربة الأولية لإثبات النتائج العينية للتكاثر لدى الشيقالي بالمياه التونسية. تهدف هذه الدراسة الى تحديد مختلف اطوار نمو البويضات وحركية تطورها وبالتالي استنتاج استراتيجيات بيض هذا النوع من القشريات. تركز هذا العمل على دراسة الأنسجة الخاصة بـ 380 مبيض انثى شيقالي مصطادة من خليج القشريات. كما اعتمدنا تعداد الجرابيه المتبقية بعد عملية البيض و البيوض المنفصلة كدليل على وجود عمليات بيض سابقة. كل الأطوار النسيجية مع المراحل العينية للنضج الجنسي و ذلك للثبوت من كل مراحل دورة التكاثر لدى الشيقالي. مكن تحليل انسجة المبيض من تقسيم فترة تكون البويضات الى اربعة مراحل:  
القشريات 6 : , الراحة الجنسية , بداية تكون المح , , البيض ,  
البيض و الاسترداد. اثبت الوجود المتزامن للجرابيه المتبقية بعد عملية البيض و البيوض المنفصلة ان الشيقالي بالمياه التونسية ينتمي الى مجموع الاجناس التي تبيض مرة واحدة .  
**كلمات مفاتيح:** الشيقالي , دراسة الأنسجة , التكاثر , البيض , المياه التونسية.

### RESUME

L'étude histologique représente la première approche pour la validation des résultats macroscopiques de la reproduction chez *Squilla mantis* des eaux tunisiennes. Les objectifs de cette investigation sont d'une part l'identification des différentes phases du développement ovocytaire et d'autre part de décrire la cinétique de l'ovogenèse ainsi que la stratégie de ponte de cette espèce. L'étude histologique a été réalisée sur les ovaires de 380 femelles de *Squilla mantis* pêchées dans les trois golfes de la Tunisie (Tunis, Hammamet et Gabès). Dans cette étude, les follicules post-ovulatoires et les ovocytes atrésie atrétiques ont été utilisés comme indicateurs d'une activité de ponte antérieure. Chaque phase histologique a été corrélée au stade macroscopique de maturité et au rapport gonado-somatique des individus étudiés et ceci afin de valider les différentes phases du cycle de reproduction chez *S. mantis*. L'analyse des coupes histologiques des ovaires a permis de diviser l'ovogenèse en 4 phases : pré-vitellogenèse, vitellogenèse, maturation et atrésie. Le cycle sexuel des femelles de squilles peut être composé de 6 étapes : juvéniles, repos sexuel, début de la vitellogenèse, vitellogenèse, ponte, post-ponte et récupération. La présence des follicules post ovulatoires et une faible fréquence des ovocytes à différents stades de développement permettent d'affirmer que les squilles des eaux tunisiennes appartiennent aux groupes d'espèces à ponte unique. Ce crustacé appartient au groupe des espèces dont la fécondité de la femelle croît proportionnellement moins vite que le cube de la longueur totale. Cette fécondité présente une différence significative entre les trois golfes de la Tunisie.

**Mots clés :** *Squilla mantis*, stratégie de ponte, cinétique de l'ovogenèse, histologie, fécondité, eaux tunisiennes.

### ABSTRACT

**Microscopic parameters of the reproductive biology of the spot-tail mantis shrimp *Squilla mantis* caught in Tunisian waters :** This histological study represents the first approach to validate the results obtained in macroscopic reproduction of *Squilla mantis* (L., 1758) in the Tunisian waters. The aim of this investigation was the identification of the oocyte development phases, the description the oogenesis kinetics and the spawning strategy of this species. A total of 380 female ovaries of *Squilla mantis* caught in the Tunisian gulfs (Tunis, Hammamet and Gabes) were examined. The photomicrographs of histological developmental stages and

measurement of oöcytes were performed using an image analysis system (Optimas 6.5 software). Thereafter for the histological study, only a portion of the middle part of the ovary from each female was chosen to facilitate manipulations. During oögenesis, oöcytes develop continuously through different steps. Some steps can be identified as oöcyte development or maturation stages according to their microscopic features. In this study, identification of representative histological development stages is based on oöcyte, nucleus and cytoplasm sizes, cytoplasm homogeneity, inclusions type and quantity and cumulative oöcyte size frequency distributions. To determine the range of oöcytes diameters at the different developmental stages, the area equivalent diameter of at least 100 cells per stage was measured. Post-ovulatory follicles and atretic oöcytes were equally considered as ovary characteristic elements in the reproductive strategy study. Indeed, post-ovulatory follicles and atretic oöcyte stages are used as indicator of previous spawning activity. The ovarian cycle was determined histologically based on the relative frequency of the different oöcyte developmental stages and post-ovulatory follicles. Seven growth substages of oöcytes were distinguished: 1) Early primary oöcyte, St1; 2) Late primary oöcyte, St2; 3) Primary vitellogenic oöcyte, St3; 4) Early secondary vitellogenic oöcyte, St4; 5) Late secondary vitellogenic oöcyte, St5; 6) Hyaline oöcyte, St6; and 7) Atretic oöcyte, Atr. The histological stages were correlated to the macroscopic maturity and to the gonad index to validate the reproductive cycle of *S. mantis*. The analysis of the histological sections of the female's ovaries shows that oögenesis can be divided in 4 phases: pre-vitellogenesis, vitellogenesis, maturation and atresia. The kinetics of oögenesis of females of *S. mantis* is characterized by six successive ovarian development phases: Juvenile, sexual resting, beginning of vitellogenesis, vitellogenesis, spawning and post-spawning and recuperation. At the mature ovarian phases, two populations of oöcytes were distinguished; a fairly synchronous population of large vitellogenic oöcytes (St3 or St4 or St5), and a heterogeneous population of smaller oöcytes from which the next clutch will be recruited. In terms of ovarian organization, *S. mantis* can be considered as "group-synchronous". The presence of only one clutch of yolked oöcytes able to be ovulated once during the breeding period suggests that the Spot-tail mantis shrimp spawns only once during every sexual cycle, i.e., *S. mantis* can be classified as species with a unique spawning period. The fecundity of the female of *S. mantis* increases proportionally less than to the cube of the total length and it was significantly different between the three gulfs of Tunisia. The average of the relative fecundity is about  $1618 \pm 632$  eggs / g of mantis shrimp.

**Keywords:** *Squilla mantis*, spawning strategy, kinetics oögenesis, histology, fecundity, Tunisian waters.

## INTRODUCTION

La squille *Squilla mantis* (L., 1758) est un Stomatopode très abondant dans les trois golfes de la Tunisie (Tunis, Hammamet et Gabès) (Mili, 2013). La définition des paramètres relatifs à la stratégie de reproduction des espèces exploitées notamment les squilles tunisiennes est indispensable pour une gestion appropriée des pêcheries. Ainsi, l'étude de la stratégie de reproduction permet la quantification de la capacité reproductive des individus et par conséquent une gestion rationnelle des stocks exploitables. Les études microscopiques ont été communément utilisées dans les études de la reproduction de plusieurs espèces marines. L'ovogenèse a été étudiée avec les méthodes histologiques chez beaucoup de crustacés (Rjeibi, 2012) et spécifiquement chez quelques espèces de Stomatopodes (Do Chi, 1978 ; Ferrero *et al.*, 1988; Decaraman, et Subramoniam 1983; Wortham-Neal, 2002 ; Kodama *et al.*, 2004). Cependant, aucune étude se rapportant à l'histologie ovarienne de *Squilla mantis* n'a été réalisée auparavant, malgré le nombre important de travaux qui s'est intéressé à l'aspect macroscopique de la reproduction de cette espèce. Les études histologiques fournissent des informations

plus détaillées sur les substructures cellulaires et leurs prédominances durant tout le cycle reproductif de l'espèce. L'observation microscopique des ovaires de *Squilla mantis* représente la première approche pour la validation des résultats macroscopiques de la reproduction de cette espèce dans les eaux tunisiennes. Le principe est d'identifier à travers les coupes histologiques les différentes phases du développement ovocytaire et de décrire la cinétique de l'ovogenèse ainsi que la stratégie de ponte de cette espèce. La cinétique de l'ovogenèse représente la manière avec laquelle les ovocytes progressent vers la maturité, tandis que la stratégie de ponte décrit la façon avec laquelle les ovocytes sont émis. Au cours de l'ovogenèse, les ovocytes subissent des transformations biologiques et biochimiques et acquièrent des réserves nécessaires au développement du futur embryon. La majorité de ces transformations s'effectue d'une manière continue, mais il est commode pour suivre l'évolution ovocytaire, de déterminer plusieurs stades caractéristiques qui présentent des particularités pour pouvoir les identifier.

Différentes substructures cellulaires peuvent être identifiées dans les follicules en croissance et le suivi de leur évolution permet d'interpréter le statut reproductif. Dans le présent travail, on s'est intéressé

uniquement aux femelles *Squilla mantis* car elles représentent le facteur limitant de la reproduction, par contre les spermatozoïdes sont dominants (Do Chi, 1978 ; Wortham-Neal, 2002). L'approche histologique a été appliquée pour étudier le développement ovocytaire afin de comprendre le processus de l'ovogenèse et de déterminer ainsi la stratégie de ponte de l'espèce. Entre autres, cette approche a été utilisée pour valider l'échelle macroscopique du développement ovarien préétablie. Les résultats de l'étude de la reproduction ont été comparés à ceux rapportés à d'autres populations de la Méditerranée et à d'autres espèces de Stomatopodes.

## MATERIEL ET METHODES

Les prélèvements mensuels des squilles ont été réalisés le long des côtes tunisiennes entre janvier 2005 et décembre 2006. Au total 22883 individus, servant à l'étude macroscopique de la reproduction, ont été mesurés et leur sexe déterminé. Ces échantillons proviennent du chalutage professionnel dans le golfe de Hammamet et de Gabès, quant aux spécimens originaires du golfe de Tunis, ils ont été collectés des débarquements des unités côtières utilisant les filets trémails. Une fois au laboratoire, les paramètres relatifs à l'étude macroscopique de reproduction de la squille ont été relevés. Pour tous les individus examinés, la masse totale (Wt) et la masse éviscérée (We) ont été mesurées au centième de gramme près. La longueur totale (Lt) a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse au 0,1 mm près. Après dissection, les gonades ont été prélevées et pesées avec une précision de 0,01 g. En ce qui concerne la partie microscopique incluant l'identification des différentes structures ovariennes et la cinétique de l'ovogenèse, on a sélectionné des spécimens (380) de différentes classes de tailles. En outre, chez les femelles, des fragments d'ovaires ont été préparés pour l'étude histologique. Trois portions (antérieure, moyenne et postérieure) de l'ovaire de chaque femelle ont été fixées dans la solution de Bouin. Chaque portion, sectionnée transversalement à l'épaisseur de 5 µm, a été colorée au Trichrome de Masson et collée par l'Eukitt (Carson, 1990 ; Gaamour, 1999). Chaque coupe a été examinée au microscope. Les photomicrographies des coupes histologiques et les mesures sur les ovocytes ont été effectuées en utilisant un système d'analyse d'image. La comparaison des tailles et des proportions des stades ovocytaires entre les coupes, transversales et longitudinales, de la même portion d'ovaire et entre les coupes des différentes portions du même ovaire, n'a pas montré de différence significative. Pour cette raison et pour faciliter les manipulations, on a choisi la partie moyenne de l'ovaire. L'acide périodique de Schiff (APS) a été utilisé pour colorer les coupes dans

le but de déceler l'apparition des inclusions glucidiques dans les ovocytes (Martoja et Martoja, 1967 ; Le Duff, 1997 ; Kodama *et al.*, 2004). Dans cette étude, l'identification des stades microscopiques a été basée sur plusieurs critères comme la taille et la forme de l'ovocyte, celle du noyau et du cytoplasme, de son homogénéité. De même, il a été tenu compte de la nature des inclusions qu'il renferme (lipide, glucide ou protéine), leur origine (endogène ou exogène) ainsi que de leur quantité (Kodama *et al.*, 2004 et Rjeibi, 2012). Le diamètre d'une centaine d'ovocytes par stade a été mesuré et ceci afin de déterminer la gamme des diamètres des ovocytes aux différents stades de développement. Seuls les ovocytes, où la coupe histologique passe par le noyau, approximativement sur son plan équatorial, ont été mesurés.

Dans l'étude de la cinétique de l'ovogenèse, les follicules post-ovulatoires (FPO) et les ovocytes atrétiques ont été considérés comme des éléments caractéristiques de la structure ovarienne. En effet, les follicules post-ovulatoires et les ovocytes atrétiques ont été utilisés comme indicateurs d'une activité de ponte antérieure. Le cycle ovarien a été établi histologiquement en se basant sur les fréquences relatives des différents stades de développement ovocytaires et des follicules post-ovulatoires. Le nombre des ovocytes et des FPO comptés dans chaque ovaire par spécimen varie entre 243 à 654. Ce nombre dépendant de la phase de maturation de la gonade et de la surface sectionnée lors de la coupe histologique.

Pour l'étude de la fécondité chez cette espèce, les ovocytes ont été conservés dans le liquide de Gilson puis nettoyés et séparés du tissu conjonctif par décantation dans des bains successifs d'eau distillée. Chaque ovaire a été dilué dans un volume d'eau de 1000 ml. Après homogénéisation, 3 sous-échantillons de 1,5 ml chacun ont été prélevés. Le comptage et l'étude de la fréquence de distribution des diamètres ovocytaires des sous échantillons ont été réalisés en analyse d'image, à l'aide du logiciel "OPTIMAS". Pour chaque ovaire échantillonné, la distribution des diamètres ovocytaires, par classes de taille de 20 µm, a été établie en utilisant le logiciel Statistica de StatSoft. Les résultats obtenus ont été utilisés pour calculer la fécondité relative (nombre d'œufs par gramme de squilles) et la fécondité absolue (FA). Les fécondités absolues ont été corrélées à la longueur totale (Lt) par la relation (KODAMA *et al.*, 2004) :

$$FA = a (Lt)^b$$

L'ajustement des équations a été fait par la méthode des moindres carrés. Les 3 relations taille-fécondité ont été comparées après transformation logarithmique. L'analyse de la covariance a été effectuée pour comparer entre la fécondité moyenne des squilles issues des trois golfes.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

### Etude histologique des ovaires

L'étude histologique a concerné 380 individus. Les femelles étudiées ont des longueurs comprises entre 6,5 cm et 19 cm comme longueur totale. Les ovaires prélevés sont de couleurs variables (jaune, orangé) et de différents aspects (lisse, granuleux ayant les ovocytes visibles). Ces ovaires sont collectés durant toute l'année et à partir des 3 golfes (Tunis, Hammamet et Gabès). Au cours de l'ovogenèse, les ovocytes subissent de différents types de transformations et acquièrent des réserves pour le développement du futur fœtus. Ces transformations s'effectuent continuellement, mais pour mieux suivre l'évolution ovocytaire, il est primordial de déterminer les stades caractéristiques qui présentent des particularités. L'analyse des coupes histologiques des ovaires des femelles de la squille *Squilla mantis* a permis de diviser l'ovogenèse en 4 phases: prévitellogenèse, vitellogenèse, maturation et atrésie. Ainsi, 8 stades de développement ovocytaire ont pu être identifiés.

### Stades de développement ovocytaire

Ovocyte primaire préliminaire (St1): Les ovocytes sont des petites cellules arrondies composés d'un cytoplasme homogène et basophile (Fig.1A). Le noyau occupe la quasi-totalité de la coupe de l'ovocyte avec de grands nucléoles sans position particulière. A ce stade, le diamètre des ovocytes varie de 10 à 22  $\mu\text{m}$ .

Ovocyte primaire en accroissement (St2): Les ovocytes à ce stade sont dits prévitellogéniques en accroissement (Fig.1A). Le cytoplasme et le noyau augmentent de diamètre avec des nucléoles de petites tailles et de position périphérique. Le cytoplasme perd graduellement sa basophilie et il est légèrement coloré avec l'hématoxyline. Le diamètre des ovocytes oscille entre 22 et 60  $\mu\text{m}$ .

Ovocyte en vitellogenèse primaire (St3): Les ovocytes en vitellogenèse primaire ont des enveloppes nucléaires plurilobées où se logent les nucléoles (Fig.1B). Ces ovocytes ont un cytoplasme plus acidophile que les ovocytes prévitellogéniques en accroissement. A ce stade les diamètres des noyaux et des ovocytes atteignent respectivement  $48 \pm 5,2 \mu\text{m}$  et  $115 \pm 12,4 \mu\text{m}$  avec un rapport nucléoplasmique élevé. Le développement ovocytaire au sein de ce stade est marqué par l'apparition successive de quatre composantes: le *Zona radiata* (enveloppe vitelline), les inclusions lipidiques, les alvéoles corticaux et les inclusions glucidiques. Le *zona radiata*, coloré par l'acide périodique de shift (APS), apparaît comme une bande mince avec une structure homogène. Les gouttelettes ou vacuoles lipidiques et les alvéoles corticaux (colorés avec l'hématoxyline) apparaissent simultanément à la périphérie du cytoplasme. Les

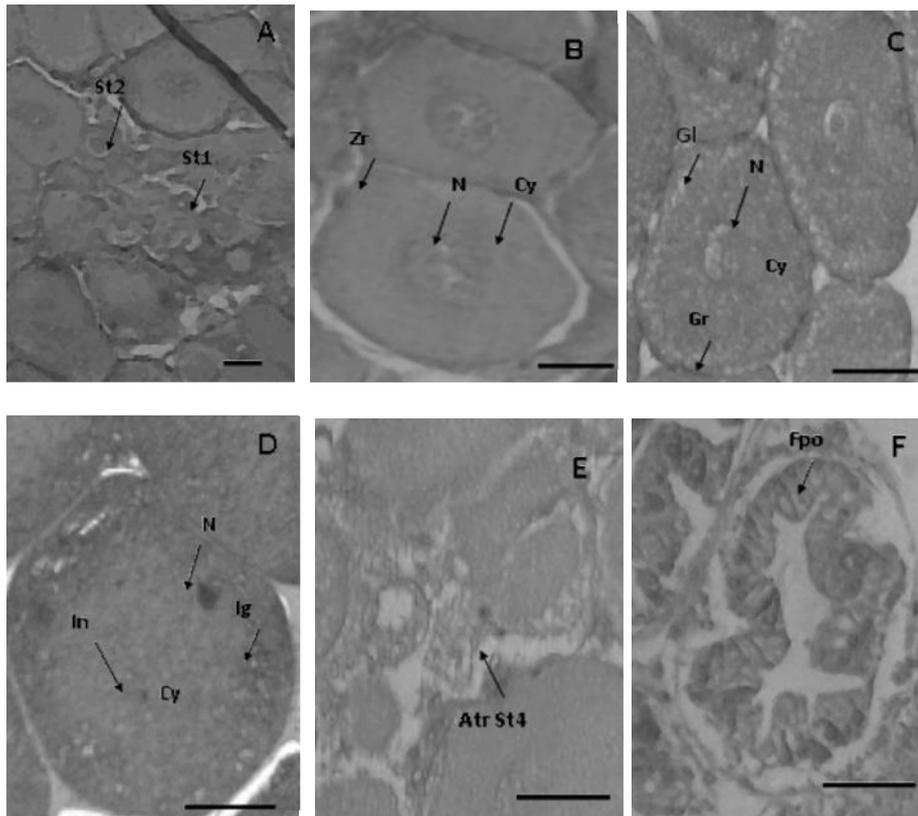
inclusions glucidiques, colorées par l'APS, apparaissent dans la partie périphérique du cytoplasme et l'envahissent graduellement. Ces ovocytes en vitellogenèse primaire sont les premiers ovocytes vitellogéniques. Leur présence avec un grand nombre dans la coupe histologique signale la première phase de la maturation ovarienne.

Ovocyte au début de vitellogenèse secondaire (St4): Les ovocytes à ce stade sont de taille moyenne avec un *zona radiata* plus épais et dont le cytoplasme est envahi par des inclusions vitellines exogènes (Fig.1C). A ce stade, le diamètre ovocytaire est de l'ordre de  $150 \pm 20,6 \mu\text{m}$  alors que celui du noyau est de  $51 \pm 7,6 \mu\text{m}$ . Ces ovocytes sont caractérisés par l'accumulation de petites inclusions de réserve dans le cytoplasme périphérique sous les inclusions glucidiques. Ces inclusions de réserve s'étendent graduellement dans le cytoplasme. L'accumulation centrale de ces réserves déplace les alvéoles corticaux à la zone périphérique du cytoplasme. De plus, le cytoplasme est hétérogène et le taux d'inclusions vitellines représente 30 à 50 % du volume cytoplasmique. Les lobes des enveloppes nucléaires sont plus développés que les ovocytes en vitellogenèse primaire.

Ovocyte en fin de vitellogenèse secondaire (St5): Les ovocytes à ce stade sont de grande taille avec des enveloppes bien développées. Les diamètres moyens des noyaux et des ovocytes sont respectivement de  $55 \pm 8,7 \mu\text{m}$  et de  $385 \pm 82,6 \mu\text{m}$  avec un rapport nucléoplasmique faible (Fig.1D). Les inclusions vitellines envahissent la quasi-totalité du volume cellulaire. Chez ces ovocytes, la vitellogenèse exogène est dominante dans le cytoplasme. La présence de ces ovocytes dans la coupe histologique indique une proche période de ponte.

Ovocyte hyalin (St6): Ce stade est marqué par la migration du noyau vers le pôle animal et l'hydratation de l'ovocyte, c'est l'étape finale de la vitellogenèse. À ce stade, juste avant l'ovulation, le vitellus hyalin se forme suite à la coalescence des inclusions vitellines. Le cytoplasme est complètement occupé par de grandes vacuoles hydratées. L'augmentation brutale du diamètre ovocytaire provoque l'écrasement des couches de la *zona radiata* et la rupture de la *granulosa*; l'ovocyte est libéré de son follicule. Après ovulation, ces deux éléments de l'ovocyte demeurent dans l'ovaire et subissent un processus de dégradation pour former une nouvelle structure: les follicules post-ovulatoires. Uniquement 4 ovocytes hyalins ont été observés dans les 380 coupes d'ovaires.

Follicule post-ovulatoire (FPO): La thèque conjonctive et les cellules de la *granulosa* qui restent dans l'ovaire après la ponte forment le follicule post-ovulatoire (Fig.1F). Les follicules jeunes ont une grande cavité centrale limitée par les cellules hypertrophiées de la *granulosa*. Avec le temps,



**Figure 1 :** Caractéristiques histologiques des stades de développement ovocytaires de *S. mantis*. A : Ovocyte primaire préliminaire St1 et Ovocyte primaire en accroissement St2 (barre d'échelle : 20µm), B : Ovocyte en vitellogenèse primaire St3 (barre d'échelle : 50µm), C : Ovocyte au début de vitellogenèse secondaire St4 (barre d'échelle : 100µm), D : Ovocyte en fin de vitellogenèse secondaire St5 (barre d'échelle : 200µm), E : Ovocyte atrétique Atr (barre d'échelle : 100µm), F : Follicules post-ovulatoire FPO (barre d'échelle : 200µm), Ig : Inclusions glucidiques, In : Inclusions, Gl : Gouttelettes lipidiques, Gr : *Granulosa*, Cy : Cytoplasme, N : Noyau, Zr : *Zona radiata*.

celles-ci envahissent progressivement cette cavité qui finit par dégénérer ; ce groupe de cellules est alors entouré de la thèque conjonctive qui est très épaisse. La présence de follicules post-ovulatoires dans les coupes d'ovaires est le signe d'une ponte antérieure.

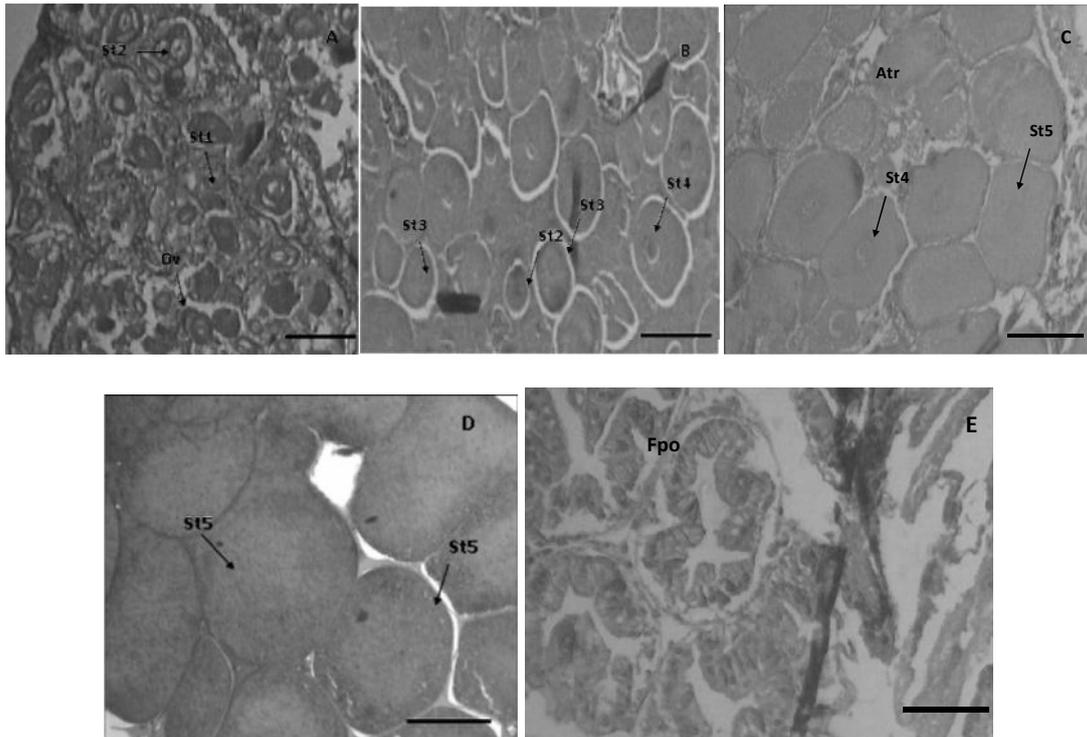
Ovocyte atrétique (Atr): Après ovulation, les ovocytes vitellogéniques restant dans les ovaires prennent un aspect diffus et granulaire puis ils dégèrent (Fig.1E). L'atrésie affecte en premier les St6 restants et par la suite les ovocytes St5, St4 et St3. Cependant, certains ovocytes vitellogéniques peuvent dégénérer et deviennent atrétiques au cours de leurs développements. L'atrésie se manifeste par l'hypertrophie de la *granulosa* et la rupture du *zona radiata*. Les inclusions cytoplasmiques et vitellines ensuite leur individualité et le noyau devient diffus et de forme irrégulière. L'atrésie est scindée en plusieurs stades selon l'état de l'ovocyte. Les derniers stades de dégénérescence peuvent être confondus avec les vieux follicules post-ovulatoires. Les ovocytes en début d'atrésie sont facilement reconnus

### Structures ovariennes : composition en ovocytes et phase de maturité

Les coupes histologiques des ovaires montrent des ovocytes empilés et serrés les uns contre les autres laissant par endroit peu d'espace pour le stroma ovarien. Différentes structures et phases microscopiques ont pu être observées durant le cycle de développement ovarien chez les squilles des eaux tunisiennes. Chaque phase peut être caractérisée en se basant sur les fréquences relatives des différents stades ovocytaires et des follicules post-ovulatoires. L'examen de ces coupes a permis de déceler plusieurs observations (Fig. 2).

- Les ovogonies sont présentes chez toutes les femelles quelque soit leurs stades de développement et elles sont groupées à la périphérie de l'ovaire dans les lobules ovariens;

- Les ovocytes prévitellogéniques aux stades St1 et St2 sont présents dans tous les ovaires indépendamment de la période d'échantillonnage, donc de l'étape du cycle sexuel, avec des fréquences variables (Fig. 1A);



**Figure 2:** Caractéristiques histologiques des structures ovariennes en différentes phases du cycle sexuel chez *S. mantis*. A : Juvénile et repos sexuel, (barre d'échelle : 100µm), B : Début de vitellogénèse (barre d'échelle : 200µm), C : Vitellogénèse (barre d'échelle : 200µm), D : Ponte (barre d'échelle : 200µm), E : Post-ponte et récupération (barre d'échelle : 200µm). Atr = Ovocyte atrétique, Ov: Ovogonie, FPO: Follicule post-ovulatoire, St1, St2, St3, St4 et St5= Stades ovocytaires.

- Les ovocytes vitellogéniques aux stades St3, St4 et St5 font leurs apparitions dans les ovaires des femelles en maturation et en ponte. La distinction entre ces ovocytes dépend du degré d'hétérogénéité et de la nature du vitellus. A un stade avancé de l'ovogénèse, les ovocytes vitellogéniques avec leurs grandes tailles occupent la totalité de la coupe histologique laissant un tout petit espace pour les ovocytes prévitellogéniques (Fig. 1(B, C et D)). Malgré la diversité des tailles et des lieux d'échantillonnage, seuls 4 ovocytes au début du stade hyalin ont été observés dans les coupes histologiques.

- Les follicules post ovulatoires (FPO) sont présents chez les femelles en post ponte et récupération. La présence de ces structures ovariennes indique bien qu'une ponte antérieure a eu lieu (Fig. 1F). Ces FPO sont associées généralement à une augmentation spectaculaire de la fréquence des ovocytes atrétiques qui n'ont pas terminé leur développement et vont dégénérer. Les femelles au début de vitellogénèse ont une très faible fréquence d'ovocytes atrétiques. La fréquence relative des ovocytes atrétiques et le pourcentage des femelles ayant de l'atrésie augmentent progressivement d'une étape du cycle à la suivante (Fig. 1E).

L'analyse de l'histologie des ovaires permet de décomposer le cycle sexuel des femelles de squilles en 6 étapes, chacune d'elle est caractérisée par une

structure bien définie. Les structures de développement ovariennes chez les femelles de *S. mantis* identifiées sont les suivantes : juvénile, repos sexuel, début de la vitellogénèse, vitellogénèse, ponte, post-ponte et récupération (Tableau I).

Les femelles au stade de début de vitellogénèse ont été observées entre novembre et décembre. Les individus avec des ovaires au stade de vitellogénèse sont présents entre janvier et février. Les ovaires au stade de ponte sont rencontrés durant les mois de mars et avril. Le stade de post-ponte et récupération a commencé à partir du mois de mai. Le stade du repos sexuel a pu être caractérisé suite à la capture des individus durant l'automne. Les juvéniles sont présents tout le long de l'année. Cette analyse histologique des ovaires des femelles des squilles confirme bien les phases et la durée des différentes étapes du cycle sexuel déterminé macroscopiquement (Mili, 2013).

#### Cinétique de l'ovogénèse chez une femelle type

L'analyse de la fréquence relative (%) des différents stades ovocytaires et des follicules post-ovulatoires des différentes coupes histologiques des ovaires des femelles de squille a permis d'établir la cinétique de l'ovogénèse chez une femelle type. Depuis le début de la vitellogénèse, deux groupes d'ovocytes ont pu être observés. Le premier groupe est homogène et

**Tableau I :** Structures microscopiques au cours de l'évolution de la maturité ovarienne chez *Squilla mantis*.

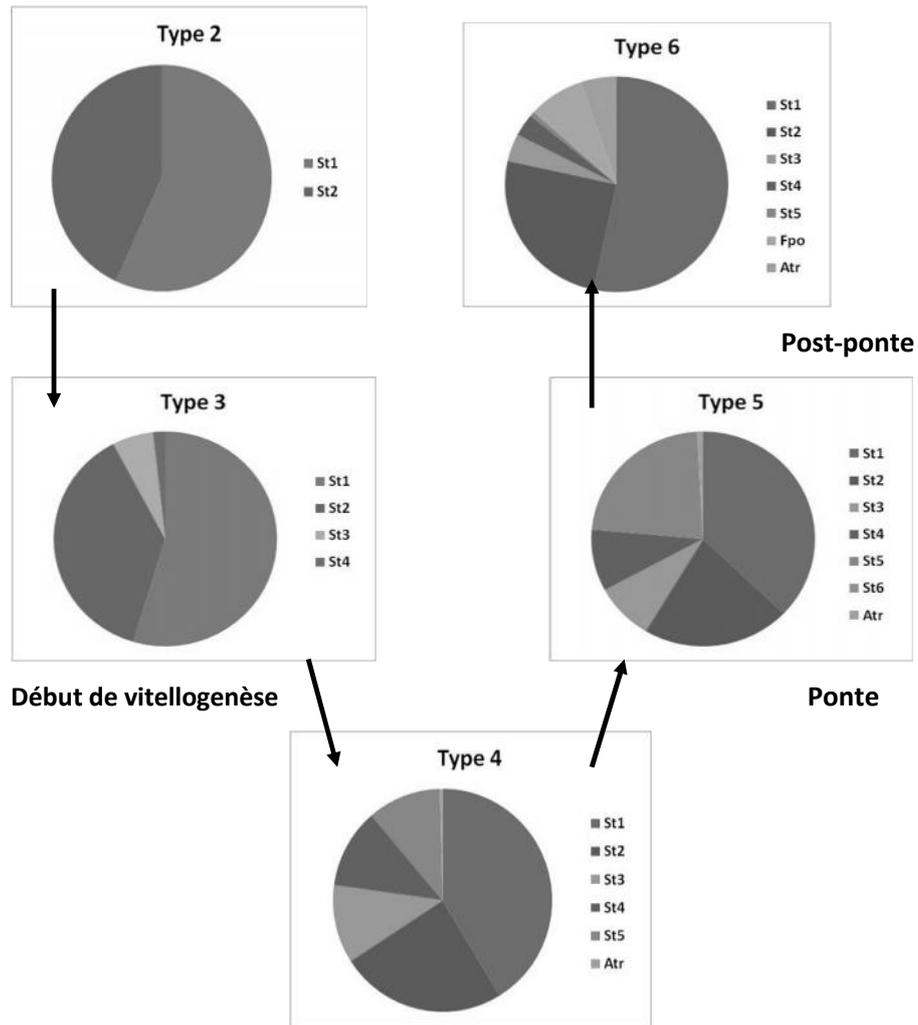
Phases de maturité	Caractéristiques microscopiques
<b>Juvenile</b>	Structure ovarienne homogène, composée essentiellement par le stroma ovarien, ovogonies et des ovocytaires aux stades St1 et St2. Chez les femelles immatures de grande taille, l'ovaire peut contenir quelques ovocytes au St3 qui vont dégénérer par atrésie (Fig. 2A).
<b>Repos sexuel</b>	Les ovaires ne contiennent que les ovocytes prévitellogéniques St1 et St2. L'ovaire contient plus d'ovocytes au St2 et moins de stroma ovarien que celui du stade juvénile (Fig. 2A).
<b>Début de la vitellogenèse</b>	Les ovocytes les plus avancés sont au stade de vitellogenèse primaire. Les ovocytes au stade St3 sont dominants dans la section ovarienne et représentent 50% du volume total de l'ovaire (Fig.2B).
<b>Vitellogenèse</b>	La coupe ovarienne est dominée par les ovocytes au début de vitellogenèse secondaire St4 (Fig. 2C) qui représente 60% du volume total. Ces St4 sont associés à des ovocytes prévitellogéniques et St3, qui comptent 23%.
<b>Ponte</b>	La structure histologique indique la présence des ovocytes en fin de vitellogenèse secondaire St5, avec un grand pourcentage (22,7%) ainsi que des ovocytes prévitellogéniques, St3 et St4 représentant ensemble 20% des ovocytes comptés (Fig. 2D).
<b>Post-ponte et récupération</b>	Les follicules post-ovulatoires indiquent qu'une ponte a eu lieu. Ces Fpo (Fig. 2E) représentent environ 8,1% des ovocytes dénombrés. Le reste des ovocytes atrétique est à différentes phases de dégénérescence. Chez la squille, l'intensification du phénomène de l'atrésie est le signe de la fin de la ponte et le début de la phase de récupération.

composé par des ovocytes de grandes tailles formant un lot qui se développe de façon synchrone et qui va être probablement émis durant la saison de ponte courante. Cependant, le deuxième groupe est hétérogène et composé de petits ovocytes à partir desquels le prochain lot va être recruté (Fig. 3). Ce dernier est composé d'ovocytes St3, qui ne participent pas à la saison de ponte courante et seront atrétiques durant le stade de post-ponte et de récupération, et des ovocytes pré-vitellogéniques qui devraient être pondus durant la nouvelle saison de ponte. L'ovulation synchrone observée durant cette étude suggère l'existence d'une pulsation rythmique de la maturation des ovocytes. Le lot homogène d'ovocytes qui sera pondus, est séparé des ovocytes pré-vitellogéniques dès le début du développement ovarien et depuis ces ovocytes suivent leur maturation de façon synchrone. Au total 7 types histologiques ovariens ont été isolés : les types 1 et 2 représentent les femelles juvéniles ou au repos sexuel ; les types 3 à 5 sont celles en vitellogenèse ; les types 6 et 7 sont celles en post ponte et récupération (Fig.3, Tableau II).

**Femelles juvéniles et au repos sexuel :** La plupart des femelles de petites tailles (inférieure à Lm50) échantillonnées ont des ovaires du type 1. Les ovaires des femelles matures pêchées entre le mois de septembre et novembre sont du type 2. Elles sont au repos sexuel et leurs ovaires ne présentent que des ovocytes prévitellogéniques des stades St1 et St2

(Fig. 3, Tableau II). L'augmentation de la fréquence relative des ovocytes au stade St2 indique la fin du repos sexuel (type 2).

**Femelles en vitellogenèse :** Le type 3 indiquant le début de la vitellogenèse est marqué par l'apparition des stades St3 et St4 avec une faible fréquence (Fig. 3, Tableau II). Ce type est observé chez les femelles capturées au mois de décembre. La distribution des fréquences ovocytaires est composée particulièrement par une population d'ovocytes dont le diamètre varie entre 100 µm et 170 µm et quelques St2 et St3 qui ne participeront pas durant la ponte courante (Fig.2). Cette phase correspond au recrutement du lot d'ovocytes qui sera émis durant la saison de ponte courante. Pour les femelles en vitellogenèse avancée, les ovaires des femelles du type 4 montrent des ovocytes de stade St5 avec une fréquence relativement faible. Ces derniers deviennent plus fréquents au cours de la vitellogenèse très avancée (type 5). En plus, les ovocytes hyalins font leur apparition. Les ovocytes présents peuvent être divisés en deux groupes. Un premier groupe formé par quelques ovocytes au St3 dont le diamètre ne dépasse pas 127 µm et un second groupe composé d'ovocytes de grande taille en début de vitellogenèse secondaire (St4) avec des diamètres de l'ordre de 170 µm (Fig. 3, Tableau II). Deux groupes d'ovocytes sont présents dans les ovaires des femelles en ponte associé au groupe des petits ovocytes au stade St3 et à ceux en fin de vitellogenèse secondaire (St5) dont leurs



Vi

**Figure 3 :** Cinétique de l’ovogénèse chez une femelle type de squille. FPO : Follicules post-ovulatoires ; Atr : Ovocytes atréiques.

**Tableau II :** Pourcentages des stades ovocytaires, des follicules post-ovulatoires (FPO) et des ovocytes atréiques (Atr) par type histologique ovarien au cours d’un cycle sexuel d’une femelle type de *Squilla mantis*.

Etape du Cycle	Repos sexuel		Vitellogénèse		Ponte	post-ponte et récupération	
	Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Type 5	Type 6	Type 7
St1	67,3	56,8	54,6	41,3	37,2	53,3	61,2
St2	32,7	43,2	37,7	24,5	21,4	25,2	28,3
St3			5,9	11,4	8,5	4,1	
St4			1,8	11,6	9,3	3,4	
St5				10,8	22,7	0,7	
St6					0,2		
Fpo						8,1	0,4
Atr				0,4	0,7	5,2	10,1
<b>Effectif</b>	34	45	62	52	89	57	41

diamètres sont de l'ordre de  $512 \pm 64,5 \mu\text{m}$  (Fig. 2). Cette structure ovarienne supporte l'hypothèse de la présence d'un seul lot d'ovocytes qui a évolué de façon homogène et synchrone durant le développement ovarien.

**Femelles en post-ponte et récupération :** La phase de post-ponte est caractérisée par la présence des follicules post-ovulatoires témoins d'une ponte antérieure. Cette phase est marquée par une fréquence relative importante des ovocytes atrétiques. Les ovaires en post-ponte et récupération sont observés chez les femelles échantillonnées aux mois de juin, de juillet et d'août. Au mois de juin et de juillet, seules les femelles âgées ont fini leurs pontes. A la fin de la période de ponte (type 6), la fréquence relative des ovocytes des stades St4 et St5 deviennent très faibles. Le type 7 caractérise les femelles en récupération. Dans les ovaires ayant ce type histologique, on ne rencontre que des ovocytes aux stades St1 et St2 et des ovocytes atrétiques avec une faible fréquence (Fig. 3, Tableau II).

En conclusion, l'augmentation de la fréquence des ovocytes atrétiques et la diminution de celle au stade St5 annoncent la fin de l'émission des gamètes. La fin de la période de ponte est caractérisée par l'augmentation de la fréquence des ovocytes atrétiques et la diminution de celle des stades St3, St4 et St5. Pendant la période de ponte, un seul lot d'ovocytes est émis et la fréquence relative des ovocytes au stade St5 chute juste après la ponte. La présence des follicules post ovulatoires et une faible fréquence des ovocytes à différents stades de développement qui tendent à être atrétiques permet d'affirmer que les squilles des eaux tunisiennes sont des espèces à ponte unique.

#### **Distributions des diamètres ovocytaires et stratégie de ponte**

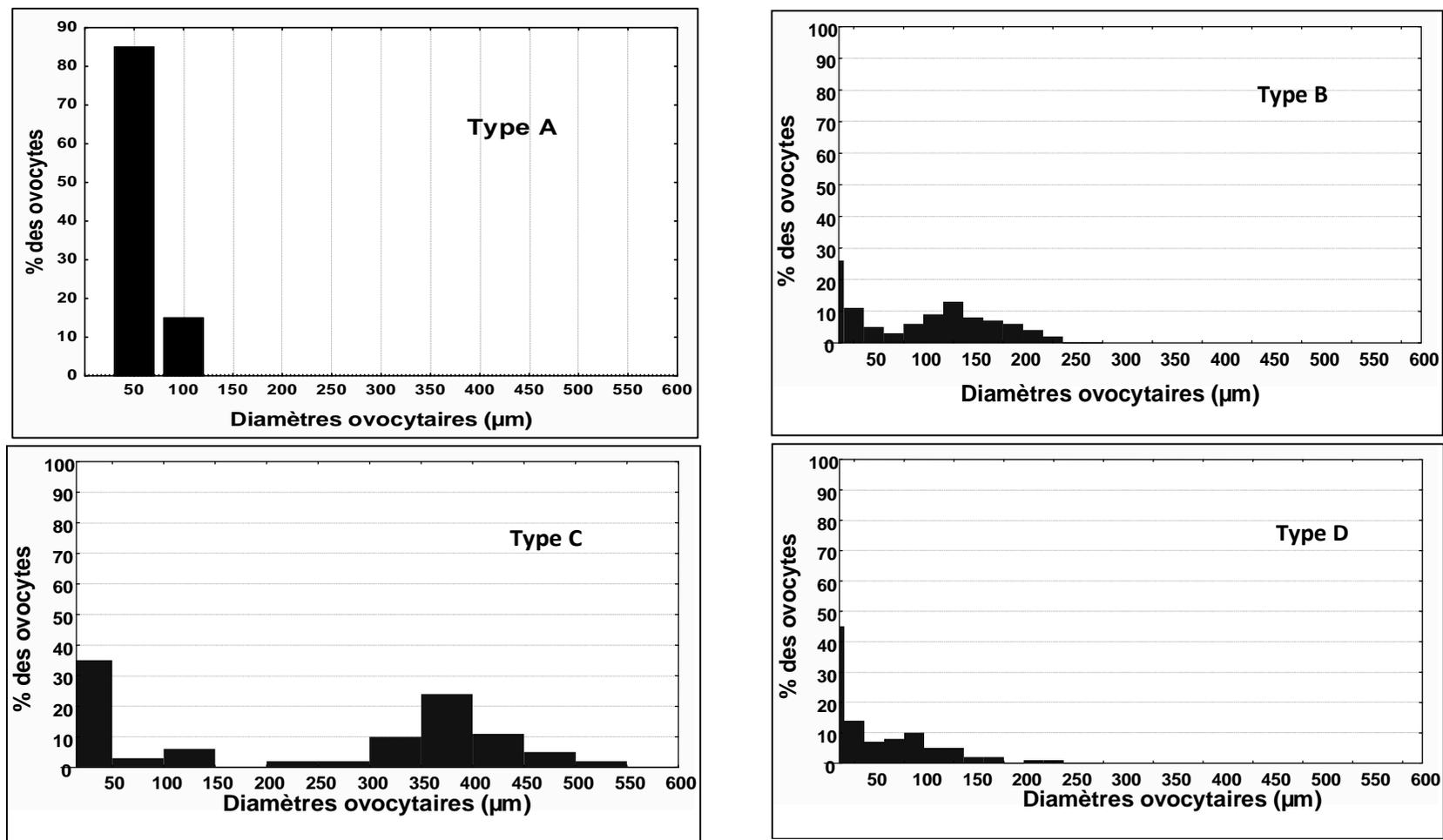
L'examen des diamètres ovocytaires de 380 ovaires échantillonnés a permis de distinguer 4 types de distributions. Le premier type de distribution est formé d'un seul mode (type A). Il est observable chez les femelles immatures et au repos sexuel. Le seul lot présent est composé d'ovocytes dont le diamètre est inférieur à  $0,5 \mu\text{m}$  (Fig. 4). Le deuxième type de distribution est bimodal (type B). Il est rencontré chez les femelles dont les ovaires sont en développement. Cette distribution est caractérisée par la présence d'un deuxième lot qui se détache du premier. Ce mode est composé d'ovocytes dont les diamètres s'étalent entre  $50 \mu\text{m}$  et  $250 \mu\text{m}$  (Fig. 4). Le troisième type de distribution (type C) peut être rencontré chez les femelles en ponte. Cette distribution se caractérise par la présence de deux lots d'ovocytes. Le lot le plus évolué est composé par des ovocytes ayant un diamètre qui varie de  $200 \mu\text{m}$  à  $550 \mu\text{m}$  (Fig. 4). Le lot le moins évolué est formé par des ovocytes prévitellogéniques et de quelques ovocytes en

vitellogenèse primaire et secondaire. Un hiatus apparaît entre les deux lots d'ovocytes, ce qui témoigne que *Squilla mantis* est une espèce à ponte unique par année. Le recrutement des ovocytes vitellogéniques est donc discontinu. Le quatrième type de distribution est observé chez les femelles en post-ponte et en récupération (type D). Le lot le plus avancé est pondu, il ne reste dans l'ovaire que les ovocytes prévitellogéniques et quelques ovocytes en vitellogenèse dont les diamètres ne dépassent pas  $250 \mu\text{m}$  (Fig.4). Chez certaines femelles, on peut rencontrer des ovocytes ayant des diamètres supérieurs à  $100 \mu\text{m}$  à la fin de la vitellogenèse secondaire qui vont devenir atrétiques. Le phénomène d'atrésie empêche les ovocytes restant dans les ovaires d'accomplir leur développement. En résumé, au cours d'un cycle sexuel, les distributions des diamètres ovocytaires chez les squilles tunisiennes passent successivement par les types A, B, C et D. Chez toutes les femelles en pré-ponte et en ponte, un seul lot d'ovocytes vitellogéniques est isolé du reste des ovocytes. On peut donc classer *Squilla mantis* parmi les espèces à ponte unique et par la suite à fécondité annuelle déterminée.

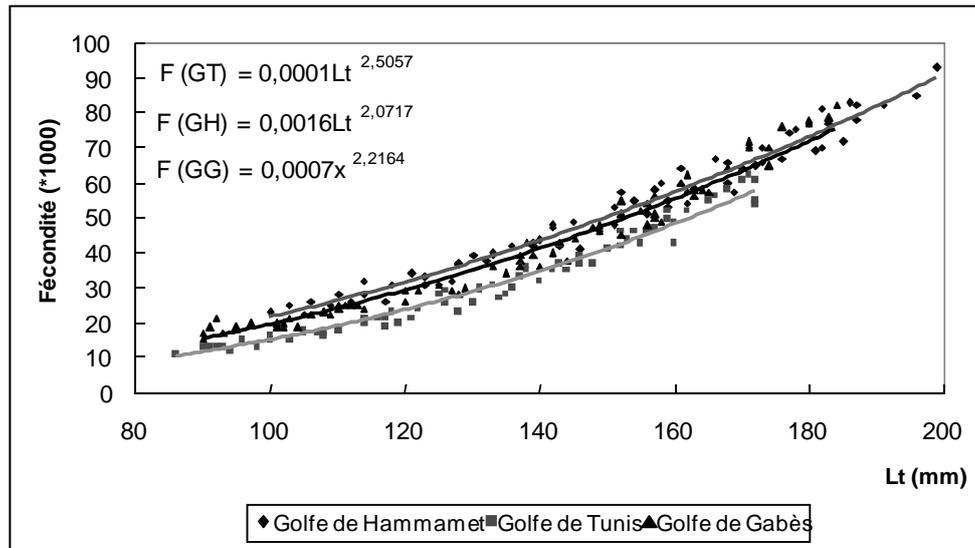
#### **Fécondité**

L'évaluation de la fécondité individuelle chez cette espèce à ponte unique peut être exprimée par la fécondité annuelle qui correspond au nombre d'ovocytes vitellogéniques chez les femelles en vitellogenèse avancée et en ponte (MILI, 2013). Les femelles sont rangées dans un intervalle de longueur totale de 83 à 198 mm englobant presque toute la gamme de taille des femelles adultes participant à la ponte. La plus petite femelle ayant une longueur totale de 83 mm présente une fécondité de l'ordre de 12.250, alors que la plus grande femelle productive (91.620 œufs) a mesuré 198 mm (Fig. 5). Pour toutes les femelles ayant un lot d'ovocytes individualisé, soit 203, les relations reliant la fécondité absolue à la longueur totale ont été déterminées (Fig. 5). Pour toutes les régions, *S. mantis* se caractérise par une grande variabilité de la fécondité absolue, la variation peut atteindre 2.000 ovocytes au sein d'une même classe de taille (Fig. 5). La fécondité absolue évolue proportionnellement moins vite que le cube de la longueur totale dans les trois golfes de cette étude. Toutes les corrélations sont hautement significatives et les coefficients de corrélation sont tous peu différents de 0,9 (Fig. 5).

En utilisant le test de Bartlett, la comparaison entre les fécondités absolues des squilles pêchées dans les golfes de Tunis, de Hammamet et de Gabès a montré une homogénéité des variances ( $B_{\text{corr}}=2,353 > X^2=3,84$ ) à un intervalle de confiance de 95%. De ce fait, on a poursuivi la comparaison en analysant la covariance. La comparaison des pentes des droites logarithmiques de la fécondité en fonction



**Figure 4 :** Distribution des diamètres ovocytaires chez *Squilla mantis* durant les principales étapes du cycle sexuel. Type A : repos sexuel ; Type B : développement ovarien ; Type C : ponte ; Type D : post-ponte et récupération.



**Figure 5 :** Relations taille-fécondité absolue chez la femelle de *S. mantis* pêchées dans les golfes de Tunis, de Hammamet et de Gabès.

de la longueur des squilles a montré qu'au moins deux pentes différentes significativement entre elles ( $F_{obs}=20,118 > F_{thor}=3,84$ ) à un intervalle de confiance de 95%. Donc, les squilles tunisiennes ont des fécondités absolues significativement différentes entre les trois golfes. Dans l'intervalle de la classe de taille 83-198 mm de Lt qui couvre la plupart des classes de taille des femelles matures dans la population des squilles tunisiennes, la fécondité relative calculée se range entre 1165 œufs/g et 2181 œufs/g de squilles avec une moyenne de  $1618 \pm 632$  d'œufs/g de squilles.

## DISCUSSION

L'étude de la biologie des Stomatopodes de la Méditerranée a débuté dès 1910 avec les travaux de Giesbrecht. Et depuis, les investigations se sont multipliées et elles ont presque touchées à tout les aspects relatifs à l'écobiologie de cette espèce (Abelló et Martín (1993); Abelló et Sardá (1989); Do Chi, (1975, 1978); Ferrero et *al.*, (1988). Giovanardi et Piccinetti-Manfrin (1983); Maynou et *al.*, (2005); Piccinetti et Piccinetti-Manfrin (1970); Ragonese et *al.*, (2012)). Cependant, aucune étude ciblant l'histologie des ovaires des femelles de squille *Squilla mantis* n'a été réalisée auparavant en Méditerranée. Donc, ce travail est le premier qui s'intéresse à cet aspect de la reproduction et qui permet de vérifier les résultats obtenus suite à l'étude des aspects macroscopiques de la reproduction. Il est à noter que nos résultats sont comparables à ceux obtenus par Kodama et *al.*, (2004) qui a étudié la

reproduction chez une autre espèce de squille (*Ortosquilla oratoria*) au Japon. Ces auteurs ont divisé le cycle de développement ovocytaire au cours de l'ovogénèse en 8 stades en plus des follicules post ovulatoires et des ovocytes atrétiques pour vérifier les différentes phases du cycle sexuel de cette espèce et qui sont déjà déterminées macroscopiquement. Cependant, ces auteurs ont identifié 6 structures ovariennes tout le long du cycle sexuel de cette espèce. De plus, Frogli (1996) affirme qu'au centre de l'Adriatique, le pic de la maturité ovarienne est observé en février et mars où plus que 80% des femelles ont des ovaires matures. Ainsi, les femelles en post ponte sont rencontrées essentiellement entre avril et septembre dans cette région. L'utilisation des marqueurs biochimiques pour le suivi de la vitellogenèse a montré que la saison de ponte des squilles italiennes s'étale entre le mois de mai et le mois d'août pour entrer ensuite en phase de repos sexuel en septembre, alors que le début de la maturation est observé en hiver (Ferrero et *al.*, 1988). Ces auteurs signalent l'existence d'un léger décalage dans la détermination de la période de la maturation sexuelle en utilisant tous les indicateurs tel que le développement des glandes cémentaires, les stades macroscopiques de maturité ovarienne et les marqueurs biochimiques (Ferrero et *al.*, 1988). Ceci peut être expliqué par le fait que le cycle sexuel peut être influencé par les facteurs environnementaux (essentiellement la température), les facteurs tropiques qui peuvent agir sur l'ovogénèse, ainsi que le taux de croissance et le recrutement des juvéniles. La fécondité de *S. mantis* a été estimée pour la première fois par GIESBRECHT (1910) et depuis

aucune étude ne s'est intéressée à ce paramètre biologique. Cet auteur signale que l'amas des œufs pondus peut dépasser 14 cm de long avec une fécondité de l'ordre de 50000 œufs par femelle. En revanche, *Ortosquilla oratoria* des eaux japonaises se reproduit une seule fois par an et sa fécondité est variable selon la longueur de l'individu (moyenne de 55700 œufs/an) (KODAMA *et al.*, 2004).

## CONCLUSION

En conclusion, l'étude microscopique de la reproduction des squilles femelles des eaux tunisiennes confirme bien les résultats trouvés lors de l'étude macroscopique. Le cycle reproducteur de *Squilla mantis* s'étale de décembre à août avec une seule ponte par femelle et par an. Les squilles des eaux tunisiennes possèdent donc une seule période de reproduction au cours de l'année, située entre avril et septembre dans les trois régions de cette étude. Durant toute l'année, les femelles immatures sont plus représentées dans les captures issues du golfe de Gabès plus que des autres régions. Donc, les trois golfes (Tunis, Hammamet et Gabès) représentent des zones de frayères et de nurseries pour la squille *Squilla mantis*.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abelló P. and Martín P., 1993. - Fishery dynamics of the mantis shrimp *Squilla mantis* (Crustacea: Decapoda) population off the Ebro Delta (northwestern Mediterranean). *Fish. Res.*, 16: 131-145.
- Abelló P. and Sardá F., 1989. - Some observations on the biology and fishery of *Squilla mantis* L. in the Catalan area (NW Mediterranean). In: E. A. Ferrero (Mucchi Ed., Modena), *Biology of Stomatopods*, 229 -239.
- Carson F. L., 1990. - Histology, A Self-Instructional Text pp. 142-144, and Plate 8-4.
- Deecaraman M. and Subramoniam T., 1983. - Synchronious developpement of the ovary and the femele accesory sex glands of a crustacean, *Squilla holoschista*. *Proc Indian Acad. Sci. Anim Sci.*, 92: 179-184.
- Do Chi T., 1975. - Biométrie de la reproduction de *Squilla mantis* (L.) (Crustacé Stomatopode) dans le golfe d'Aigues-Mortes (Méditerranée noroccidentale). *Pubbl. Staz. Zool. Napoli.*, 39: 114-139.
- Do chi T., 1978 - Modèles cinétiques et structuraux en dynamique des populations exploitées. Application aux squilles, *Squilla mantis* (L.) (Crustacé Stomatopode) du golfe de Lion. *Thèse de Doctorat d'Etat de l'Université de Montpellier*.
- Ferrero E. A., Marzari R., Mosco A. and Riggio D., (1988). - Dynamics of morphometric and biochemical parameters of the reproductive conditions of *Squilla mantis* fished by creels in the Gulf of Trieste. Use of VTGs as biochemical markers. *Boll. Soc. Adriatica Sci.*, 70: 47-59.
- Froglià C., 1996. - Growth and behaviour of *Squilla mantis* (mantis shrimp) in the Adriatic Sea. *Final Report. EU Study DG XIV/MED/93/016*.
- Gaamour A. 1999. - La sardinelle ronde *Sardinella aurita* dans les eaux tunisiennes : Reproduction, Croissance et Pêche dans la région du Cap Bon. *Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale*, 246 pp.
- Giesbrecht W., 1910. - « Stomatopoda » Fauna und Flora des Golfes von Neapel. *Friedländer & So. Verlag, Berlin. Monographie*, 33: 1-239
- Giovanardi C. and Piccinetti-Manfrin G., 1983. - Summary of biological parameters of *Squilla mantis* L. in the Adriatic Sea . *FAO Fish. Rep.* 290:131-134.
- Kodama K., Shimizu T., Yamakawa T. and Aoki I., 2004. - Reproductive biology of the female Japanese mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* (Stomatopoda) in relation to changes in the seasonal pattern of larval occurrence in Tokyo Bay, Japan. *Fisheries Science*, 70: 734-745.
- Le Duff M., 1997. - Cinétique de l'ovogenèse et stratégies de ponte chez les poissons Téléostéens en milieu tempéré. *Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale. France*, 170 pp.
- Martoja R. & Martoja M., 1967. - Initiation aux techniques de l'histologie animale. *ed Masson, Paris*.
- Maynou F., Abelló P. and Sartor P., 2005. - A review of the fisheries biology of the mantis shrimp, *Squilla mantis* (L., 1758) (Stomatopoda, Squillidae) in the Mediterranean. *Crustaceana*, 77: 1081-1099.
- Mili S., 2013. - La squille *Squilla mantis* des eaux tunisiennes : Eco-biologie, pêche et opportunités de valorisation. *Thèse de Doctorat de l'Institut National Agronomique de Tunisie*, 195pp.
- Piccinetti C. and Piccinetti-Manfrin G., 1970. - Osservazioni su alcuni aspetti della biologia di *Squilla mantis* L. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, 38: 119-124.
- Ragonese S., Morara U., Canali E., Pagliarino E. and Bianchini M.L., 2012. - Abundance and biological traits of the spot-tail mantis shrimp, *Squilla mantis* (L., 1758) (Crustacea: Stomatopoda), off the southern coast of Sicily. *Cah. Biol. Mar.*, 53: 485-493.

Rjeibi O., 2012. - Biologie et Dynamique des Populations de la langouste rouge *Palinurus elephas* pêchée sur les côtes Nord de la Tunisie. *Thèse de Doctorat de l'Institut National Agronomique de Tunis*, 277 pp.

Wortham-Neal J. L., 2002. - Reproductive morphology and biology of male and female mantis shrimp (Stomatopoda: Squillidae). *Jour. of crust. Biol.*, 22(4) : 728-741.

