



HAL
open science

**Sources de variation de la forme des otolithes :
Implications pour la discrimination des stocks de
poissons**
Kélig Mahé

► **To cite this version:**

Kélig Mahé. Sources de variation de la forme des otolithes : Implications pour la discrimination des stocks de poissons. Ecologie, Environnement. Université du Littoral Côte d'Opale, 2019. Français. NNT : 2019DUNK0539 . tel-02478194

HAL Id: tel-02478194

<https://theses.hal.science/tel-02478194v1>

Submitted on 13 Feb 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat
Université du Littoral Côte d'opale
**École doctorale – Sciences de la Matière, du Rayonnement et de
l'Environnement**

Pour obtenir le grade de
Docteur en sciences et technologies
Spécialité : AGRONOMIE, PRODUCTIONS ANIMALE ET VEGETALE,
AGROALIMENTAIRE
Biologie de l'environnement, des populations, écologie

**Sources de variation de la forme des otolithes:
Implications pour la discrimination des stocks
de poissons**

présentée et soutenue par

Kélig MAHE

Le 5 Décembre 2019

devant le jury composé de :

Françoise DAVERAT	Chercheure, IRSTEA, Bordeaux	Rapporteur
Mireille HARMELIN-VIVIEN	Directrice de Recherche, Institut Méditerranéen d'Océanologie/CNRS, Marseille	Rapporteur
Laurent CHAUVAUD	Directeur de Recherche, IUEM/CNRS, Brest	Examineur
Elise DUFOUR	Maître de conférences, MHNH/CNRS, Paris	Examineur
Matthias VIGNON	Maître de conférences, INRA, Université de Pau et Pays d'Adour, Anglet	Examineur
Fabien MORAT	Ingénieur de Recherche, Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de l'Environnement /CNRS, Perpignan	Invité
Bruno ERNANDE	Chercheur, IFREMER, Boulogne sur Mer	Responsable scientifique
Rachid AMARA	Professeur, Université du Littoral Côte d'Opale, Wimereux	Co-directeur de thèse
Hélène de PONTUAL	Chercheure, IFREMER, Brest	Directrice de thèse

« Quiconque arrête d'apprendre, à vingt ou quatre-vingts ans, devient vieux. Celui qui continue d'apprendre reste jeune. Dans la vie, le plus beau est de rester jeune d'esprit. »

Henri Ford

Avant-propos

Cette thèse s'est déroulée dans un contexte particulier. Après 12 ans à l'Ifremer comme ingénieur, l'IFREMER m'a permis de réaliser une thèse. Celle-ci s'est déroulée en 3 ans dans les mêmes conditions, ou presque, qu'un étudiant standard. Il y a quand même quelques subtilités qui font que le contexte est très particulier. Ainsi, j'ai pu écrire mon propre sujet et choisir mes encadrants. C'est le côté génial lorsqu'on est un jeune étudiant de 40 ans. D'autre part, étant responsable d'une équipe, ils m'ont tous aidé en particulier en réalisant tout le travail technique (expérimentations, acquisitions d'images...). A l'inverse, j'ai maintenu toutes mes tâches de responsable du pôle national de Sclérochronologie, de coordinateur national des paramètres biologiques... et bien d'autres tâches qui m'ont aussi occupé une partie de mon temps.

Résumé

L'évaluation et la gestion des populations de poissons se basent sur l'utilisation d'unités de gestion appelées « stocks halieutiques ». Pour discriminer ces stocks, la forme des otolithes, pièces calcifiées de l'oreille interne des poissons, peut être utilisée. Dans ce contexte, cette thèse s'est consacrée premièrement à l'étude de la variabilité spatio-temporelle de la forme des otolithes chez 3 espèces de poissons présentant des caractéristiques écologiques (taille, vitesse de nage, comportement dans la colonne d'eau, etc.) et des environnements biogéographiques différents. Les résultats montrent qu'il existe un gradient structurel décroissant de taille des stocks allant des espèces de grands pélagiques aux espèces démersales. Ceci est lié au fait que certaines espèces démersales comme la bogue (*Boops boops*) sont contraintes par la présence de barrières géographiques et de fronts hydrologiques ce qui n'est pas le cas chez les espèces pélagiques analysées (merlan bleu, *Micromesistius poutassou* ; Espadon, *Xiphias gladius*). Dans un deuxième temps, nous avons testé les effets de facteurs confondants potentiels (e.g. l'asymétrie bilatérale directionnelle, AD) sur le pouvoir discriminant de la forme des otolithes. Ainsi, nous avons montré qu'il existe chez la bogue une AD, induite par un processus de latéralisation et qui varie en amplitude et en direction selon la zone géographique étudiée. Chez la bogue, cette AD impacte les résultats d'identification des stocks par la forme qui changent en fonction de l'otolithe, droit ou gauche, utilisé. Si la forme de l'otolithe est utilisée pour discriminer les stocks halieutiques, c'est parce qu'elle reflète en particulier les conditions environnementales qu'a subi le poisson au cours de sa vie. Ainsi, dans la troisième partie de la thèse, nous avons analysé, en conditions contrôlées, les effets de la température et du taux d'acides gras polyinsaturés omega-3 (n-3 AGPI) contenus dans l'alimentation sur la morphogenèse des otolithes de bars (*Dicentrarchus labrax*). Après la naissance, deux étapes peuvent être distinguées dans l'ontogenèse de la forme de l'otolithe avec en premier lieu un allongement qui traduit une croissance moins rapide de l'axe dorso-ventral par rapport à l'axe antéro-postérieur. Il s'en suit des modifications plus localisées avec en particulier une complexification de la zone comprise entre le rostre et l'anti-rostre a priori essentiellement liée au facteur thermique. A l'inverse, le taux de n-3 AGPI ne semble pas influencer la morphogenèse de l'otolithe. L'utilisation des degrés-jours de croissance (GDD) a permis de montrer que l'effet de la température est bien d'accélérer la morphogenèse, mais aussi de changer sa trajectoire: à valeur de GDD fixe, pour 2 températures données, les formes diffèrent. L'ensemble des résultats acquis lors de cette thèse valident l'utilisation de la forme des otolithes pour discriminer les stocks de poissons, mais souligne également le besoin de connaître précisément les sources de la variabilité morphologique des otolithes intra-stock pour pouvoir déterminer plus précisément les limites des stocks halieutiques.

Mots clés

Otolithe, forme, stock halieutique, descripteurs de Fourier, température, acides gras, asymétrie directionnelle, degrés-jours de croissance

Abstract

The assessment and management of fish populations is based on the use of management units called fish stocks. The shape of otoliths, calcified structures of the fish's inner ear, can be used to discriminate these stocks. First, this thesis focuses on the study of the spatio-temporal variability of the otolith's shape for three fish species with different ecological characteristics (size, swimming speed, behaviour in the water column, etc.) and biogeographical environments. The results showed that there is a decreasing structural gradient across stock sizes from large pelagic species to more localised demersal species. This is linked to the fact that some demersal species such as the bogue (*Boops boops*) are constrained by the presence of geographical barriers and hydrological fronts, which is not the case for the analysed pelagic species (blue whiting, *Micromesistius poutassou*; swordfish, *Xiphias gladius*). Secondly, we tested the effects of potential confounding factors (e. g. bilateral directional asymmetry, DA) on the discriminating power of an otolith's shape. We have shown that there is a DA for bogue, induced by the lateralisation process, which varies in amplitude and direction according to the geographical area. In the bogue, this DA impacts stock identification by otolith shape, which changes according to which otolith is used (i.e. right or left). Otolith shape is useful to discriminate among fish stocks because it reflects the specific environmental conditions that fish have experienced during their lifetime. Finally, in the third part of the thesis, we analyzed, under controlled conditions, the effects of temperature and the diet content of omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) on otolith morphogenesis for seabass (*Dicentrarchus labrax*). After emergence, two phases can be distinguished in the ontogenesis of otolith shape with an initial elongation that reflects slower growth of the dorso-ventral axis compared to the antero-posterior axis. This leads to more localized modifications, in particular, in a more complex area between the rostrum and the anti-rostrum, which is clearly linked to the thermal regime. Conversely, the percentage of n-3 PUFAs does not appear to influence otolith morphogenesis. The use of growing degree days (GDD) has shown that the effect of temperature is to accelerate morphogenesis, but also to change its trajectory: at a fixed GDD value, for two given temperatures, the shapes differ. All the results obtained in this thesis validate the use of the otolith shape to discriminate fish stocks, but also emphasize the need to know the precise sources of morphological variability of intra-stock otoliths in order to determine more precisely the limits of fish stocks.

Key-words

Otolith, shape, fish stock, Fourier descriptors, temperature, fatty acids, directional asymmetry, growing degree days

Remerciements

Cette partie de la thèse est la plus libre mais aussi la plus difficile car si à mes 40 ans j'ai pu réaliser ce travail, c'est grâce à une foultitude de personnes qui m'ont aidé, conseillé ou soutenu. Cette thèse n'est pas que le fruit de 3 ans de travail, c'est une étape dans ma vie de chercheur et donc en rédigeant ces remerciements, je me dois de revenir sur les étapes scientifiques et humaines durant mes 40 premières années et qui m'ont façonné brique par brique mais je peux avoir la mémoire qui flanche...

Je me rappelle des profs passionnés par leur travail et qui ont su m'ouvrir l'esprit pour savoir ce que je voulais faire dans ma vie, le premier d'entre eux étant mon père, prof de physique un peu fou... Ensuite, j'ai appris énormément lors de mes stages avec des encadrants qui sont bien plus à mes yeux car j'ai eu la chance d'avoir côtoyé des scientifiques qui m'ont beaucoup aidé et n'ont pas compté leur temps... Ainsi, j'ai une énorme pensée à Jeannine Person-Le Ruyet, Nicolas Le Bayon, Sylvain Duhamel et Gwenola De Roton. Après ces années universitaires, j'ai pu embarquer pendant près de 2 ans avec des pêcheurs pro pas toujours faciles au début mais super attachants à la fin sur des bateaux de 11 à 54 m. Ces patrons et matelots avec leurs valeurs m'ont définitivement ouvert les yeux sur ma volonté d'être scientifique des pêches et sur les raisons de le faire. A la suite de ce parcours, j'ai pu entrer et travailler à l'Ifremer depuis 12 ans maintenant, il y a beaucoup de collègues et de scientifiques avec qui j'ai collaboré et appris, je pense en particulier à Robert Bellail, André Carpentier, Jean Paul Delpech, André Ogor, Christian Dintheer, Paul Marchal, Jérôme Bourjea et beaucoup d'autres. Je pense aussi à mon équipe du pôle de Sclérochronologie sans qui je n'aurais jamais pu réaliser ce travail. Je n'oublie pas non plus les équipes des plateformes expérimentales de Pallavas et de Brest avec en particulier Frédéric Clota, Marie Odile Blanc, Béatrice Chatain, Clémence Gourtay et José Luis Zambonino-Infante sans qui

les études expérimentales n'auraient pas été faisables. Il y a aussi bien d'autres personnes qui m'ont soutenu, aidé, supporté mais la liste serait tellement longue que je ne préfère pas me risquer à la commencer de peur d'en oublier.

Après plusieurs années de réflexion, j'ai demandé à 3 scientifiques s'ils accepteraient de me codiriger durant ces 3 années de thèse. Ce n'est pas un choix par hasard car sans leur participation, je ne pense pas que je me serais impliqué dans cet exercice car ils ont une place particulière dans mon chemin de vie scientifique et dans mon cœur. Ainsi, j'adresse un immense merci à Hélène de Pontual, Rachid Amara et Bruno Ernande. Je profite également pour remercier tout mon jury (Mireille Harmelin-Vivien, Françoise Daverat, Laurent Chauvaud, Matthias Vignon, Elise Dufour et Fabien Morat) qui a accepté de prendre de leur temps pour évaluer ce travail malgré leur emploi du temps très chargé.

Enfin parmi toutes les personnes qui ont contribué à la réussite de cette thèse, il y a les trois plus importantes dans ma vie : que sont ma femme, Sylvie, mon fils, Mathis (4 ans) et ma fille Axelle (1 an) qui savent m'apporter tout le bonheur et la sérénité nécessaire à cette thèse.

Table des matières

1	INTRODUCTION GÉNÉRALE	13
1.1	Gestion des ressources halieutiques	13
1.2	Concept de stock halieutique	15
1.3	Méthodes d'identification des stocks.....	18
1.4	Otolithe, outil d'identification de stock	24
1.5	Etat des connaissances sur les processus de biominéralisation des otolithes.....	28
1.6	Facteurs et processus potentiels pouvant affecter la forme des otolithes.....	32
1.6.1	Facteurs qui influencent la forme de l'otolithe	32
1.6.2	Processus de régulation développementale	35
1.6.3	Asymétrie bilatérale de forme et lien avec le développement.....	37
1.7	Revue des méthodes d'extraction de l'information contenue dans la forme des otolithes	39
1.8	Objectifs de la thèse.....	45
1.9	Choix des modèles biologiques	51
1.9.1	Merlan bleu (<i>Micromesistius poutassou</i>)	52
1.9.2	Espadon (<i>Xiphias gladius</i>)	53
1.9.3	Bogue (<i>Boops boops</i>).....	53
1.9.4	Bar commun (<i>Dicentrachus labrax</i>)	54
2	CHAPITRE I : VARIATIONS SPATIO-TEMPORELLES DE LA FORME DES OTOLITHES	55
2.1	Introduction générale du Chapitre I.....	55
2.2	Etude 1 : Identifying blue whiting (<i>Micromesistius poutassou</i>) stock structure in the Northeast Atlantic by otolith shape analysis	57
2.2.1	Abstract	57
2.2.2	Résumé.....	57
2.2.3	Introduction.....	58
2.2.4	Materials and methods	61
2.2.4.1	Sample collection	61
2.2.4.2	Otolith shape analysis.....	61
2.2.4.3	Statistical analyses.....	64
2.2.5	Results.....	66
2.2.6	Discussion	72
2.3	Etude 2 : Otolith shape as a valuable tool to evaluate the stock structure of swordfish <i>Xiphias gladius</i> in the Indian Ocean.....	77
2.3.1	Abstract	77

2.3.2	Keywords	77
2.3.3	Introduction	78
2.3.4	Material and methods	80
2.3.4.1	Sample collection	80
2.3.4.2	Otolith shape analysis	82
2.3.4.3	Statistical analyses	83
2.3.5	Results	84
2.3.6	Discussion	88
2.3.7	Conclusion	91
2.4	Synthèse du chapitre I	92
3	CHAPITRE II : EFFET DE L'ASYMÉTRIE DES OTOLITHES SUR L'IDENTIFICATION DE STOCK	93
3.1	Introduction générale du Chapitre II	93
3.2	Etude 3 : Directional bilateral asymmetry in otolith morphology may affect fish stock discrimination based on otolith shape analysis	95
3.2.1	Abstract	95
3.2.2	Keywords	95
3.2.3	Introduction	96
3.2.4	Materials and methods	99
3.2.4.1	Sample collection	99
3.2.4.2	Otolith shape analysis	101
3.2.4.3	Statistical analyses	102
3.2.5	Results	104
3.2.5.1	Directional asymmetry in otolith shape	104
3.2.5.2	Fine-grained geographical structuring of otolith shape	107
3.2.5.3	Clustering on otolith shape	108
3.2.5.4	Stock structure inferred from otolith shape	109
3.2.6	Discussion	111
3.2.6.1	Effect of confounding factors on the otolith shape	111
3.2.6.2	Directional bilateral asymmetry in otolith shape	112
3.2.6.3	Stock structure of bogue in the Mediterranean Sea and the Atlantic Ocean	114
3.2.7	Données supplémentaires	117
3.3	Synthèse du chapitre II	120
4	CHAPITRE III : EFFET DE FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR L'ANALYSE DE FORME DES OTOLITHES TESTÉS EN MILIEU CONTRÔLÉ ..	121
4.1	Introduction générale du Chapitre III	121

4.2 Etude 4 : Do environmental conditions (temperature and food composition) affect otolith shape during fish early-juvenile phase? An experimental approach applied to European Seabass (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	123
4.2.1 Graphical abstract	123
4.2.2 Abstract	123
4.2.3 Highlights	124
4.2.4 Keywords	125
4.2.5 Introduction	125
4.2.6 Materials and methods	127
4.2.6.1 Fish and rearing conditions	127
4.2.6.2 Experimental design	128
4.2.6.3 Otolith shape analysis and measures	130
4.2.6.4 Statistical analyses	132
4.2.6.4.1 Directional bilateral asymmetry in otolith shape	132
4.2.6.4.2 Temperature and food composition effects on otolith morphogenesis	133
4.2.7 Results	135
4.2.7.1 Directional bilateral asymmetry (DA) in otolith shape	135
4.2.7.2 Temperature and food composition effects on otolith morphogenesis	136
4.2.8 Discussion	142
4.2.8.1 Directional bilateral asymmetry in seabass otolith	142
4.2.8.2 Effect of dietary n-3 PUFA concentration on otolith morphogenesis	143
4.2.8.3 Growing Degree Day is good proxy to represent temperature effect on otolith morphogenesis	144
4.2.8.4 Effect of water temperature on the somatic growth and otolith shape	145
4.2.9 Conclusion	147
4.2.10 Données supplémentaires	148
4.3 Etude 5 : Otolith morphogenesis during the early life stages of fish is temperature-dependant: validation by experimental approach applied to European Seabass (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	152
4.3.1 Graphical abstract	152
4.3.2 Abstract	152
4.3.3 Keywords	153
4.3.4 Introduction	153
4.3.5 Materials and methods	156
4.3.5.1 Experimental Design	156
4.3.5.2 Otolith shape analysis and measures	158
4.3.5.3 Statistical analyses	160
4.3.5.3.1 Directional asymmetry	160
4.3.5.3.2 Temperature effect on the otolith shape	160
4.3.6 Results	162
4.3.6.1 Ontogenic effect	162

4.3.6.2	Temperature effect.....	164
4.3.7	Discussion.....	166
4.3.7.1	Ontogenic effect	166
4.3.7.2	Temperature effect.....	168
4.3.8	Données supplémentaires.....	171
4.4	Synthèse du chapitre III.....	173
5	DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	174
5.1	Limites méthodologiques liées à l'extraction de l'information contenue dans la forme de l'otolithe pour identifier les stocks ?	174
5.1.1	Différence entre approches univariées et multivariées pour décrire et analyser la forme de l'otolithe 174	
5.1.2	Quels sont les descripteurs elliptiques de Fourier normalisés à utiliser ?	175
5.2	Peut-on utiliser la forme des otolithes comme outil d'identification de stocks pour un ensemble d'espèces dans différents environnements biogéographiques ? (Objectif 1).....	177
5.2.1	Identification d'un gradient géographique de structuration des stocks des espèces de grands pélagiques aux espèces démersales	177
5.2.2	La variabilité inter-espèces de la forme des otolithes est liée à leur adaptation fonctionnelle	181
5.3	Y a-t-il des facteurs confondants à prendre en compte dans l'utilisation de l'analyse de forme des otolithes pour l'identification des stocks halieutiques ? (Objectif 2).....	183
5.3.1	Quelles sont les échelles spatiales et/ou temporelles à utiliser?.....	184
5.3.2	Variabilité intra-individu mesurable par l'asymétrie directionnelle	185
5.4	Quels sont les effets de la température et du taux d'acides gras polyinsaturés oméga-3 sur la forme de l'otolithe ? (Objectifs 3 et 4)	188
5.4.1	Connaître et évaluer les effets environnementaux	188
5.4.2	Utilisation des Degrés-Jour de Croissance pour suivre l'effet de la température.....	190
5.4.3	Effet du facteur température	191
5.4.4	Effet du taux d'acides gras polyinsaturés oméga-3 dans l'alimentation	193
5.5	Synthèse des effets cumulés sur la forme des otolithes	195
5.6	Perspectives.....	197
5.6.1	Besoins en développement de la recherche sur les mécanismes de biomérialisation de l'otolithe et ses sources de variabilité	198
5.6.2	Nouveaux développements pour analyser la forme des otolithes.....	200
5.6.3	Utilisation de l'asymétrie directionnelle comme outil potentiel de discrimination des stocks.....	201
6	LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	203
7	LISTE DES ACRONYMES ET ABRÉVIATIONS.....	214
8	REFERENCES	217
	ANNEXE I : LISTE DES PUBLICATIONS AU COURS DE LA THÈSE.....	252

ANNEXE II : LISTE DES PRÉSENTATIONS LORS DE COLLOQUES AU COURS DE LA THÈSE 257

9 ANNEXE III : UTILISATION DE L'ASYMÉTRIE COMME POTENTIEL OUTIL DE DISCRIMINATION DES STOCKS 259

9.1 Introduction259

9.2 Materials and methods261

9.2.1 Sample collection261

9.2.2 Otolith shape analysis264

9.2.3 Statistical analyses265

9.3 Results.....266

9.4 Discussion269

Introduction générale

1.1 Gestion des ressources halieutiques

D'après les estimations de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), la population mondiale devrait atteindre les 9 milliards au milieu du 21^{ème} siècle (FAO, 2018). Ainsi, la demande en nourriture ne cesse de croître et, de ce fait, la pression sur la production aquacole et la pêche est très importante. A cette tendance, s'ajoutent les effets du changement climatique dont l'une des principales conséquences est l'augmentation de la température de surface des océans de 1 à 7°C d'ici à 2100 selon les modèles de projection climatique utilisés (IPCC, 2014 et les dernières communications du CEA datant de septembre 2019). La pêche contribue de manière vitale à l'approvisionnement alimentaire de la population mondiale en protéines animales et acides gras (oméga 3 en particulier). En 2015, 17% des protéines animales et 7% de l'ensemble des protéines consommées dans le monde provenaient uniquement d'espèces de poissons (FAO, 2018). De même, les poissons de mer sont la première source naturelle d'acides de type gras oméga 3 à longue chaîne qui participent en particulier au bon développement visuel et cognitif de l'enfant (Beveridge *et al.*, 2013 ; Roos, 2016). En conséquence, un développement durable¹ des activités de pêche a été recherché avec la mise en place d'une gestion selon le principe de précaution, en adaptant les activités de pêche aux fluctuations naturelles des populations de poissons exploitées afin d'éviter leur effondrement comme ce fut le cas pour la morue (*Gadus morhua*) au large de Terre-Neuve au siècle dernier (FAO, 1995). Cette gestion des pêches repose sur une

¹ Le développement durable a été défini comme la gestion et la conservation des ressources naturelles et l'orientation des changements technologiques et institutionnels de manière à assurer la satisfaction continue des besoins humains pour les générations présentes et futures. Un tel développement préserve la terre, l'eau, les ressources phylogénétiques, est respectueux de l'environnement, technologiquement apprécié, économiquement viable et socialement acceptable..." (FAO, 1995, p. 1).

estimation de l'abondance numérique, de la biomasse, de la productivité et de la structure en âge des populations de poissons exploitées et sur une connaissance, plus ou moins précise selon l'espèce et la zone considérées, de leur dynamique. Des techniques normalisées ont été mises au point pour échantillonner une proportion relativement faible de poissons d'une population exploitée et combiner ces données avec celles issues des prises commerciales (captures et rejets) et récréatives au sein de modèles permettant d'estimer la dynamique de cette même population. Ces données et modèles sont utilisés pour les évaluations annuelles des unités de gestion appelées « stocks halieutiques » que les gestionnaires utilisent aux niveaux régional, national et international. Un des outils ou objectif de gestion mis en place pour développer une pêche durable tout en optimisant les retombées économiques est le rendement maximum durable (RMD ou en anglais, Maximum Sustainable Yield, MSY). Le RMD a été défini par les Nations Unies comme la plus grande quantité de captures en moyenne que l'on peut extraire d'un stock halieutique à long terme, dans les conditions environnementales existantes, sans affecter significativement le processus de renouvellement de la population considérée et en maximisant les profits.

L'évaluation des stocks permet de connaître leur état de santé démographique ou écologique. Depuis le milieu des années 80, la pression de pêche mondiale est restée stable avec entre 80 et 90 millions de tonnes capturées par an (90,9 millions de tonnes en 2016). Cependant, le bilan mondial récemment établi par la FAO (FAO, 2018) montre que si, en 1974, près de 90% des stocks étaient dans des limites biologiques acceptables (sous ou au niveau du RMD), en 2015, ils ne sont plus que 67% des stocks à être dans des limites de pression de pêche durables. La part des stocks surexploités à l'échelle mondiale est passée de 10% en 1974 à 33% en 2015. A l'inverse, il faut aussi noter que la part des stocks sous-exploités a diminué de 40% à 7% pendant cette période (Fig. 1).

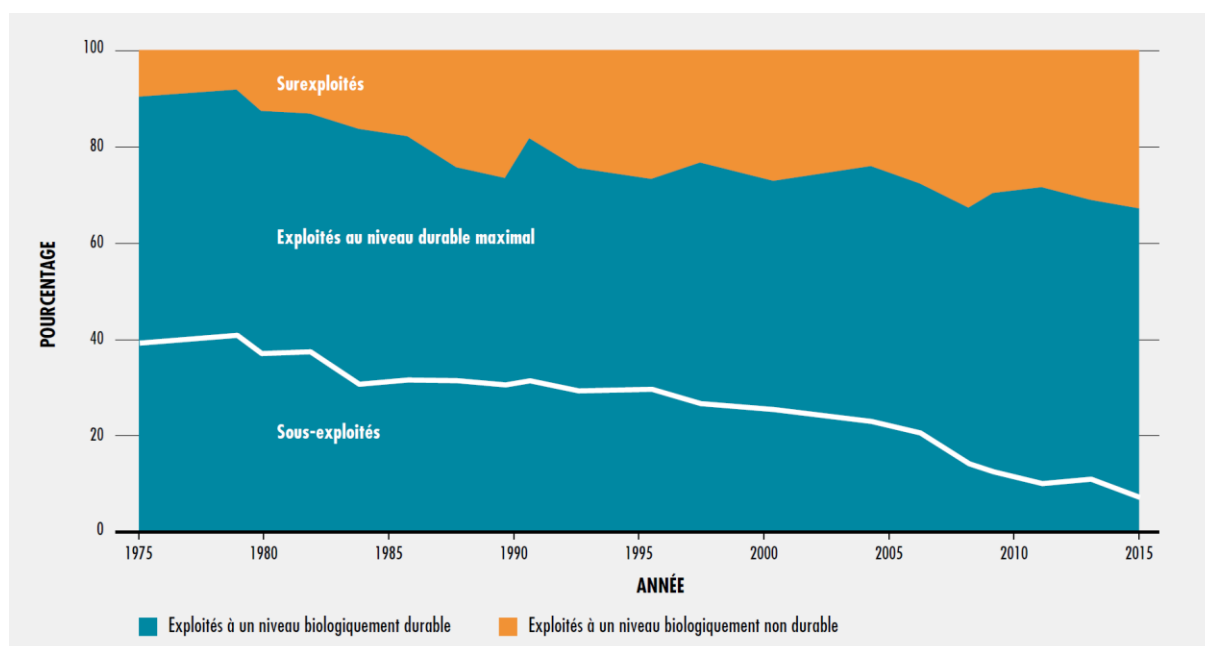


Figure 1 : Évolution de l'état des stocks de poissons marins mondiaux de 1975 à 2015 (exploité au niveau durable maximal correspond à un stock au niveau du RMD; FAO, 2018).

Cette évolution montre que l'état des ressources halieutiques continue à se détériorer à l'échelle mondiale sous la pression de l'augmentation continue des besoins en nourriture de la population humaine ainsi que des autres pressions anthropiques (pollutions, dégradations des habitats...) et du changement climatique. Pour certaines pêcheries, la mauvaise identification des stocks halieutiques a conduit à une mauvaise évaluation de ces stocks accélérant par conséquent leur chute, comme cela a été le cas de la morue au large du Canada dans les années 90 ou du crabe en Alaska (review de Cadrin, 2020)

1.2 Concept de stock halieutique

L'unité de gestion ou stock halieutique et ses limites géographiques sont au cœur de la gestion des pêcheries et sa définition revêt un intérêt capital dans le contexte de ressources dégradées évoqué précédemment. La différence essentielle entre le stock et la population est que le premier est défini selon une finalité d'exploitation et de gestion de la ressource et le second

selon des processus biologiques et écologiques. Le concept de stock est relativement ancien et remonte à la fin du XIX^{ème} siècle (Heinke, 1898). De nombreuses définitions ont été proposées autour de ce concept (Gulland, 1969; Jamieson, 1973; Booke, 1981; Ihssen *et al.*, 1981; Mork *et al.*, 1985; Begg *et al.*, 1998; Buonaccorsi *et al.*, 1999; Murta, 2000; Cadrin, 2020), dont 3 majeures qui se sont dégagées au cours du temps (Shaklee et Salini, 1985 ; Milton et Shaklee, 1987 ; Gauldie, 1988 ; Hilborn et Walters, 2001 ; Cadrin *et al.*, 2014 ; Cadrin et Dickey-Collas, 2015):

- ✓ Stock halieutique : Groupe d'individus représentant une partie d'une population² exposée à l'activité humaine à travers la pêche et donc qui possède des paramètres intrinsèques de mortalité par pêche et un recrutement commun. Ce groupe d'individus présente une réponse indépendante à la pression de pêche indépendamment des similitudes génétiques ou phénotypiques pouvant exister avec d'autres groupes proches (Gauldie, 1988). Lorsqu'une nouvelle classe d'âge d'individus intègre cette partie de la population, on parle de recrutement. Une taille minimale de capture est, en général, une des règles de gestion imposée aux flottilles de pêche pour définir leur sélectivité et donc la fraction de la population exploitée. Dans la majorité des cas, cette taille minimale de capture est sensiblement la même que la taille de première maturité sexuelle. Dans les études réalisées lors de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux stocks halieutiques.
- ✓ Stock génétique : Groupe d'individus d'une même espèce isolé reproductivement et donc distinct d'autres stocks en termes de composition génétique (Carvalho *et al.*, 1994; Ward, 2000). La variabilité génétique d'une espèce se répartit à l'échelle intra- et inter-populations. La différenciation des populations due à la structuration

² Population : ensemble d'individus vivant dans un écosystème déterminé et possédant des caractères communs transmissibles par hérédité (Daget et Le Guen, 1975).

génétique se mesure généralement à l'aide de l'indice de Fixation (F_{ST}) qui se base sur la variance des fréquences alléliques entre populations.

- ✓ Stock phénotypique (ou environnemental) : Groupe d'individus d'une même espèce adapté à son environnement de sorte à avoir des caractéristiques phénotypiques communes distinctes d'autres stocks. Ce stock est dépendant de son environnement (Booke, 1981). Deux stocks phénotypiques évolueront donc dans 2 habitats différents, ce qui n'est pas forcément le cas de 2 stocks génétiques.

Le concept de stock halieutique a été le premier à être défini et ne prend pas obligatoirement en compte les différences phénotypiques ou génétiques (Carvalho et Hauser, 1995). Une synthèse de Reiss *et al.* (2009) a montré que, pour certains stocks, les limites utilisées ne sont pas basées sur des connaissances biologiques en dépit des études disponibles. L'abondance des poissons constituant un stock halieutique dépend plus du recrutement et de la mortalité (naturelle et par pêche) que des paramètres d'immigration et d'émigration (Laurec et Le Guen, 1981). C'est en cohérence avec le fait que la définition halieutique du stock a été mise en place essentiellement pour des aspects opérationnels, à savoir évaluer quantitativement les individus (nombre et biomasse) qui le composent, comparer ces valeurs par rapport à des valeurs seuil (ou points de référence) afin d'estimer son état de santé et faire des projections de son évolution future (Hilborn et Walters, 2001). La difficulté ou l'incapacité à détecter une variation génétique entre des stocks putatifs ne signifie pas obligatoirement qu'il s'agit d'un stock halieutique unique. Il pourrait y avoir en effet un seul stock génétique mais qui serait composé de plusieurs stocks halieutiques ou phénotypiques qui s'échangent suffisamment d'individus pour empêcher la détection d'une telle différenciation génétique tout en étant suffisamment distincts en termes de recrutement et de mortalité. Par exemple, des populations adaptées le long de gradients environnementaux peuvent montrer une variation génétique le long de ce gradient difficile à détecter malgré une différenciation phénotypique visible et donc

des réponses potentiellement différentes à la pêche de sorte à constituer des stocks halieutiques (Gauldie et Crampton, 2002). Ainsi, à l'heure actuelle, la tendance des études concernant l'identification de stocks est de considérer à la fois les composantes phénotypiques et génétiques pour identifier/définir des limites de stocks halieutiques (Izzo *et al.*, 2017 ; Taillebois *et al.*, 2017 ; Ulrich *et al.*, 2017).

Au sein d'une espèce, les mécanismes à l'origine de la distribution des populations sont encore mal compris, mais ils comprennent les effets de l'environnement, les interactions entre de multiples espèces et les effets des pressions anthropiques telles que la pêche, la pollution, la perturbation des habitats et le changement climatique (approche écosystémique des pêches). En l'absence d'évaluations précises des stocks et de leur bonne utilisation dans la gestion, les populations de poissons exploitées peuvent s'effondrer, créant de graves problèmes économiques, sociaux et écologiques (Sinclair, 1988 ; Sinclair et Smith, 2002). Par conséquent, il est fondamental de veiller à ce que la recherche sur l'évaluation des stocks progresse pour assurer la durabilité des pêches commerciale et récréative en mer. Ce processus d'évaluation des stocks est décliné en plusieurs étapes dont la première est la caractérisation de leurs limites géographiques.

1.3 Méthodes d'identification des stocks

Un grand nombre de méthodes est utilisé pour identifier les stocks de poissons exploités. Ce sujet est tellement important en sciences halieutiques qu'il existe depuis 1997 un groupe d'experts (SIMWG : Stock Identification Methods Working Group) au sein du Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM) qui est chargé chaque année d'examiner les nouvelles méthodes et études d'identification de stocks. En 2018, ce groupe avait identifié 72 études utilisant soit 1 seul type de marqueur (génétique, morphométrique, méristique,

parasite, otolithe...) ou une approche de combinaison de marqueurs pour identifier les stocks halieutiques (ICES, 2018).

Différents marqueurs sont utilisés pour répondre à 2 grandes questions (Fig. 2):

- ✓ Des études d'assignation qui consistent à identifier la population d'origine de chaque individu sur la base de probabilités de provenance estimées à partir du marqueur utilisé (études d'identification de stocks proprement dite). Selon le type de marqueur, ce n'est pas la même définition de stock qui est concernée.
- ✓ Des études de connectivité qui visent à identifier le degré d'échange ou les flux d'individus ou de gènes entre sous-populations ou stocks (Waples et Gaggiotti, 2006). Ainsi, il peut y avoir des échanges lors de la reproduction avec des adultes qui iraient frayer dans d'autres zones de reproduction que celles associées généralement à leur stock (phénomène appelé diffusion, Porch *et al.*, 2001 ; ou échange génétique, Hawkins *et al.*, 2016), ou le mélange saisonnier de sous-populations isolées lors de la reproduction (souvent associé à des phénomènes de natal homing).











<u>Type de marqueurs</u>	Assignation			Connectivité
	Stock halieutique	Stock génétique	Stock phénotypique	
Marqueurs phénotypiques <i>morphologie, traits d'histoire de vie, croissance de l'otolithe, forme de l'otolithe</i>				
Marqueurs génétiques				
Marqueurs biochimiques <i>microchimie des otolithes</i>				
Marqueurs biologiques <i>parasites</i>				
Marques électroniques				

Figure 2 : Application des différents marqueurs pour les études d'assignation en fonction de la définition de stock considérée et pour les études de connectivité. Les cercles représentent les groupes et les flèches les échanges entre ces groupes.

Plus précisément, ces marqueurs sont regroupés en 5 classes :

- ✓ Marqueurs phénotypiques : ils regroupent les marqueurs liés à la morphologie du poisson, aux traits d'histoire de vie, à la croissance de l'otolithe et à sa forme. Ils permettent de distinguer à la fois les stocks halieutiques et les stocks phénotypiques (Fig. 2). Comme tout caractère phénotypique, ces marqueurs sont influencés par une composante génétique et une composante plastique. L'adaptation génétique et la réponse plastique aux conditions environnementales locales vont toutes deux contribuer à une différenciation de ces marqueurs phénotypiques entre stocks. Les marqueurs utilisés les plus anciens sont les critères liés à la morphologie du poisson avec les descripteurs méristiques³ et morphométriques car ils reflètent particulièrement les adaptations morphologiques en réponse à des différences environnementales (température, salinité, lumière, nourriture..., Cadrin *et al.*, 2014 ; ICES, 2018). Les marqueurs morphologiques sont par exemple des caractères méristiques comme le nombre de vertèbres ou de rayons des nageoires, des mesures biométriques classiques comme la taille de l'œil ou des mesures morphométriques reconstruisant la forme du poisson selon des points de référence appelés aussi points homologues (Strauss et Bookstein, 1982). Ce type de descripteur permet par exemple de discriminer à partir de la différence de forme de la tête 2 stocks de rouget barbet de roche (*Mullus surmuletus*) entre la Manche orientale et le golfe de Gascogne (Mahé *et al.*, 2014). Cette différence serait vraisemblablement une adaptation morphologique locale de cette espèce benthique à la composition du substrat (Mahé *et al.*, 2014). De même, les traits d'histoire de vie (âge, reproduction...) et comportementaux reflètent étroitement la réponse plastique ou l'adaptation des populations aux conditions

³ Les caractéristiques méristiques sont les caractères morphologiques dénombrables : nombre de nageoires, de dents, de rayons, d'épines...

environnementales locales et peuvent donc être utilisés comme marqueurs à échelle spatiale fine (Barrios *et al.*, 2017 ; Adams *et al.*, 2018 ; du Pontavice *et al.*, 2018). Enfin, les derniers marqueurs phénotypiques sont ceux liés à la croissance et la forme de l'otolithe⁴. Ainsi, la croissance de l'otolithe a été utilisée pour discriminer les différents stocks de merlan (*Merlangius merlangus*) en Atlantique Nord-Est (Barrios *et al.*, 2017) et, d'après les experts du SIMWG, l'analyse de forme des otolithes devient, avec l'analyse génétique, la principale méthode d'identification des stocks. Ceci peut s'expliquer par les avancées récentes en termes d'analyse d'images et de traitement des données en particulier avec le développement d'outils statistiques tels que R ou Shape (développé par Iwata et Ukai, 2002) qui permettent de réaliser des études par un plus grand nombre de scientifiques pour des échantillons de plus grande taille et à faible coût par rapport à des approches comme la génétique.

- ✓ Marqueurs génétiques : leur utilisation se base sur (i) la différenciation des marqueurs génétiques neutres pouvant s'établir entre groupes d'individus (partiellement) isolés du fait de la dérive génétique et (ii) la différenciation des marqueurs codants entre groupes d'individus s'adaptant à différentes conditions locales. De ce fait, ils permettent de répondre à des questions de connectivité en termes de flux de gènes mais également d'assignation des individus à des sous-populations grâce aux marqueurs spécifiques de chacune (Fig. 2). Quels que soient les marqueurs génétiques utilisés (allozymes, haplotypes, microsatellites ou Single Nucleotide Polymorphism, SNPs), le niveau de transfert de gènes estimé permet de décider si on est en présence d'un ou plusieurs

⁴ Otolithe : ce terme est composé des parties issues du Grec *οτο-/oto-* (oreille) et *λιθος/lithos* (pierre) et peut donc être compris comme "pierre d'oreille". Il est spécifique aux poissons téléostéens, bien que des pièces calcifiées soient aussi retrouvées au niveau de l'oreille interne chez de nombreux vertébrés comme les "statoconies" chez l'Homme (Marcelli *et al.*, 2016). Les otolithes sont des structures paires situées dans le système vestibulaire de l'oreille interne des poissons téléostéens de part et d'autre du crane sous le cerveau.

stocks. Les niveaux de transfert généralement acceptés comme indiquant une séparation de stocks sont $\leq 10\%$ (Carvalho et Hauser, 1995).

- ✓ Marqueurs biochimiques : la microchimie (essentiellement les éléments Li, Mg, Mn, Cu, Zn, Sr et Ba) de l'otolithe (ou plus rarement d'autres pièces calcifiées) peut être utilisée comme outil pour identifier les stocks halieutiques (Sturrock *et al.*, 2015; Tanner *et al.*, 2016; Izzo *et al.*, 2018 ; Fig. 2). Les poissons incorporent différents éléments chimiques de l'environnement dans leurs otolithes au fur et à mesure de leur développement. Ces éléments chimiques proviennent soit directement de l'environnement en passant par les branchies, soit indirectement au travers de l'alimentation ou des réserves corporelles mobilisées (Kalish, 1989; Campana, 1999 ; Gronkaer, 2016). Ces marqueurs sont très souvent utilisés pour répondre à la question du degré de connectivité entre les habitats des différents stades de vie, et notamment entre nourriceries et stocks (adultes). Bien que ces marqueurs puissent être aussi utilisés pour identifier des stocks halieutiques, chez certaines espèces les apports de cette méthode restent limités. Des processus physiologiques internes peuvent modifier le taux de transfert de ces éléments chimiques lors du passage des différentes barrières (branchie, vaisseau sanguin pour le plasma et l'otosac pour l'endolymphe, liquide dans lequel baigne l'otolithe) avant d'arriver dans l'otolithe. De plus, le signal chimique peut être dilué dans l'otolithe chez des espèces présentant des mouvements verticaux très importants dans la colonne d'eau comme le merlu (*Merluccius merluccius*) (de Pontual *et al.*, 2012). De ce fait, l'utilisation des marqueurs biochimiques dans les études d'assignation peut être limitée, ils sont plus souvent utilisés dans les études de connectivité.
- ✓ Marqueurs biologiques : ils sont essentiellement représentés par les parasites et leur utilisation repose sur l'hypothèse que la charge parasitaire de l'hôte pour un parasite

donné est proportionnelle à l'abondance de ce dernier dans l'aire de répartition du premier. Deux approches peuvent généralement être adoptées : utiliser soit un nombre faible (ou une famille) de parasites chez un grand nombre de poissons, soit la totalité des parasites présents pour un petit nombre d'individus (MacKenzie et Abaunza, 2005). Pour employer les parasites comme marqueurs, il est nécessaire préalablement d'avoir une très bonne connaissance de la répartition géographique des parasites présents dans la zone d'étude et de leur cycle de vie dans et à l'extérieur de l'hôte. De même, il peut être important de connaître l'âge de l'hôte, ici le poisson, qui peut être un facteur influençant le taux d'infestation de l'individu. Les parasites sont généralement utilisés comme marqueurs biologiques chez les espèces pélagiques de petite taille comme la famille des clupéidés (Mattiucci *et al.*, 2018) ou de grande taille comme la famille des scombridés (Hermida *et al.*, 2018) ou chez des espèces de grands fonds pour lesquelles il peut être difficile d'utiliser d'autres marqueurs (MacKenzie et Abaunza, 2005 ; Cadrin *et al.*, 2014).

- ✓ Marques électroniques : Le marquage physique (par marquage/recapture classique ou marquage électronique) est une méthode utilisée généralement pour estimer les mouvements et donc le degré de connectivité entre 2 stocks au niveau adulte ou entre pré-recrutement et post-recrutement. Ce marquage physique est adapté aux problématiques de nombreuses espèces dont les grands pélagiques (Skomal *et al.*, 2017 ; Arrizabalaga *et al.*, 2018; Curtis *et al.*, 2018).

Au fur et à mesure que la connaissance sur l'identification des stocks progresse, cela met en lumière la complexité d'un bon nombre de stocks qui nécessite souvent une approche multidisciplinaire qui combine les informations obtenues par plusieurs marqueurs (Cadrin *et al.*, 2014 ; Cadrin, 2020).

1.4 Otolithe, outil d'identification de stock

Chaque oreille interne est constituée d'un labyrinthe vestibulaire contenant un réseau de canaux semi-circulaires qui relient 3 chambres ou sacs otiques appelés *sacculus*, *utricle* et *lagena*, chacun contenant un otolithe différent appelé respectivement *sagitta*, *lapillus* et *astericus* (Fig. 3). Ce système, baigné dans un liquide appelé endolymphe, est caractéristique des vertébrés gnathostomes⁵. Ce système labyrinthique ou appareil vestibulaire permet aux poissons de détecter les changements d'orientation et d'accélération liés à l'équilibre et les vibrations liées à la perception auditive. Chez les humains, le système vestibulaire présente des structures similaires appelées otoconies qui possèdent des caractéristiques et un développement très semblables (Lundberg *et al.*, 2015).

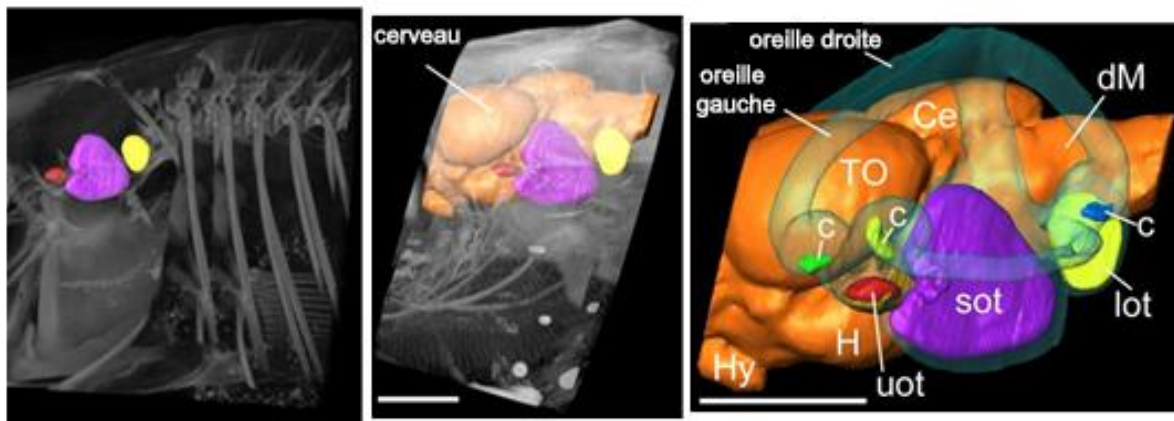


Figure 3 : Positionnement des otolithes (Violet : *sagitta* (saccular otolith : SOT); rouge : *lapillus* (utricular otolith : UOT) ; jaune : *astericus* (lagenar otolith : LOT)) dans l'oreille gauche d'un black molly à différentes échelles par reconstruction tomographique 3D. Orange : cerveau ; c : crêtes des canaux auditifs ; Ce : cerebellum ; dM : dorsale médullaire, Hy : hypophyse (Hy), H : hypothalamus et TO : colliculus supérieur ou tectum optique. La barre d'échelle est de 1 mm (In Schulz-Mirbach *et al.*, 2013).

Les *sagittae* sont généralement les otolithes les plus grands et sont de ce fait les plus utilisés dans les applications en halieutique. Les études présentées dans cette thèse ne font pas

⁵ Gnathostomes : vertébrés présentant une bouche ayant une mâchoire.

exception et l'utilisation du terme otolithe dans tout le reste du document fera référence aux *sagittae*. Ces derniers sont reliés par leur face proximale (face interne) aux cellules ciliées de l'épithélium sensoriel appelé macula sur laquelle ils agissent mécaniquement (Fig. 4 ; Lowenstein, 1971 ; Fay, 1984 ; Morales-Nin, 2000). Ainsi, leur face proximale présente un sillon appelé *sulcus acusticus* qui correspond à la projection de la macula de l'épithélium sacculaire qui est elle-même reliée à des fibres nerveuses à travers une membrane otolithique (Schulz-Mirbach *et al.*, 2019), contrairement à la face distale (face externe) non reliée à cet épithélium (Fig. 4). Lorsque la croissance du poisson se réduit avec l'âge, celle de l'otolithe continue et se traduit par une augmentation du poids de l'otolithe, les dépôts se faisant généralement au niveau du *sulcus acusticus* en fonction de l'espèce (Beamish, 1979 ; Boehlert, 1985). Les otolithes permettent la transduction d'informations mécaniques tels que les mouvements (principalement les *asterisci*) et les ondes sonores (principalement les *sagittae* et *lapilli*) en signaux nerveux (Grassé, 1958).

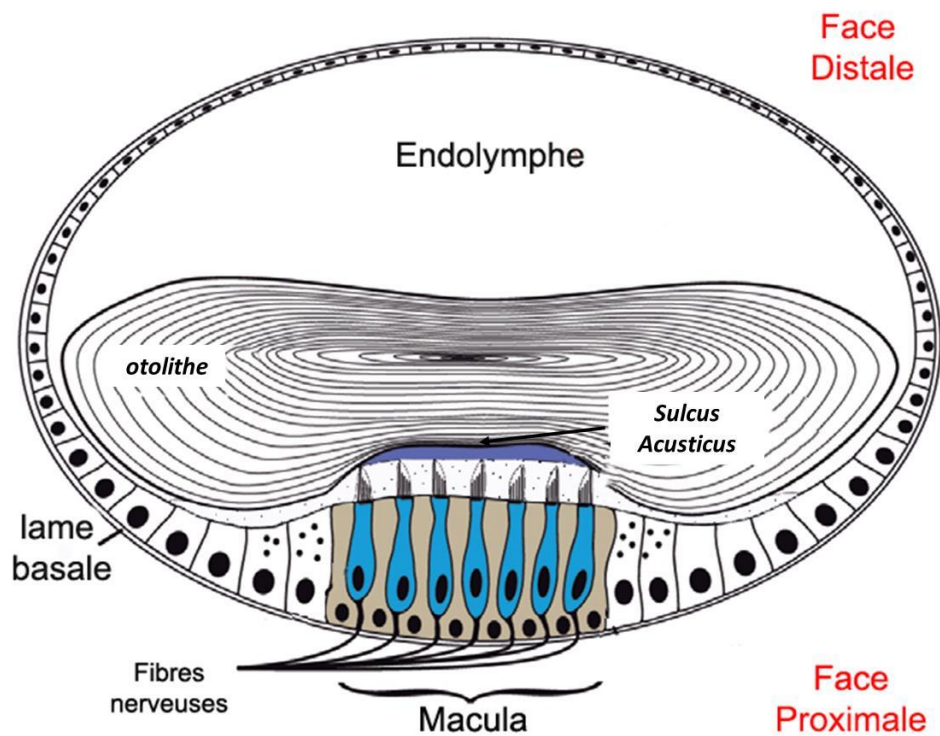


Figure 4 : Illustration de l'otolithe dans la cavité otique relié à la macula par la membrane otolithique (modifié de Schulz-Mirbach *et al.*, 2019).

La croissance des otolithes se fait par dépôts successifs de couches constituées de carbonate de calcium (plus de 90% du poids de l'otolithe) précipité sur une matrice organique principalement composée de protéines et protéoglycanes (Payan *et al.*, 2004). Ce processus est appelé biominéralisation. L'observation de leur structure interne montre qu'ils se développent selon une périodicité allant de la journée à l'année. Parmi les pièces calcifiées (écailles, vertèbres, rayons de nageoire, otolithes...) présentes chez les poissons téléostéens, seuls les otolithes sont métaboliquement inertes, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent ni s'altérer ni se résorber en général (Casselman, 1987). Du fait de cette croissance accrétiennelle et de cette inertie métabolique, l'utilisation première de l'otolithe est l'estimation de l'âge des poissons. Cette pratique date de 1899 avec l'étude de Reibish qui a fait le lien entre la déposition de zones opaques et translucides et l'âge des poissons. En 1999, Campana et Thorrold (2001) ont estimé que près de 800 000 otolithes étaient utilisés au niveau mondial, chaque année, pour estimer les structures en âge des espèces de poissons commerciaux, ce qui représentait un coût d'analyse de l'ordre de 8 millions de dollars canadiens. En Europe, le nombre de pièces calcifiées étudiées par 22 pays était en 2010 de 759 403 (ICES, 2011). Parmi les autres utilisations des otolithes en sciences halieutiques, l'analyse de la forme externe de l'otolithe au sein d'une espèce principalement pour l'identification de stocks est en plein essor. La figure 5 montre l'évolution du nombre d'articles scientifiques basés sur différentes applications des otolithes (forme, croissance, microchimie) parus chaque année (source Web of Science). L'utilisation de la forme des otolithes, et à moindre niveau de celle des écailles, pour discriminer les stocks s'est développée depuis les années 1990 avec en particulier les études de De Pontual et Prouzet (1987) et de Campana et Casselman (1993). Ainsi, deux périodes en fonction du nombre d'articles scientifiques parus peuvent être identifiées (Fig. 5) : des années 90 à 2005, une moyenne de 10 études par an utilisaient la forme des otolithes pour discriminer les stocks de poissons puis, à partir de 2005 en lien probable avec les progrès de

l'informatique et la diminution des coûts, ce nombre a augmenté de façon continue pour atteindre près de 50 par an lors de ces dernières années, signe d'un engouement fort des scientifiques pour cette méthode.

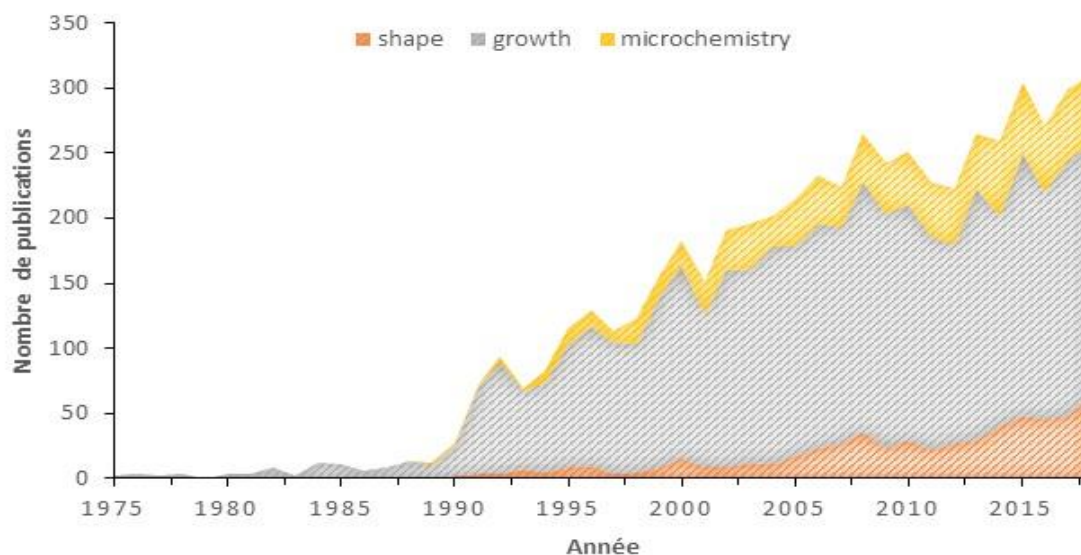


Figure 5 : Nombre d'articles scientifiques parus chaque année selon différents mots-clés après avoir préalablement sélectionné le mot-clé « otolith » (source Web of Science).

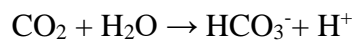
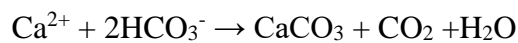
L'utilisation de la forme de l'otolithe pour la discrimination des stocks repose sur la capacité qu'a l'otolithe à intégrer les variations des conditions environnementales durant la vie du poisson mais aussi sur son déterminisme génétique. La forme des otolithes peut être en relation ou contrainte par la morphologie et la taille des vestibules de l'oreille interne (Ladich et Schulz-Mirbach, 2016). Les différences de forme de l'otolithe au sein d'une même espèce peuvent être quant à elles attribuées à des différences géographiques en termes de morphogenèse des individus. Ces différences d'activité métabolique sont elles-mêmes le résultat conjoint des effets des facteurs environnementaux et de la composante génétique propre à chaque individu avec de possibles patrons d'adaptation locale (Gauldie et Nelson, 1990; Smith, 1992; Begg et Brown, 2000).

1.5 Etat des connaissances sur les processus de biominéralisation des otolithes

La forme finale de l'otolithe dépend de sa morphogénèse qui dépend elle-même du processus de biominéralisation. Les connaissances sur ce dernier (Payan *et al.*, 2004) restent encore très parcellaires, mais quelques caractéristiques saillantes sont décrites brièvement ci-dessous :

- Le processus de calcification
- Le rôle de la matière organique
- L'hétérogénéité spatiale de la composition de l'endolymphe
- Les variations nyctémérales des composants de l'endolymphe.

La calcification, ou précipitation du carbonate de calcium, dépend de 3 ions majeurs que sont le calcium Ca^{2+} , les carbonates (HCO_3^- et CO_3^{2-}) et l'hydrogène H^+ impliqués dans les réactions suivantes (Thomas et Swearer, 2019) :



Cette calcification est régulée par le coefficient de saturation des ions dissous et le pH (Takagi *et al.*, 2005 ; Tohse *et al.*, 2009). De même, les ions H^+ produits lors de cette réaction influencent directement le pH de l'endolymphe qui doit les éliminer pour éviter que la calcification ne s'arrête par réaction d'acidose.

La matière organique principalement constituée de protéines, de collagène et de protéoglycanes (Borelli *et al.*, 2001 ; Thomas *et al.*, 2019) ne représente qu'une fraction mineure de l'otolithe avec des pourcentages allant de 0.1 à 10% (Carlström, 1963 ; Degens *et al.*, 1969). Une étude très récente sur le protéome de l'otolithe chez les *Acanthopagrus butcheri* adultes (famille des sparidae) a permis d'identifier 380 protéines (Thomas *et al.*, 2019). Le dépôt de la matière organique se ferait au crépuscule grâce notamment à

l'expression de l'otoline1 qui rentrerait en interaction avec d'autres protéines alors que la minéralisation se ferait plutôt à l'aube (Fig. 6; Thomas *et al.*, 2019).

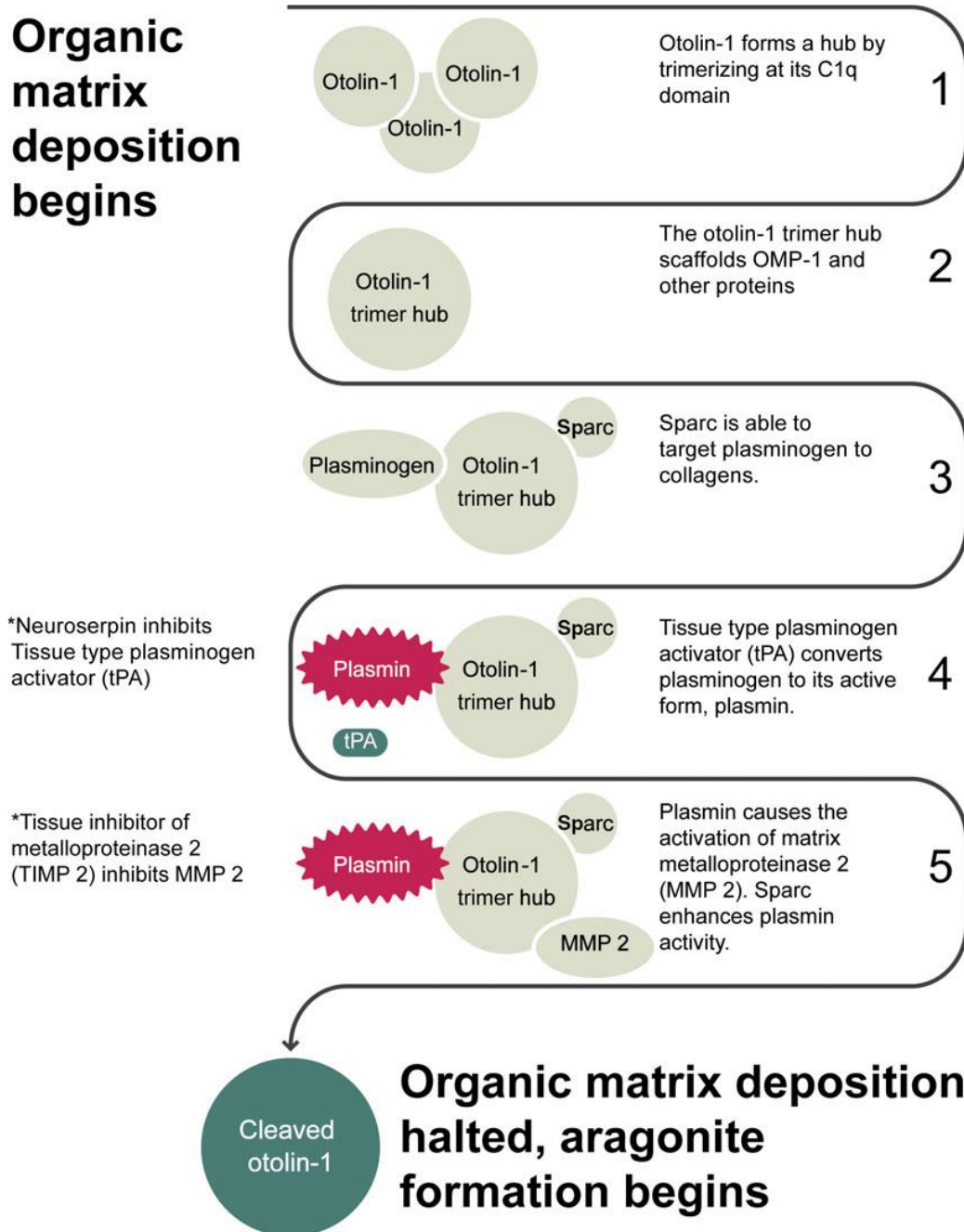


Figure 6 : Schéma proposé pour expliquer la régulation du dépôt de la matière organique au cours d'une journée. On suppose que la phase organique se dépose au crépuscule alors que la minéralisation (calcification) se produirait à l'aube. À la tombée de la nuit, l'Otolin-1 s'exprime en formant des réseaux structuraux d'interactions avec d'autres protéines. La matrice organique continue à se déposer jusqu'à l'aube, où l'action du MMP 2 (Matrix metalloproteinase 2) coupe les réseaux formés par l'Otolin-1 ce qui arrête les dépôts organiques, et permet le début de la précipitation minérale. L'activation de la MMP 2 se fait par l'intermédiaire d'une protéolyse en cascade. Au crépuscule, ces réactions sont inhibées par une neuroserpine et les MMP 2 encore actives sont inhibées par l'action de la TIMP 2 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 2). Les niveaux de MMP2 et TIMP 2 peuvent être affectés par le gène « Clock » (In Thomas *et al.*, 2019).

Cette matière organique forme une structure ou matrice en 3 dimensions où viennent se fixer des cristaux de carbonate de calcium pour former l'otolithe. C'est cette matrice qui contrôlerait la forme et la croissance de l'otolithe en contrôlant la vitesse de calcification (Pisam *et al.*, 2002; Söllner *et al.*, 2003; Falini *et al.*, 2005 ; Murayama *et al.*, 2005; Tohse *et al.*, 2008).

L'hétérogénéité spatiale de l'endolymphe a été mesurée expérimentalement par Payan *et al.* (1999). Cette caractéristique est liée à la structure asymétrique de l'épithélium de la zone proximale du sac otique par rapport celui de la zone distale (Mayer-Gostan *et al.*, 1997; Pisam *et al.*, 1998). Les composés ioniques et organiques mesurés chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) et le turbot (*Scophthalmus maximus*) sont pour la plupart compartimentés avec des concentrations significativement différentes entre les zones proximale et distale de l'endolymphe (Fig. 7). Même si ces résultats ont été obtenus chez 2 espèces, ils demandent à être confirmé pour d'autres cas d'études. La zone proximale apparaît comme le lieu principal de la biominéralisation car contenant les plus fortes concentrations d'ions impliqués dans la réaction de calcification (Mugiya, 1974) et de protéines intervenant dans ce processus (Payan *et al.*, 1999; Takagi et Takahashi, 1999). Les précurseurs organiques de la biominéralisation (constitutifs de l'otolithe et régulateurs de la précipitation) seraient synthétisés au niveau des cellules péri-maculaires. La minéralisation serait donc initiée au niveau proximal et se propagerait au reste de l'otolithe. Ce processus serait à l'origine de la croissance dissymétrique de l'otolithe selon un axe proximal/distal.

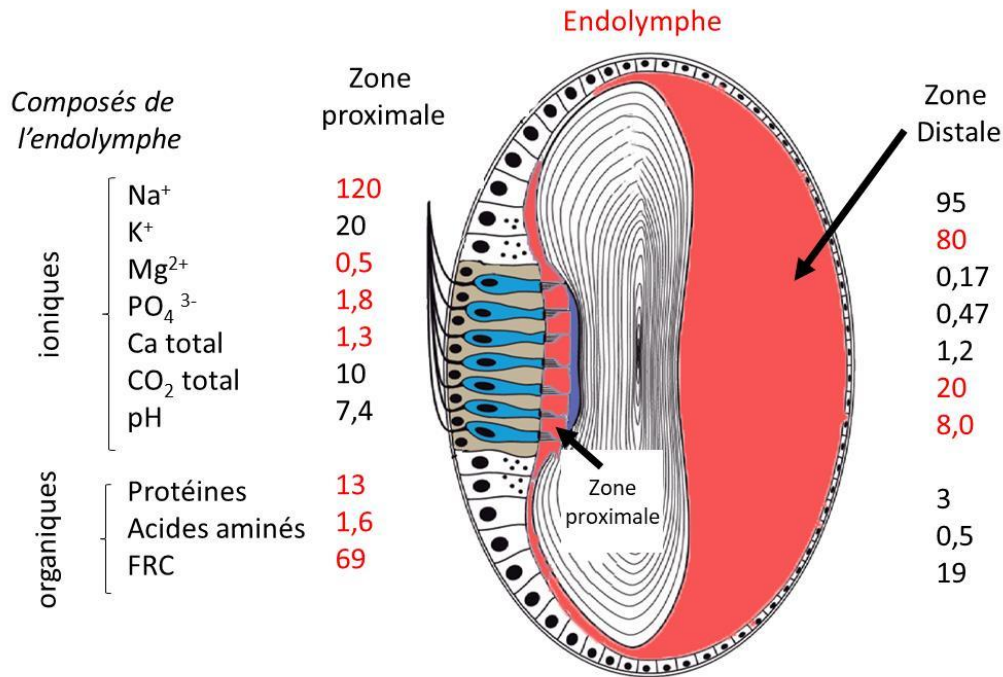


Figure 7 : Hétérogénéité spatiale des composés ioniques et organiques de l'endolymphe présentant des différences significatives entre les zones proximale et distale. Les valeurs les plus importantes sont en rouge (données Allemand *et al.*, 2007 ; figure modifiée de Schulz-Mirbach *et al.*, 2019).

Des variations nycthémerales des composants de l'endolymphe participant à la calcification ont été mises en évidence dans la partie proximale par Edeyer *et al.* (2000) et Borelli *et al.* (2001). Ainsi, les composants organiques présentent une plus forte concentration pendant le jour et à l'inverse, les ions sont plus fortement présents la nuit, ce qui se traduit par une calcification présentant un taux de matière organique plus important le jour que la nuit (Jolivet *et al.*, 2008). Ceci est à l'origine des différences de propriétés optiques observables sur l'otolithe avec une alternance de zones translucides et opaques selon un rythme circadien. L'analyse des variations nycthémerales des concentrations des principaux composés intervenant dans la calcification a conduit à l'hypothèse que la formation de la matrice organique avait principalement lieu la nuit et le dépôt de carbonate de calcium le jour (Payan *et al.*, 2004). Les résultats observés par micro-spectrométrie Raman sur des otolithes de lieu noir (*Pollachius virens*) et de merlu (*Merluccius merluccius*) suggèrent un processus plus

complexe avec un dépôt simultané des deux fractions dans les deux zones (Jolivet *et al.*, 2013).

1.6 Facteurs et processus potentiels pouvant affecter la forme des otolithes

1.6.1 Facteurs qui influencent la forme de l'otolithe

L'évolution de la forme des otolithes au cours de la vie du poisson ou leur dynamique morphologique traduit leur morphogénèse⁶. Ce processus est le résultat de la combinaison et des interactions entre des facteurs exogènes (environnement), endogènes (génétique) et des processus développementaux (ontogénie) (Mille, 2015 ; Vignon, 2015). Ainsi, la variabilité de ces différents facteurs et l'échelle biologique à laquelle elle s'exprime va déterminer la variation de la forme de l'otolithe et son niveau biologique : interspécifique, inter-populationnel⁷ et intra-populationnel (Fig. 8).

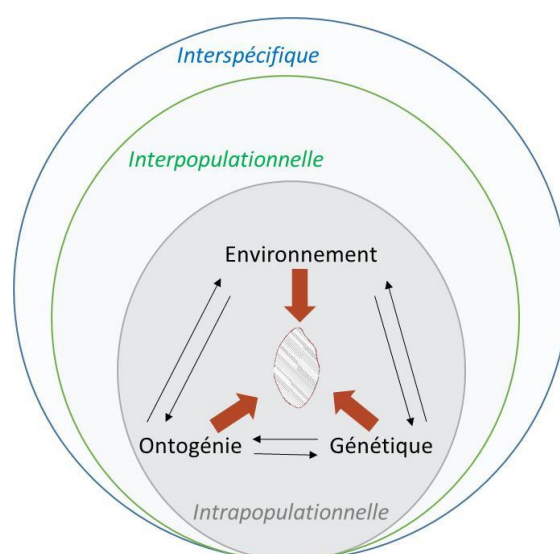


Figure 8 : Facteurs potentiels pouvant affecter la forme des otolithes aux différentes échelles possibles. Les flèches noires indiquent la direction des interactions entre effets et les flèches rouges l'effet des facteurs sur la forme de l'otolithe.

⁶ La morphogénèse de l'otolithe : processus biologique de développement de la forme l'otolithe au cours du temps.

⁷ La notion de population est préférée à celle de stock car elle couvre la totalité de la vie des individus et non pas seulement la part exploitée comme le fait la notion de stock. Ceci permet de prendre en compte toutes les phases du développement.

Suivant l'échelle biologique majoritaire de la variation de forme générée, ces différents types de facteurs vont donc pouvoir soit faciliter l'identification de stock (variabilité inter-population) soit jouer le rôle de facteurs confondants (variabilité intra-population). C'est alors le ratio entre variabilité inter- et intra-population généré par ces 3 types de facteurs qui déterminera si la variabilité de forme des otolithes est un bon indicateur de stock ou pas.

Les facteurs environnementaux, d'une part de type abiotique comme la température (Bolles et Begg, 2000), le pH (Holmberg *et al.*, 2019), la profondeur de l'eau à laquelle évoluent les poissons (Lombarte et Leonart, 1993), la nature du substrat (Mérigot *et al.*, 2007) et la salinité (Capoccioni *et al.*, 2011) ou d'autre part de type biotique comme la quantité (Gagliano et McCormick, 2004 ; Hüssy, 2008) et la composition spécifique (Mille *et al.*, 2016) de la nourriture disponible pour les poissons, influencent la forme de l'otolithe. Cardinale *et al.* (2004) ont montré que des individus d'une même espèce soumis à des régimes alimentaires et des températures différentes présentaient des caractéristiques morphométriques différentes de leurs otolithes. Même si les individus vivant dans un même habitat n'expérimentent pas exactement les mêmes conditions, l'hétérogénéité géographique de ces facteurs environnementaux domine généralement la variabilité intra-habitat générant alors une variabilité de forme des otolithes entre environnements supérieure à celle intra-habitat. La variabilité spatiale des facteurs environnementaux favoriserait donc a priori l'utilisation de la forme des otolithes comme indicateur de stock.

La variabilité génétique est aussi un facteur influençant fortement la forme de l'otolithe (Campana et Casselman, 1993 ; Cadrin et Friedland, 1999 ; Cardinale *et al.*, 2004; Vignon et Morat, 2010 ; Vignon, 2012). Vignon et Morat (2010) ont montré que la composante génétique s'exprimait de manière localisée dans l'otolithe de poissons tropicaux (*Lutjanus kasmira*) et plus particulièrement dans la zone située entre le rostre et l'anti-rostre alors que

l'influence de la composante environnementale s'exercerait sur l'ensemble du contour de l'otolithe. Il est difficile d'évaluer les parts relatives de variabilité génétique intra- et inter-population. Cependant, une différenciation génétique entre populations soit du fait de la dérive génétique entre populations relativement isolées, soit du fait de l'adaptation locale à des conditions environnementales contrastées, fera augmenter le ratio entre variabilité inter- et intra-population, contribuant alors au pouvoir discriminant de la forme des otolithes.

L'ontogénie est également un facteur générant de la variabilité de forme qui peut se traduire par des effets du sexe, de l'âge (Castonguay *et al.*, 1991), de la taille corporelle (Hüssy, 2008) ou du stade de maturité sexuelle (Lleonart *et al.*, 2000 ; Cardinale *et al.*, 2004 ; Mérigot *et al.*, 2007) de l'individu. Le développement de l'otolithe est hétérogène dans l'espace. Il se traduit par une évolution d'une forme sphérique vers une forme plus allongée due à une croissance préférentielle le long de l'axe proximal-distal comme déjà évoquée. Ceci a été montré chez des poissons plats et chez des poissons ronds de la famille des gadidés (Jearld *et al.*, 1993; Modin *et al.*, 1996; Lagardère et Troadec, 1997; Brown *et al.*, 2001; Galley *et al.*, 2006 ; Hüssy, 2008; Irgens *et al.*, 2017). La variabilité inter-individuelle et donc intra-populationnelle générée par la composante ontogénique joue donc un rôle potentiellement confondant important. Cependant, dans les études de la structure des stocks à partir de la forme des otolithes, la composante ontogénique n'est pas souvent étudiée. Le problème est généralement contourné en échantillonnant des individus d'une même classe d'âge ou de taille (Begg et Brown, 2000 ; Paul *et al.*, 2013 ; Vasconcelos *et al.*, 2018). De même, après la maturité sexuelle, une partie du métabolisme est allouée à la reproduction, ce qui a un impact sur la croissance et la forme de l'otolithe (Härkönen, 1986 ; Tuset *et al.*, 2003 ; Mérigot *et al.*, 2007). Ainsi, certaines études ne se focalisent que sur des individus immatures ou matures pour prendre en compte cet effet (Burke *et al.*, 2008 ; Mahé *et al.*, 2013). Alternativement, des procédures statistiques permettent de retirer cette composante ontogénique en utilisant les

relations allométriques de la forme des otolithes avec la taille du poisson (Leonart *et al.*, 2010).

1.6.2 Processus de régulation développementale

Comme expliqué précédemment, la forme de l'otolithe est liée à l'influence des facteurs environnementaux et celle de la composante génétique de l'individu qui vont influencer sur sa trajectoire développementale. Celle-ci est cependant en partie régulée par 3 processus, la stabilité développementale, la canalisation du développement et la plasticité phénotypique, qui vont influencer sur la variation phénotypique résultante.

La stabilité développementale est définie comme l'aptitude d'un organisme à tendre vers un état ou phénotype décrit comme « idéal » selon Palmer (1994) ou « standard » selon (Polak, 2003a) au cours de son développement bien qu'il subisse des stress environnementaux ou des variations micro-environnementales, c'est-à-dire à l'échelle individuelle ou intra-individuelle. Cette stabilité dépend de la capacité de l'organisme à mettre en œuvre des processus de régulation qui compensent les variations ou perturbations du développement associé à ces conditions micro-environnementales (Palmer, 1994; Polak, 2003a).

La canalisation du développement correspond quant à elle à la faculté de maintenir la trajectoire du développement entre certaines limites malgré les variations génétiques et macro-environnementales en la contraignant, pour conduire à un résultat proche du résultat "idéal" / "standard" (Palmer, 1994; Nijhout et Davidowitz, 2003; Polak, 2003b). Si la stabilité développementale assure « l'homéostasie » du phénotype à l'échelle individuelle, la canalisation intervient à l'échelle inter-individuelle ou populationnelle, voire de l'espèce (Debat et David, 2001; Debat *et al.*, 2009). En d'autres termes, la stabilité développementale tamponne les variations micro-environnementales alors que la canalisation tamponne les variations macro-environnementales et génétiques (Willmore *et al.*, 2007).

Ces processus tendent tous les 2 à limiter la variabilité développementale face à des perturbations d'origine environnementale et/ou génétique et donc limitent la diversité phénotypique. De plus, pour un caractère, plus le coût fonctionnel d'un écart au phénotype "standard" est important, plus le développement de ce caractère aurait tendance à être fortement canalisé et stabilisé du fait de la sélection naturelle (Palmer, 1994; Debat, 2016). Ainsi, l'otolithe participant aux fonctions d'audition et d'équilibration des individus et ayant donc un rôle-clef dans la détermination de leur fitness (au travers de l'influence sur les relations proies-prédateurs à travers les processus de fuite et/ou de chasse par exemple), sa forme est certainement fortement canalisée et tamponnée face à l'instabilité développementale (Borelli *et al.*, 2003 ; Mille, 2015).

La plasticité phénotypique peut être définie comme un changement du phénotype en réaction à des conditions environnementales différentes (Waddington, 1942 ; 1957). Lorsqu'il est adaptatif, ce processus peut être vu comme une partie intégrante de celui de la canalisation et non un processus à opposer à la canalisation (Willmore *et al.*, 2007) puisqu'il permet en théorie de produire un phénotype optimal en fonction de l'environnement et donc de tamponner les conséquences potentiellement négatives sur la fitness des individus aux variations macro-environnementales. La diversité des formes d'otolithes observée chez les poissons peut être une conséquence des effets des conditions environnementales qui modifient plastiquement la structure de l'oreille. Cette plasticité phénotypique aurait donc potentiellement un rôle sur le développement des otolithes (Schulz-Mirbach *et al.*, 2019).

Pour synthétiser, la morphogenèse de l'otolithe est influencée par plusieurs facteurs que sont la composante génétique et les facteurs environnementaux selon le stade de vie des individus mais leur influence respective dépend aussi de plusieurs processus de régulation développementale. Ceux-ci jouent le rôle de lentilles convergentes (stabilité développementale et canalisation) ou divergentes (plasticité phénotypique) qui peuvent ainsi

diminuer ou augmenter les variations de forme de l'otolithe entre 2 groupes d'individus permettant d'identifier la structure des stocks (Fig. 9).

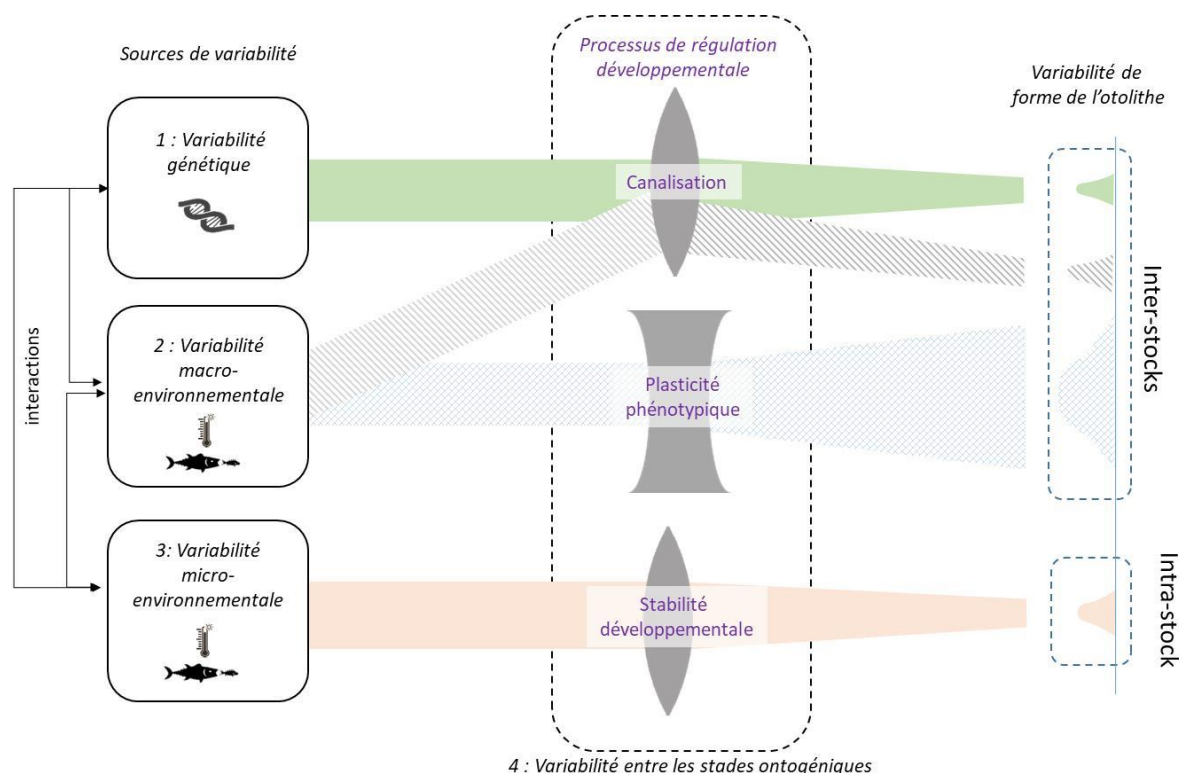


Figure 9 : Sources de variabilité de la forme des otolithes au niveau intra- et inter-stocks en prenant en compte les processus de régulation développementale. Ces processus qui interviennent tout au long de la vie du poisson, ont des effets convergents ou divergents sur les sources de variabilité génétique ou environnementale.

1.6.3 Asymétrie bilatérale de forme et lien avec le développement

Les otolithes étant des structures paires présentes dans les oreilles internes droite et gauche, une asymétrie de forme entre les deux otolithes, ou asymétrie bilatérale, peut être mesurée. Cette asymétrie bilatérale est en lien avec la trajectoire développementale des otolithes qui est elle-même orientée par les processus de régulation développementale présentés dans le chapitre précédent. En général, il y a 3 catégories d'asymétries bilatérales observables (Fig. 10). L'asymétrie bilatérale fluctuante (AF) correspond à des écarts individuels aléatoires par rapport à une symétrie bilatérale parfaite (Lemberget et McCormick, 2009; Diaz-Gil *et al.*,

2015), générant ainsi une distribution normale des déviations observées avec une moyenne de 0. L'AF appliquée à la forme de l'otolithe a été étudiée pour certaines espèces de poissons ronds et de poissons plats (Lemberget et McCormick, 2009 ; Lychakov, 2013 ; Díaz-Gil *et al.*, 2015). L'asymétrie bilatérale directionnelle (AD) se rapporte, quant à elle, à un écart systématique de la symétrie bilatérale vers un côté (par exemple l'asymétrie des otolithes chez les poissons plats, Mille *et al.*, 2015) et est donc caractérisée par une distribution normale des déviations avec une moyenne différente de 0 dont le signe dépend du côté de la déviation. Enfin, l'antisymétrie bilatérale (A) se produit lorsqu'il y a un écart systématique à la symétrie parfaite mais alterné d'un côté ou de l'autre au sein de la population, ce qui génère une distribution des déviations bimodale avec une moyenne de 0 dans sa forme la plus extrême (par exemple pour les pinces des crabes violonistes ; Palmer et Strobeck, 1986 ; ou des homards, Govind et Pearce, 1986).

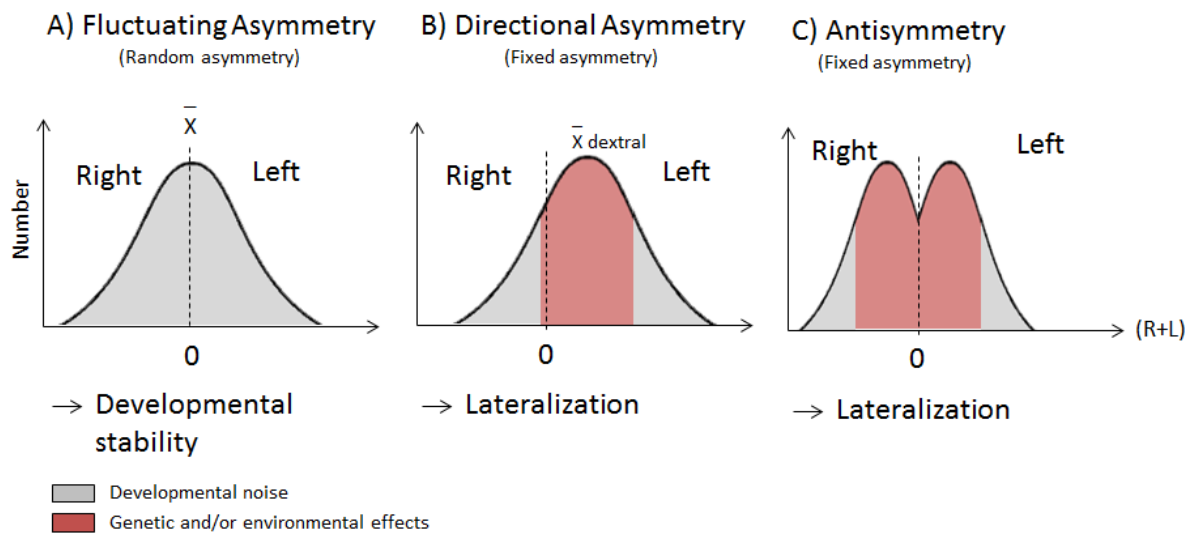


Figure 10 : Catégories d'asymétries bilatérales : A) Asymétrie fluctuante (FA) représentée par la déviation non-directionnelle de la symétrie parfaite limitée par les processus de stabilité développementale et de stabilité développementale; B) l'asymétrie directionnelle (AD) ou processus de latéralisation sur un côté ; C) l'antisymétrie ou processus de latéralisation sur un côté qui varie de façon aléatoire entre les individus.

D'après sa définition, l'asymétrie fluctuante (FA) pourrait être en lien avec l'instabilité développementale et fournirait ainsi une mesure indicatrice de stress ou de variabilité micro-environnementale (Downhower *et al.*, 1990; Lemberget et McCormick, 2009, Diaz-Gil *et al.*, 2015, Green *et al.*, 2017). Lemberget et McCormick (2009) identifient plus particulièrement la FA comme un indicateur de la santé du poisson car ce type d'asymétrie peut directement affecter les performances d'équilibre et d'audition du poisson. L'asymétrie systématique en faveur d'un des 2 côtés traduit quant à elle une latéralisation soit toujours du même côté (AD), soit d'un côté ou de l'autre (A) (Fig. 10). Malgré la latéralisation, l'AD testée des otolithes sur 4 espèces de poissons ronds (*Melanogrammus aeglefinus* ; *Merlangius merlangus*; *Mullus barbatus* et *Clupea harengus*) et 4 espèces de poissons plats (*Pleuronectes platessa* ; *Limanda limanda* ; *Solea solea* et *Lepidorhombus whiffiagonis*) n'excède jamais 18%, potentiellement du fait de la canalisation du développement (Mille, 2015).

1.7 Revue des méthodes d'extraction de l'information contenue dans la forme des otolithes

Différentes approches sont utilisées pour décrire la taille et la forme des otolithes. 2 types d'informations sont ainsi extraites : (i) les données univariées qui regroupent des mesures morphométriques en lien avec la taille de l'otolithe et des indices de forme en lien avec sa morphologie et (ii) les données multivariées qui décrivent l'intégralité de la forme selon différentes transformations (Figs. 11 & 12). Le nombre de publications parues depuis 1985 et regroupant les mots-clés « otolithe » et « forme » est de 343, dont 87% parues depuis 2006, ce qui montre bien l'essor de l'utilisation de la forme de l'otolithe au cours des deux dernières décennies. Parmi toutes ces études, 125 sont basées essentiellement sur des données univariées alors que 218 (soit 63%) ont été réalisées à partir de données multivariées (Fig. 11).

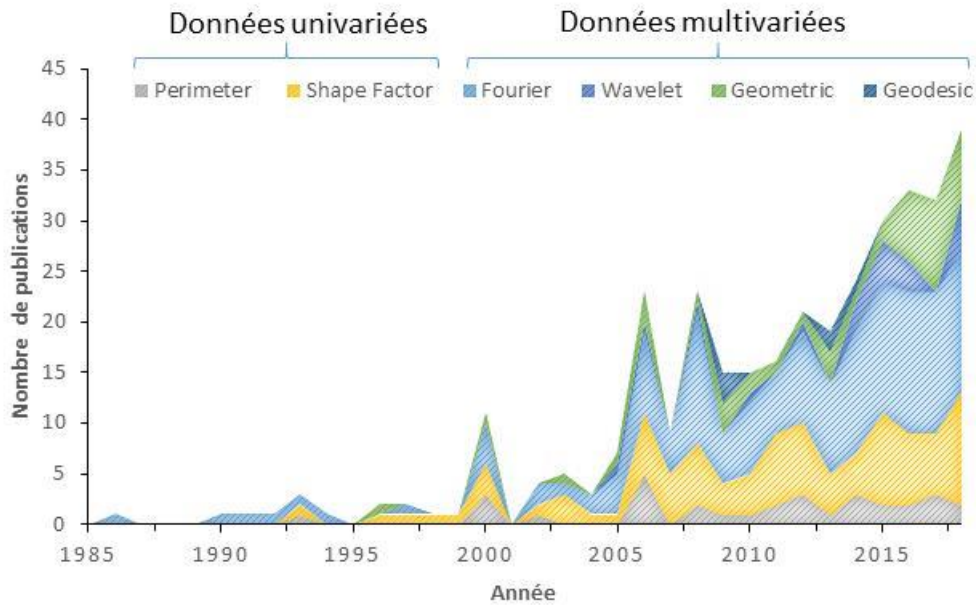


Figure 11 : Nombre d’articles scientifiques parus chaque année selon le type de données extraites pour analyser la forme de l’otolithe en ayant préalablement sélectionné les mots-clés « otolith » et « shape » (source Web of Science).

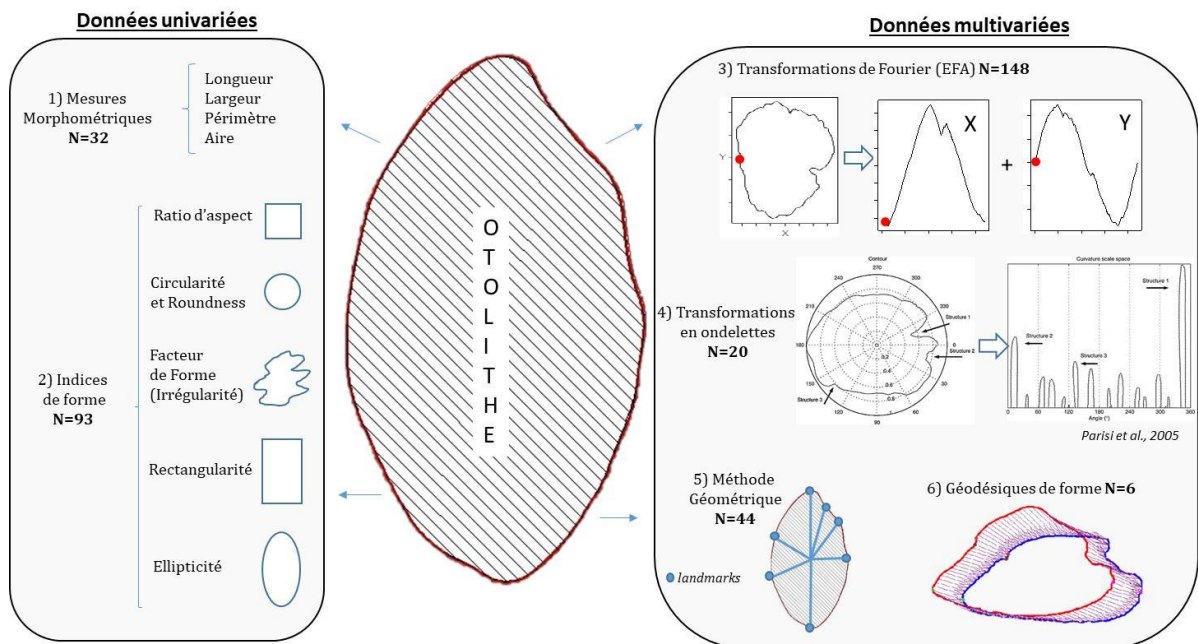


Figure 12 : Schéma des différents types de données uni et multivariées extraites pour analyser la forme de l’otolithe (N étant le nombre de publications parues de 1985 à 2018).

L’analyse des ellipses de Fourier (EFA) est la méthode la plus utilisée pour décrire la forme des otolithes avec 148 études publiées, soit 43% du nombre total (Fig. 12). Cette technique décrit le contour de manière quantitative (Kuhl et Giardina, 1982; Lestrel 1997; Tracey *et al.*,

2006). L'EFA décrit la forme projetée dans un repère orthonormé à 2 dimensions à travers l'utilisation de composantes spécifiques appelées Harmoniques. Chacune d'entre elles est formée de 4 coefficients dénommés Descripteurs des Ellipses de Fourier (EFDs) résultant de la linéarisation des coordonnées x et y de chaque point de la forme externe. L'amplitude de chaque harmonique représente sa contribution à la forme empirique de l'otolithe (Bird *et al.*, 1986). La précision de la description de l'otolithe est directement proportionnelle au nombre d'harmoniques utilisées (Kuhl et Giardina, 1982). Les EFDs, qui font appel à une fonction périodique et qui s'expriment en une somme de sinus et cosinus, sont les plus utilisés. Il y a néanmoins d'autres approches mathématiques de cette méthode en particulier les Transformées de Fourier Rapide (FFT ou Fast Fourier Transform) (Zahn *et al.*, 1972) ou les descripteurs de Fourier complexes (CFD ou Complex Fourier Descriptors ; Granlund, 1972). Comme rapporté par plusieurs auteurs, les descripteurs d'EFDs sont souvent considérés comme plus puissants que ceux dérivés de FFT ou CFD pour l'analyse de forme (Nasreddine *et al.*, 2009 Benzinou *et al.*, 2013), en raison de leur forte efficacité pour décrire les informations de forme (Stransky et MacLellan, 2005; Tracey *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2014).

Les indices de forme sont la deuxième méthode la plus utilisée pour décrire la forme des otolithes (Fig. 12) avec 93 études soit 43% du total. Ils sont estimés par des formules mathématiques à partir des principales mesures morphométriques des otolithes (longueur antéro-postérieure, largeur dorso-ventrale, périmètre et aire de l'otolithe) et sont souvent utilisés de manière couplée (Tab. 1). Si les mesures morphométriques sont directement liées à la taille de l'otolithe, les indices morphométriques sont, quant à eux, totalement indépendants de la taille de l'otolithe. Ces indices permettent de représenter les patrons de forme de l'otolithe dans un plan à 2 dimensions (Tuset *et al.*, 2003).

Tableau 1 : Liste des différents indices de forme avec les formules mathématiques correspondantes basées sur les 4 principales mesures morphométriques de l'otolithe (OA : aire ; OP : périmètre ; OW : largeur dorso-ventrale et OL : longueur antéro-postérieure).

Indices de Forme	Formules
Facteur de Forme (FF)	$(4\pi OA) / OP^2$
Ratio d'Aspect (AR)	OL / OW
Rondeur (RD)	$(4OA) / (\pi OL^2)$
Circularité (C)	OP^2 / OA
Ellipticité (E)	$(OL-OW) / (OL+OW)$
Rectangularité (R)	$OA / (OL.OW)$

Ils caractérisent tous la forme de l'otolithe par rapport à une forme géométrique de référence comme un cercle pour la circularité, la rondeur et le facteur de forme, un rectangle pour la rectangularité, une ellipse pour l'ellipticité, et un carré pour le ratio d'aspect. Ils sont simples à obtenir et l'interprétation biologique des résultats associés est moins complexe que celle des résultats obtenus à partir de données multivariées (Cadrin et Friedland, 1999 ; Stransky et MacLellan, 2005).

La méthode Géométrique ou **Géomorphométrique** est une autre approche multivariée qui se base sur les coordonnées de points homologues ou points de référence (landmarks en anglais ; Fig. 12) qui correspondent à des points morphologiques remarquables (Bookstein, 1991 ; Dryden et Mardia, 1998). Monteiro *et al.* (2005), qui ont analysé des espèces de scianidae, et Ponton (2006), qui a étudié 4 espèces tropicales de la famille des engraulididae en Nouvelle Calédonie, ont montré que cette technique pouvait donner de bons résultats en termes de description de la forme des otolithes pour identifier les espèces. La technique consiste à comparer les coordonnées des points homologues après superposition des réseaux de points de tous les otolithes par uniformisation d'échelle, translation et rotation par une transformation dite Procruste (Gower, 1975; Kendall, 1977 ; Rohlf et Slice, 1990; Dryden et Mardia, 1998). Celle-ci vise à minimiser les distances entre points homologues, dites

distances de Procruste, et à en prendre la mesure afin de décrire la forme des otolithes par rapport à une forme de référence généralement prise comme la forme moyenne ou consensus (Gunz et Mitteroecker 2013). Cependant, il est difficile d'identifier un nombre de points homologues suffisant sur le contour des otolithes. En effet, souvent la diversité de la forme des otolithes ne permet pas d'identifier des points morphologiques remarquables reconnaissables d'un individu à l'autre et pouvant donc être considérés comme homologues. Ainsi, les études basées sur cette méthode font fréquemment usage de points semi-homologues (semi-landmarks en anglais), qui sont obtenus par une découpe géométrique du contour de l'otolithe, et non pas de points homologues, directement remarquables à partir de la morphologie de l'otolithe (Ponton, 2006; Ramirez-Perez *et al.*, 2010; Vergara-Solana *et al.*, 2013). Cette méthode utilisant les points semi-homologues, est appelée la méthode des contours (Bookstein, 1997).

Les **transformations en ondelettes** (*Wavelet transform*) constituent aussi une troisième méthode d'analyse multivariée développée comme alternative à l'EFA. Elle utilise la décomposition d'un signal en ondelettes basée sur une fonction oscillatoire (Fig. 12; Lombarte et Tuset, 2005 ; Parisi-Baradad *et al.*, 2005). Elle est particulièrement recommandée, par rapport à l'EFA, lorsque les otolithes présentent des formes très complexes (Libungan *et al.*, 2015). Enfin, il existe d'autres méthodes multivariées mais beaucoup moins utilisées comme la géodésie (Nasreddine *et al.*, 2009 ; Benzinou *et al.*, 2013), la dimension fractale (Duarte-Neto *et al.*, 2008) et l'espace de l'échelle de courbure (*Curvature Scale Space, CSS* ; Mapp *et al.*, 2013).

Le couplage des données univariées, biologiquement faciles à interpréter, avec des données multivariées, qui permettent une grande précision dans la description de la forme de l'otolithe, permet d'augmenter le pouvoir discriminant des analyses (Galley *et al.*, 2006 ; Cañas *et al.*, 2012) par rapport à l'utilisation d'une méthode d'extraction de données multivariées seule. Le

choix de cette dernière se base d'une part sur la problématique de l'étude et d'autre part sur la complexité de la forme de l'otolithe de l'espèce étudiée. Certaines études ont comparé différentes approches comme l'EFA, la méthode géométrique et les transformations en ondelettes. Les résultats de classification des individus en fonction de la forme de leur otolithe sont généralement similaires (Loy *et al.*, 2000 ; Sadighzadeh *et al.*, 2012 ; Benzinou *et al.*, 2013 ; Libungan et Pálsson, 2015 ; Song *et al.*, 2019). Cependant, l'EFA étant basée sur une description de la totalité du contour, elle permet en général de mieux intégrer toutes les informations liées à la variabilité morphologique et de reconstruire plus précisément les contours à partir d'un nombre limité d'harmoniques selon une transformée inverse. La géomorphométrie, quant à elle, segmente l'otolithe permettant d'identifier les zones du contour où s'exprime la variabilité entre individus. Enfin, dans le cas d'otolithes présentant des formes particulièrement complexes, la méthode des transformations en ondelettes peut être comparable à l'EFA (Libungan *et al.*, 2015). Dans le cadre de cette thèse, pour la totalité des études, il a été décidé de combiner des données univariées avec l'EFA afin de décrire la forme des otolithes.

1.8 Objectifs de la thèse

La forme de l'otolithe est principalement utilisée comme outil pour discriminer les stocks de poissons. Le nombre annuel de travaux appliquant cette approche sur des cas d'études à travers le monde ne cesse d'augmenter. Pourtant, l'utilisation de cette technique pour identifier les stocks halieutiques nécessite une bonne connaissance des différentes sources de variabilité de la forme de l'otolithe, et de leurs interactions pour comprendre ce qui est réellement analysé. En effet, la morphogenèse de l'otolithe résulte de la combinaison des effets environnementaux, génétiques et ontogéniques de l'organisme étudié en interaction avec des processus de régulation développementale pouvant eux-mêmes influencer les effets potentiels préalablement cités. Cependant, les études concernant la compréhension de la morphogenèse des otolithes restent très peu nombreuses.

Cette thèse s'organise en trois chapitres pour, d'une part, apporter des réponses à des questions opérationnelles concernant la mise en place de l'échantillonnage et l'extraction de l'information contenue dans la forme de l'otolithe pour identifier les stocks et, d'autre part, contribuer à une meilleure compréhension des facteurs influençant la morphogenèse des otolithes et par conséquent la discrimination des stocks. Des études à la fois *in situ* et expérimentales ont été réalisées pour répondre aux questions suivantes:

- ✓ **Objectif 1** : Peut-on utiliser la forme des otolithes comme outil d'identification des stocks de poissons chez des espèces avec des traits écologiques très différents (Chapitres I et II)
? La variabilité spatio-temporelle de la forme des otolithes est étudiée chez 3 espèces appartenant à des groupes écologiques (grand et petit pélagiques, espèce démersale) et des environnements biogéographiques (hémisphère Nord et Sud, 2 océans et 1 mer) différents. Nous avons choisi comme cas d'études, l'espadon (*Xiphias gladius*, grand pélagique) dans l'océan Indien (de l'Afrique du Sud jusqu'au Sri Lanka), le merlan bleu

(*Micromesistius poutassou*, petit pélagique) dans le Nord-Est de l’océan Atlantique (du sud du Portugal jusqu’au nord de la Norvège) et la bogue (*Boops boops*, espèce démersale) en mer Méditerranée essentiellement (des îles Canaries jusqu’à la mer Egée). Ces 3 espèces ont des caractéristiques écologiques et biologiques très différentes avec notamment des capacités natatoires très variables allant de très rapides pour l’espadon, à rapide pour le merlan bleu et plus lent ou moins mobile pour la bogue. Les otolithes ayant une fonction dans la détection des accélérations linéaires qui résultent des mouvements du corps et de la nage du poisson (Lowenstein et Roberts, 1949 ; Flock, 1964 ; Schulz-Mirbach *et al.*, 2019), les poissons présentant des capacités de nage rapide tendent à avoir des otolithes plus allongés que ceux d’espèces benthiques moins mobiles (Volpedo *et al.*, 2008; Tuset *et al.*, 2015). Ainsi, ces 3 espèces de poissons présentent de très grandes différences en termes de complexité de forme de leurs otolithes. Les différences de capacité natatoire ou de mobilité vont également se traduire dans les patrons de migration des 3 espèces. L’espadon peut potentiellement réaliser de très grandes migrations alors que la bogue est beaucoup moins mobile et est donc susceptible de présenter plus facilement des groupes isolés de par leur comportement face à des barrières géographiques, des fronts hydrologiques ou thermiques. Ces 3 études ont été réalisées sur de très larges échelles géographiques représentant une grande partie de l’aire de distribution des 3 espèces. Elles incluent aussi pour chacune des barrières physiques potentielles ou des fronts hydrologiques ou thermiques de façon à analyser leurs réponses face à ces ruptures d’environnement.

- ✓ **Objectif 2** : Y a-t-il des facteurs pouvant biaiser l’identification des stocks halieutiques sur la base de la variation de forme des otolithes et comment peuvent-ils être pris en compte (Chapitre II essentiellement) ? Parmi les facteurs confondants déjà connus, le sexe, l’âge (Castonguay *et al.*, 1991), la taille corporelle (Hüssy, 2008) et la maturité

sexuelle (Cardinale *et al.*, 2004 ; Mériqot *et al.*, 2007) sont identifiés comme pouvant être impactant pour la forme de l'otolithe. Un autre facteur à prendre en compte lors des analyses de discrimination basées sur la forme des otolithes est l'asymétrie bilatérale directionnelle (AD) qui peut exister entre les otolithes droit et gauche. Ce type d'asymétrie a déjà été étudié chez des espèces de poissons plats et ronds (Mille, 2015) mais n'a pas été pris en compte dans les études de discrimination des stocks. Ainsi, dans cette thèse, l'AD a été évaluée sur toutes les espèces analysées. Pour le cas de la bogue, une AD ayant été constatée, une analyse a été menée pour tester dans un premier temps si son amplitude et sa direction pouvaient être liées à la zone géographique étudiée. Dans un second temps, l'analyse d'identification de stocks a été réalisée parallèlement à partir des données de l'otolithe droit, de l'otolithe gauche et des 2 otolithes ensemble pour estimer si AD pouvait avoir un effet significatif sur l'identification des stocks.

- ✓ **Objectif 3** : Quel est l'effet de la température sur la forme de l'otolithe (Chapitre III) ? La température, facteur environnemental structurant de l'écosystème, a un effet significatif sur la forme de l'otolithe. Cela a été principalement testé chez la morue. Ainsi, une étude expérimentale (Hüssy, 2008) comparant des morues évoluant dans des bassins à différentes températures montre que le niveau de crénulation du contour des otolithes est corrélé positivement à la température, résultat vérifié par la suite lors d'une étude *in situ* (Irgens, 2018). Comme expliqué précédemment (partie 1.6.1), la variabilité spatiale de la température devrait faciliter l'identification de stocks puisqu'augmentant a priori la variation inter-population de la forme des otolithes par rapport à la variation intra-population. Cependant, dans un contexte global de réchauffement climatique, le changement ou la modification de température au cours du temps peut avoir des effets sur la morphogenèse de l'otolithe et donc sa forme externe qui viennent brouiller le signal spatial. De ce fait, le chapitre III regroupe deux études expérimentales menées sur le bar

(*Dicentrarchus labrax*) pour tester l'influence du facteur température lors des premiers stades de vie du poisson dans des conditions contrôlées. Le bar n'appartenant pas à la famille des gadidae comme la morue, il ne présente pas particulièrement d'otolithes très crénelés. Le choix de cette espèce est donc intéressant pour comparer les résultats avec ceux déjà observés chez la morue. Dans la première étude, les bars (entre 0 et 200 jours post-fertilisation) ont été élevés dans des bassins de températures différentes de 15°C et 20°C. La deuxième étude, quant à elle, a simulé un changement d'habitat ou un réchauffement de l'eau avec des transferts de poissons de 16°C à 21°C (entre 0 à 150 jpf). Les 2 températures testées pour l'étude 2 sont plus élevées de 1°C car les individus utilisés sont issus de souche méditerranéenne et non pas atlantique comme pour l'étude 1. Les valeurs de température des deux études correspondent aux fenêtres thermiques optimales pour les stades larvaires et juvéniles de bar (Claridge et Potter, 1983 ; Jennings et Pawson, 1992 ; Pickett et Pawson, 1994 ; Alami-Durante *et al.*, 2006). De plus, dans le cadre du réchauffement climatique, des modèles ont simulés une évolution du climat avec un réchauffement de l'ordre de 4°C à 7°C d'ici à 2100 (IPCC, 2014 et les dernières communications du CEA datant de septembre 2019). Ainsi, cet objectif s'attache d'une part à comparer la morphogenèse de l'otolithe pour des poissons se développant dans 2 habitats caractérisés par des températures constantes différents (étude 1) et d'autre part à tester si des changements de régime thermique, potentiellement lié à un changement d'habitat, intervenant à différents stades de vie du poisson impactaient la trajectoire de la morphogenèse de l'otolithe de la même façon. Pour analyser l'effet de la température sur la forme des otolithes, le concept d'unité thermique a été utilisé. Il repose sur le nombre de degrés-jours de croissance emmagasiné par l'individu (Neuheimer et Taggart, 2007). Cette approche par degrés-jours quantifie les opportunités thermiques de croissance en agrégeant les températures pertinentes pour la croissance. Bien que son utilisation soit

très largement répandue en agronomie depuis maintenant plus de trois siècles (Bonhomme 2000 ; Trudgill *et al.*, 2005), elle reste mineure dans les sciences halieutiques. Dans cette thèse, la pertinence de l'approche par degrés-jours pour quantifier et comprendre l'effet de la température sur la morphogenèse de l'otolithe a été évaluée en la comparant à une approche dite classique utilisant directement la température et le nombre de jours écoulés dans les bassins. Son utilisation facilite aussi la comparaison des résultats obtenus à partir de poissons issus de sources génétiques atlantique et méditerranéenne de façon à analyser l'interaction des effets génétique et thermique sur la forme des otolithes.

- ✓ **Objectif 4** : Quel est l'effet de la composition du bol alimentaire sur la forme de l'otolithe (Chapitre III) ? Des études ont montré que la quantité ou la composition du bol alimentaire pouvaient modifier la forme des otolithes (Mosegaard *et al.*, 1988 ; Hüseyin, 2008 ; Mille, 2015). Le changement global induit des effets d'acidification et de désoxygénation de l'eau de mer qui pourraient modifier la base des réseaux trophiques marins, notamment les assemblages d'espèces de phytoplancton, avec de potentielles conséquences négatives sur la production d'acides gras polyinsaturés oméga-3 (n-3AGPI) (Ackman et Tocher, 1968 ; Thompson *et al.*, 1992 ; Renaud *et al.*, 2002 ; Guschina et Harwood 2006 ; Capuzzo *et al.*, 2018). Ces n-3AGPI sont dits essentiels pour les poissons comme pour les autres niveaux supérieurs du réseau trophique car ceux-ci ne peuvent les synthétiser et ne peuvent donc se les procurer qu'à partir de leur alimentation. De plus, le niveau de n-3AGPI dans l'alimentation des poissons détermine en partie leurs performances de nage (Chatelier *et al.*, 2006). La capacité de nage des poissons est un facteur corrélé à la forme des otolithes à l'échelle inter-spécifique et il serait intéressant de voir si des patrons similaires sont observables à l'échelle intra-spécifique du fait d'effets environnementaux comme la disponibilité en n-3 AGPI (Volpedo *et al.*, 2008;

Tuset *et al.*, 2015). D'autre part, le métabolisme et donc la croissance du poisson peuvent être influencés par le taux de n-3AGPI dans l'alimentation et impacter indirectement la forme de l'otolithe au travers d'effets ontogéniques (Mille, 2015 ; Gourtay, 2018). Ainsi, pour tester l'effet de la composition du bol alimentaire en n-3AGPI sur la morphogénèse des otolithes, une étude expérimentale a été menée sur le bar où des groupes d'individus similaires ont été soumis à 2 taux alimentaires de n-3AGPI (niveau bas dans des aliments produits à partir de farines de Colza/niveau haut dans des aliments produits à partir de farines de poisson) dès 93 jpf (c'est-à-dire dès que les poissons se nourrissent à partir d'une alimentation sèche) jusqu'à 200 jpf. Le traitement alimentaire a été croisé selon un plan factoriel avec un traitement thermique comprenant 2 régimes de température constante de 15°C et 20°C dans le cadre de l'étude 1 décrite en objectif 3 pour pouvoir observer l'effet d'interaction entre ces 2 facteurs sur la forme de l'otolithe puisque réchauffement climatique et diminution en apports de n-3 AGPI sont attendus de façon concomitante dans le cadre du changement climatique.

1.9 Choix des modèles biologiques

Afin de répondre aux différents objectifs de la thèse, 4 modèles biologiques ont été sélectionnés :

- Objectif 1 : le merlan bleu (*Micromesistius poutassou*), l'espardon (*Xiphias gladius*) et la bogue (*Boops boops*)
- Objectif 2 : la bogue (*Boops boops*)
- Objectif 3 : le bar commun (*Dicentrarchus labrax*)
- Objectif 4 : le bar commun (*Dicentrarchus labrax*)

Les critères sur lesquels nous nous sommes appuyés pour choisir ces modèles biologiques sont différents selon les objectifs de la thèse mais ces 4 espèces fournissent un panel d'otolithes très différents avec des formes très diverses (Fig. 13) dans des écosystèmes extrêmement diversifiés (Fig. 14).

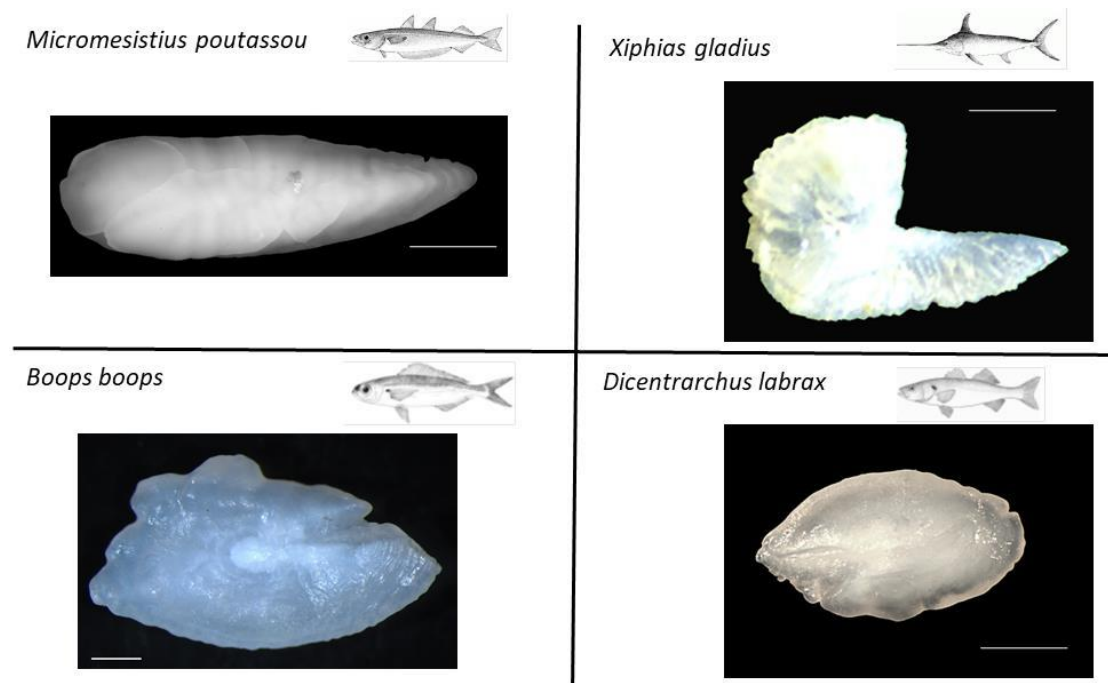
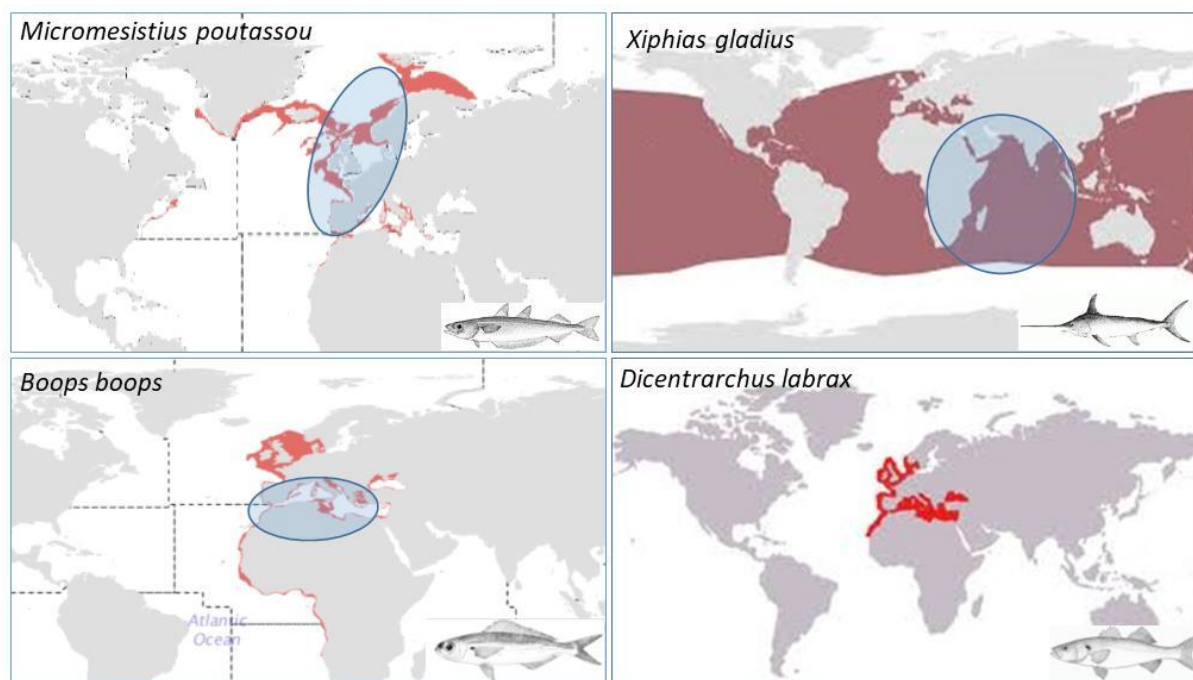


Figure 13: Présentation de la forme générale des otolithes en fonction de l'espèce étudiée (barre d'échelle représente 1 mm).



1.9.1 Merlan bleu (*Micromesistius poutassou*)

Le merlan bleu (*Micromesistius poutassou* ; Risso, 1827) est un gadidé bathypélagique, vivant généralement entre 300 et 600 mètres de profondeur. La FAO identifie cette espèce comme l'espèce la plus pêchée en Atlantique Nord-Est avec une capture internationale annuelle supérieure au million de tonnes, ce qui la place au 14^{ème} rang des espèces marines les plus pêchées au monde en 2016 (FAO, 2018). En Atlantique Nord-Est, son aire de répartition s'étend du sud de la mer de Barents à l'est de la mer de Norvège et au large de l'Islande, et au sud, de la Méditerranée jusqu'au Cap en Afrique. Cependant, la plus grande partie de la population se trouve le long de la marge continentale orientale du bassin Atlantique, migrant chaque année vers les frayères situées à l'Ouest des îles britanniques au début de l'hiver (Hatün *et al.*, 2009). Dans cette zone géographique, plusieurs études parcellaires suggèrent l'existence de 2 populations (Skogen *et al.*, 1999 ; Ryan *et al.*, 2005 ; Brophy *et al.*, 2007 ; Was *et al.*, 2008). Dans le cadre de cette thèse, j'ai utilisé l'analyse de forme des otolithes pour

étudier la structuration de la population de merlan bleu en Atlantique Nord-Est. Un échantillonnage réalisé en grande partie avec l'aide de bateaux de pêche professionnels a été réalisé afin de couvrir une bonne partie de l'aire de répartition de l'espèce.

1.9.2 Espadon (*Xiphias gladius*)

L'espadon (*Xiphias gladius*, Linné, 1758) fait partie des espèces de poissons à rostre les plus exploitées par les pêcheries pélagiques. En océan Indien, l'espadon est une ressource marine à haute valeur commerciale aussi bien pour la consommation locale que pour l'export vers les pays d'Europe et d'Asie. Ce poisson est connu pour être un grand migrateur avec par exemple des individus recapturés à plus de 6 000 km de leur lieu de marquage (Kadagi *et al.*, 2011). La migration de l'espadon est cependant un phénomène complexe et mal connu, avec des individus pouvant migrer sur plus de 3 000 km en 90 jours et d'autres rester dans un rayon de 20 km dans ce même laps de temps (Palko *et al.*, 1981; Sedberry et Loefer, 2001). Ce phénomène est encore plus complexe dans le cas de l'océan Indien qui est connu pour regrouper un grand nombre d'écosystèmes marins très différents les uns des autres (Sherman et Hempel, 2008) et présenter des caractéristiques océanographiques particulières (Longhurst, 1998; Schott *et al.*, 2009). Pour cette espèce, nous avons couplé l'analyse de forme des otolithes avec une étude génétique (Muths *et al.*, 2013) pour discriminer les stocks d'espadons dans l'océan indien. Ce couplage permet de pouvoir directement comparer les résultats de ces 2 approches.

1.9.3 Bogue (*Boops boops*)

La bogue (*Boops boops*; Linné, 1758) est une espèce de la famille des sparidés particulièrement abondante en mer Méditerranée, avec le 7^{ième} rang des espèces débarquées dans cette zone (FAO, 2016). On la trouve aussi en Atlantique Nord-Est. C'est une espèce grégaire démersale. La discrimination des stocks de cette espèce a été réalisée par l'analyse de forme des otolithes droit et gauche en s'intéressant aux variations spatiales de l'asymétrie

directionnelle des otolithes et à ses conséquences en terme d'interprétation de la discrimination des stocks.

1.9.4 Bar commun (*Dicentrachus labrax*)

Le bar commun (*Dicentrachus labrax* ; Linné, 1758) est une espèce de la famille des moronidés présente en Atlantique Nord-Est, mer Baltique et mer Méditerranée. C'est une espèce eurytherme et euryhaline, capable de supporter de grands écarts de température (de 2°C à 32°C) et de grandes variations de salinité (de 0,5 à 40). Elle est très ciblée par la pêche professionnelle mais aussi la pêche dite de loisir. De plus, c'est une espèce élevée en aquaculture et donc qui a été très étudiée au niveau expérimental. A ce titre, son cycle de vie est bien connu et elle est devenue une espèce modèle en expérimentation animale. C'est pourquoi les 2 études expérimentales de cette thèse s'appuient sur cette espèce de façon à pouvoir suivre les effets de paramètres environnementaux sans avoir de problèmes liés à la zootechnie. De plus, étant donné que l'effet du facteur température a été essentiellement testé sur la morphogenèse de l'otolithe de morue, dont les otolithes sont crénelés, ce choix de modèle biologique permettra de pouvoir généraliser ou non les résultats observés chez la morue. Enfin, pour tester l'effet de la composition du bol alimentaire en n-3AGPI sur la forme de l'otolithe, des études ont déjà été menées sur cette espèce mais à des taux de n-3AGPI plus faibles (Mille, 2015) donc cela permettra de compléter la connaissance sur les effets du taux de n-3AGPI.

Chapitre I : Variations spatio-temporelles de la forme des otolithes

2.1 Introduction générale du Chapitre I

Un grand nombre de méthodes est utilisé pour identifier les stocks halieutiques. Une revue des rapports annuels réalisés par un groupe d'experts, le SIMWG (Stock Identification Methods Working Group), en charge de cette problématique au CIEM depuis 1997, a montré que la part des études utilisant la forme des otolithes pour répondre à cette question ne cesse d'augmenter. Cet engouement est dû en grande partie aux progrès méthodologiques réalisés en termes d'acquisition d'images et de traitements des données, aux faibles coûts d'analyse par rapport à des études génétiques ou de microchimie par exemple et enfin à la pertinence des résultats obtenus pour identifier les unités de gestion. Ainsi, ce premier chapitre s'intéresse aux variations spatio-temporelles de la forme des otolithes pour discriminer les stocks.

Deux cas d'études sur des espèces à très forte valeur commerciale que sont l'espadon (*Xiphias gladius*, grand pélagique) dans l'hémisphère Sud et le merlan bleu (*Micromesistius poutassou*, petit pélagique) dans l'hémisphère Nord ont été sélectionnés. Ces deux espèces sont pélagiques et migratrices rendant *a priori* l'identification de stocks plus difficile que pour des espèces ayant des capacités locomotrices et des comportements migratoires plus limités. Du fait de leur large distribution géographique et de leur comportement migratoire, il a été décidé de travailler à grande échelle, à savoir l'Atlantique Nord Est (du sud du Portugal jusqu'au nord de la Norvège) pour le merlan bleu et l'océan Indien (de l'Afrique du Sud jusqu'au Sri-lanka) pour l'espadon. Ce choix permet de prendre en compte des barrières géographiques et des fronts hydrologiques ou thermiques pouvant potentiellement structurer les populations.

Concernant plus particulièrement l'espadon, les schémas de migration de l'espèce sont très difficiles à analyser et mal connus. Ce cas d'étude est donc particulièrement intéressant pour évaluer la pertinence de l'analyse de la forme de l'otolithe pour discriminer des stocks halieutiques. L'intérêt de cette étude est que les mêmes individus ont parallèlement servi à réaliser une étude de structure de population à partir de marqueurs génétiques permettant ainsi de comparer les résultats obtenus à partir de ces 2 types d'approches. Concernant le merlan bleu en Atlantique Nord, plusieurs études à petite échelle, utilisant des marqueurs génétiques, la forme des otolithes ou les parasites, suggèrent l'existence de 2 stocks structurés selon un gradient latitudinal. Ainsi, l'étude réalisée dans le cadre de cette thèse vise à infirmer ou à confirmer les précédents résultats et à les comparer selon les méthodes utilisées et les échelles spatio-temporelles.

Lors de ces 2 études en milieu naturel, préalablement à l'analyse d'identification de stocks, plusieurs facteurs influençant potentiellement la forme de l'otolithe ont été testés. C'est le cas de facteurs individuels comme le sexe et la taille du poisson ; en ce qui concerne la maturité sexuelle, le choix a été fait de ne prendre que des individus adultes. D'un point de vue méthodologique, un développement a consisté à automatiser l'étape d'acquisition des images des otolithes entiers à l'aide d'un scanner de sorte qu'un grand nombre d'individus soit traité à la fois et de manière standardisée et à limiter ainsi les biais dus à cette étape importante dans les études basées sur la forme de l'otolithe. En plus de fournir une information à grande échelle sur la structuration des stocks de merlans bleus et d'espadons, ces 2 études nous renseignent sur l'importance de certains facteurs qui peuvent influencer sur la forme de l'otolithe.

2.2 Etude 1 : Identifying blue whiting (*Micromesistius poutassou*) stock structure in the Northeast Atlantic by otolith shape analysis

Mahé K, Oudard C, Mille T, Keating JP, Gonçalves P, Clausen LW, Petursdottir G, Rasmussen H, Meland E, Mullins E, Pinnegar JK, Hoines A, Trenkel V (2016). Identifying blue whiting (*Micromesistius poutassou*) stock structure in the Northeast Atlantic by otolith shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 73(9), 1363-1371.

2.2.1 Abstract

Information on stock identification and spatial stock structure provide a basis for understanding fish population dynamics and improving fisheries management. In this study, otolith shape analysis was used to study the stock structure of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) in the northeast Atlantic using 1693 samples from mature fish collected between 37°N and 75°N and 20°W and 25°E. The results indicated two stocks located north and south of ICES Divisions VIa and VIb (54°5N to 60°5N, 4°W to 11°W). The central area corresponds to the spawning area west of Scotland. Sampling year effects and misclassification in the linear discriminant analysis suggested exchanges between the northern and southern stocks. The results corroborate previous studies indicating a structuring of the blue whiting stock into two stocks, with some degree of mixing in the central overlap area.

2.2.2 Résumé

L'identification et la connaissance de la structuration spatiale de stocks sont essentielles pour étudier la dynamique des populations de poissons et ainsi gérer les pêcheries. Dans cette étude, la forme des otolithes a été employée pour comprendre la structuration des stocks des merlans bleus (*Micromesistius poutassou*) dans le nord-est de l'Océan Atlantique à partir de 1693 poissons matures échantillonnés entre 37°N–75°N et 20°O–25°E. Les résultats indiquent la présence de deux stocks situés au nord et au sud, respectivement, des divisions VIa et VIb du CIEM (de 54°5N à 60°5N, de 4°O à 11°O). La zone centrale correspond à la zone de frai à

l'ouest de l'Écosse. Les effets du facteur année d'échantillonnage et la mauvaise classification dans l'analyse linéaire discriminante suggèrent des échanges entre les composants nordique et méridionale. Ces résultats corroborent des études antérieures indiquant une structuration des merlans bleus en deux stocks avec un certain niveau de mélange dans la zone de chevauchement.

2.2.3 Introduction

Blue whiting (*Micromesistius poutassou*) is a pelagic gadoid whose distribution in the northeast Atlantic extends from Spitsbergen in the north to Morocco in the south (Zilanov 1968; Bailey 1982; Heino and Godø 2002; Monstad 2004; ICES 2012). The blue whiting fishery is one of the largest in the north Atlantic (Trenkel et al. 2014). Several European nations have extensively fished on this species, especially since the late 1990s, with annual catches ranging from 100 000 to 2 400 000 tonnes (ICES 2013). The most important spawning areas are located to the west of Scotland and Ireland, in the water column at the shelf break at depths of 250 to 450 metres (Bailey 1982; Isaev and Seliverstov 1991; Stetal 2006). Juveniles and adults make annual migrations in early summer to the main feeding areas, located primarily in the Norwegian Sea in the north and in the Celtic Sea and Bay of Biscay in the south (Bailey 1982; Carrera et al. 2001, Fig. 15).

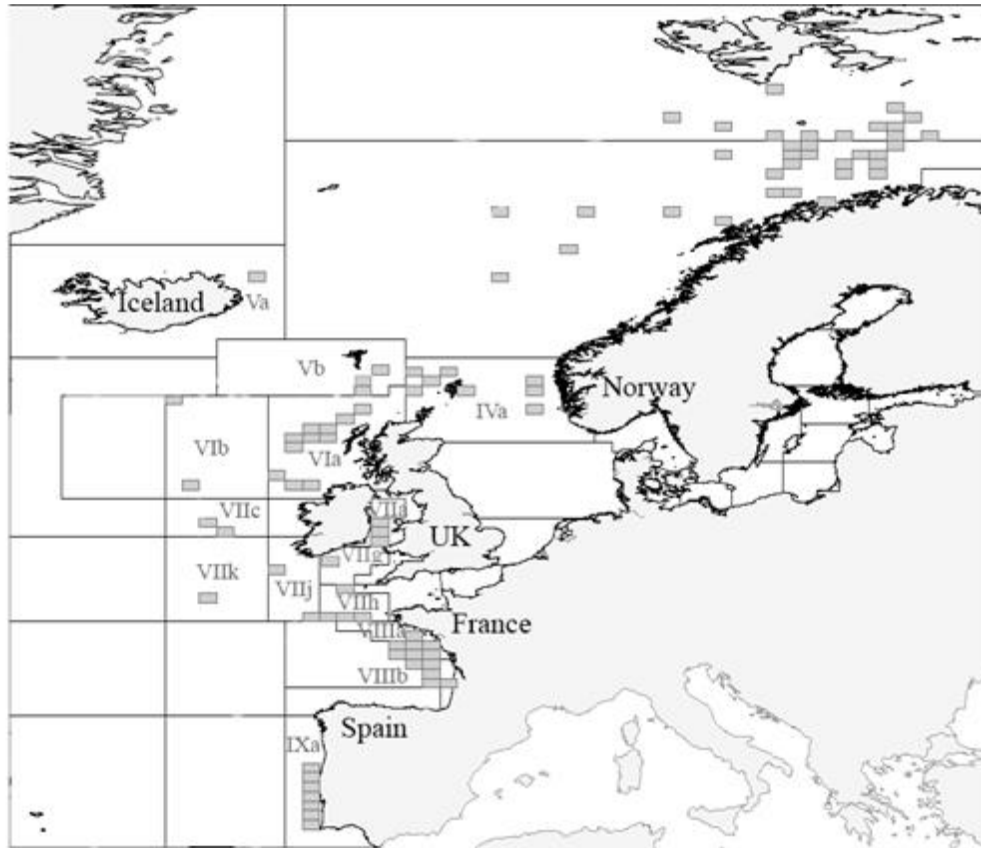


Figure 15: Map of location of blue whiting samples collected between 2006 and 2011. Blue whiting feeding areas are located in the Norwegian Sea (IIa & IIb), the Celtic Sea (VIIg-j) and the Bay of Biscay (VIIIa & b).

Stock identification and information on spatial structure provide a basis for understanding population dynamics and in turn to improve fisheries management. Several techniques can be used for stock identification, including tagging experiments, analysis of spatial variation of genetic or morphometric markers, differentiation of life-history variables, parasites and contaminant concentrations (Pawson and Jennings 1996; Cadrin et al. 2014). Otolith shape analysis is an efficient stock identification tool linked to genetic heterogeneity and the influence of environmental factors on otolith shape (Cadrin and Friedland 1999; Campana and Casselman 1993; Torres et al. 2000; Cardinale et al. 2004; Swan et al. 2006; Vignon et Morat 2010).

Otolith morphology is influenced by biotic and abiotic factors (Cardinale et al. 2004; Capoccioni et al. 2011). Analysis of the outer shape of otoliths has previously been used for

stock discrimination of various species (haddock: Begg and Brown 2000; cod: Galley et al. 2006; Petursdottir et al. 2006, Stransky et al. 2008; striped red mullet: Benzinou et al. 2013). Legua et al. (2013) applied otolith shape analysis to identify two distinct stocks of southern blue whiting (*Micromesistius australis*), an Atlantic and a Pacific stock.

Several basic descriptors exist to describe the external contour of otoliths (e.g., coefficient of form, roundness, circularity, rectangularity and ellipticity) in addition to more complex geometric morphometric analyses (Ponton 2006; Ramirez-Perez et al. 2010; Vergara-Solana et al. 2013), wavelet functions (Parisi et al. 2005; Sadighzadeh et al. 2014) and the geodesic method (Benzinou et al. 2013). Of these, the elliptical Fourier analysis currently remains the most widely used and powerful method to describe otolith external shapes (Aguera and Brophy 2011; Capoccioni et al. 2011; Fergusson et al. 2011; Legua et al. 2013; Paul et al. 2013). This method has the advantage of being unaffected by short-term changes in fish condition (Campana and Casselman 1993) due to environmental variations (Campana 1999). Nevertheless, its biological interpretation is more complex than that of linear morphometric descriptors (Stransky and MacLellan 2005). Some studies have combined the elliptical Fourier analysis and some basic descriptors of otolith contours to help interpretation of results (Campana and Casselman 1993; Begg and Brown 2000; Galley et al. 2006; Merigot et al. 2007; Fergusson et al. 2011; Legua et al. 2013).

For blue whiting, all previous morphological, physiological, genetic, parasite and otolith shape research suggested the existence of at least two stock components in the north-east Atlantic, though the spatial range differed between studies (Karasev 1990; Isaev and Seliverstov 1991; Skogen et al. 1999; Ryan et al. 2005; Brophy et King 2007; Was et al. 2008; Keating et al. 2014). However, these studies focused primarily on the spawning grounds west of Ireland and regions further north, with very few samples from the southern part of the range, i.e. the Bay of Biscay and areas further to the South.

In the current study, analysis of the perimeter and elliptical Fourier descriptors of sagittal otoliths were combined. The otolith shape analysis were performed to discriminate stock components of blue whiting in the north-east Atlantic using individuals sampled over a wide geographic area, from Portuguese waters to Spitsbergen and Iceland.

2.2.4 Materials and methods

2.2.4.1 Sample collection

Blue whiting samples from ten ICES Divisions between Spitsbergen and the Portuguese waters (Fig. 15) were collected in 2006, 2008, 2010 and 2011 by seven institutes (IFREMER, France; CEFAS, UK (England and Wales); IMR, Norway; DTU, Denmark; MRI, Iceland, AFBI, UK (Ireland) and IPMA, Portugal) during international scientific surveys, on-board fishing vessels and from fish markets. This collection includes all samples used by Keating et al. (2014).

Sex and maturity of the sampled individuals was determined by macroscopic examination of gonadal maturity. Only mature fish were included in this study to minimize the effect of sexual maturity which can change otolith shape (Cardinale et al. 2004). This yielded a total of 1693 mature individuals ranging from 16 to 42 cm total length (mean 27.80, Tab. 2), corresponding to ages 1 to 13 years. The size for the 878 females ranged from 16 to 42 cm, while the 537 males had sizes from 16 to 35 cm total length. Sagittal otoliths were extracted from all 1693 fishes; all otoliths were weighed.

2.2.4.2 Otolith shape analysis

Blue whiting otoliths are flat with rounded dorsal and ventral margins. The *rostrum* is large and straight and therefore, the *antirostrum* is indistinct (Fig. 16). Images of the whole left sagittal otoliths were scanned (Epson V750) under reflected light and stored with high resolution (3200 dpi). Image processing was performed using the image analysis system

TNPC (Digital processing for calcified structures, version 7, www.tnpc.fr) with the *sulcus acusticus* facing up. Otolith length and width were measured and the contour of each otolith was extracted using the automatic threshold in the TNPC software. To describe otolith contours, Elliptic Fourier Analysis (EFA; Lestrel 1997) was carried out. For each otolith, the first 99 elliptical Fourier harmonics (H_i) were extracted and normalised with respect to the first harmonic using the TNPC software and were, thus, invariant to otolith size and rotation and starting point of the shape measurements (Kuhl and Giardina 1982).

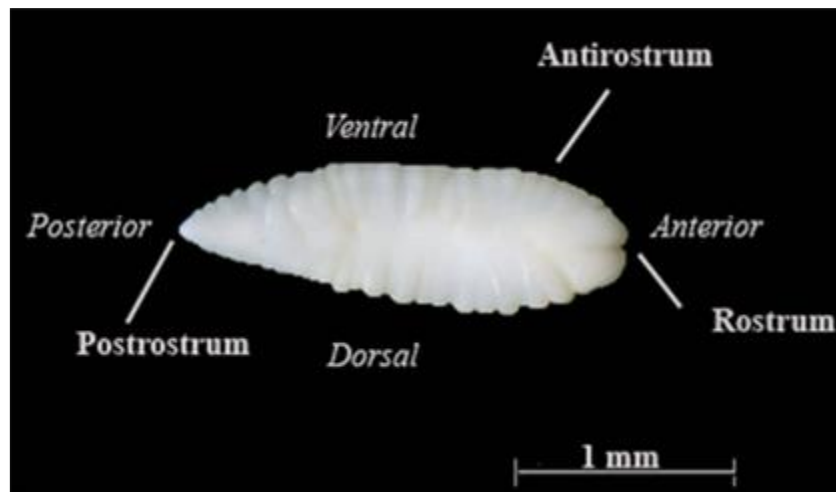


Figure 16: Photograph of a whole blue whiting otolith.

Table 2. Number of blue whiting otolith samples by year, sex (M: males, F: females) and ICES Division. Total length characteristics (mean±S.D.) are given in parentheses.

Area (ICES Division)	Sex	Year of sampling				Total
		2006	2008	2010	2011	
Norwegian Sea (IIa)	F			105 (32.1±2.8)		105 (32.1±2.8)
	M			96 (29.7±1.8)		96 (29.7±1.8)
Spitzbergen and Bear Island (IIb)	F			33 (33.4±2.2)		33 (33.4±2.2)
	M			9 (30.3±1.1)		9 (30.3±1.1)
Northern North Sea (IVa)	F		30 (28.0±1.5)	48 (28.1±5.6)	24 (22.1±3.7)	102 (26.7±4.9)
	M			67 (25.8±5.3)	20 (22.0±3.0)	87 (24.9±5.1)
Iceland Grounds (Va)	F	112 (27.4±2.1)			14 (31.5±1.3)	126 (27.8±2.4)
	M				52 (32.3±1.7)	52 (32.3±1.7)
Faroes Grounds (Vb)	F		26 (27.1±1.9)			26 (27.1±1.9)
	M		12 (26.3±1.0)			12 (26.3±1.0)
West of Scotland (VIa)	F			25 (30.9±1.2)	218 (33.0±2.8)	243 (32.8±2.7)
	M			35 (29.0±0.7)	81 (30.5±2.2)	118 (30±2.0)
Rockall (VIb)	F		30 (29.2±1.2)	15 (31.4±1.7)		45 (30.0±1.7)
	M		31 (26.7±0.7)	25 (29.3±1.3)		31 (27.9±1.6)
Irish Sea (VIIa)	F				16 (18.9±2.3)	16 (18.9±2.3)
	M				24 (17.5±1.4)	24 (17.5±1.4)
Porcupine Bank (VIIc)	F			28 (32.1±1.2)		28 (32.1±1.2)
	M			22 (29.5±0.9)		22 (29.5±0.9)
Celtic Sea (VIIg & h)	F	70 (25.1±4.1)				70 (25.1±4.1)
	M	32 (25.7±3.4)				32 (25.7±3.4)
Southwest of Ireland – West (VIIk)	F			23 (31.5±1.3)		23 (31.5±1.3)
	M			9 (29.7±0.7)		9 (29.7±0.7)
Bay of Biscay (VIIIa&b)	F	34 (22.2±3.5)			118 (24.2±4.4)	152 (23.3±4.3)
	M	12 (21.4±2.5)			118 (21.2±4.5)	113 (21.1±4.5)
Portuguese Waters – East (IXa)	F		24 (25.2±1.8)		16 (20.8±2.7)	40 (23.9±2.9)
	M		33 (22.6±2.4)		16 (23.0±1.5)	49 (22.7±2.2)

To determine the number of harmonics needed to reconstruct the otolith outline, the Fourier Power (PF) was calculated for each individual otolith k as a measure of the amount of contour rebuilt by each harmonic:

$$PF(n_k) = \sum_{HI=1}^{n_k} \frac{A_{HI}^2 + B_{HI}^2 + C_{HI}^2 + D_{HI}^2}{2} \quad (1)$$

Where A_{HI} , B_{HI} , C_{HI} and D_{HI} are the parameters of the HI th harmonic and n_k is the total number of harmonics included. The value of n_k was chosen such that $PF(n_k)$ explains 99.99% of variance in contour coordinates or, in other words, such that shape is reconstructed at 99.99% (Lestrel 2008).

2.2.4.3 Statistical analyses

Otolith perimeter was used as an integrative variable to study geographic and temporal differences in overall otolith shape. Keating et al. (2014) reported wider otoliths for a given otolith length for individuals sampled in the north-eastern part of the spawning area compared to the southwestern part; the perimeter should reflect such differences. Perimeter was modelled as a function of sex (factor), ICES Division (factor), sampling year (factor) and total length (linear) as well as all two-way interactions with length. For this, a linear model with Gaussian error distribution was fitted using stepwise variable selection based on AIC to select the final model. Total length was centred by subtracting the mean length in the data (27.86 cm) to decouple the estimation of the slope and intercept in the linear model. An analysis of covariance (ANCOVA) was carried out for the final model and a Tukey HSD (honest significant difference) post-hoc test was used for pairwise comparison between intercepts and slopes (for length) of ICES Divisions (α -level=0.05). To visualise geographic differences, the perimeter was predicted for the year 2010 for a total length of 28 cm (mean length in data set) and 38 cm.

To investigate potential explanations for otolith shape differences in more detail, multivariate analyses were carried out. To reduce the number of dimensions and to avoid collinearity

between shape descriptors, Principal Components Analysis (PCA) was applied to EFDs (Elliptical Fourier Descriptors) of otolith contours (Rohlf and Archie 1984). Significant principal components (PC) were selected with the 'broken stick method' (Legendre and Legendre 2012). This method assumes that if the total variance (sum of the eigenvalues) is divided randomly among the various components, then the expected distribution of the eigenvalues will follow a broken-stick distribution. The contribution of original variables to the corresponding eigenvectors (PC loadings) were analyzed to understand which shape features had most influence on each PC. Next, two Redundancy analyses (RDA) were carried out. RDA is an extension of multiple regressions to multivariate response data and an extension of principal component analysis (Legendre & Legendre 2012). The first RDA aimed at removing the variance explained by total fish length. In the second RDA, the residuals of the first RDA, referred to as RDA residual matrix, were related to the explanatory variables of interest, i.e. sex, ICES Division and sampling year. A permutation test was used to test the significance of each explanatory variable. The magnitude of multicollinearity between exploratory variables of interest, e.g. total length, sex, year of sampling and ICES Division was evaluated by calculating variance inflation factors (threshold value for VIF =10; Borcard et al. 2011).

To determine whether otoliths collected in different ICES Divisions could be distinguished based on their contour shapes, stepwise Linear Discriminant Analysis (LDA) was applied to select the discriminant variables among the Fourier harmonics (Rencher and Christensen 2012). To evaluate the resulting discriminant functions, the percentage correct classification of individuals to ICES Divisions was calculated using jack-knifed cross-validation and Wilk's lambda criteria (Klecka 1980).

Finally, a cluster analysis was performed on the normalised Fourier harmonics to group individuals with similar otolith contour shapes. For this, Ward's hierarchical algorithm based

on squared Euclidean distances was used. To visualise differences in otolith shape between groups of individual fishes, the average otolith shape of each group was formed by the outline reverse Fourier transform using the first 34 normalised harmonics.

All statistical analyses were performed using the ‘lsmeans’, ‘multcomp’, ‘Vegan’, ‘MASS’, ‘CAR’, ‘FactoMinR’, ‘HH’ and ‘Ellipse’ packages in the statistical environment R (R Core Team 2014).

2.2.5 Results

Otolith perimeter increased linearly with total length as expected (Fig. 17a). Linear modeling revealed that sex, ICES Division and year of sampling influenced both the intercept, corresponding to the perimeter for a 27.86 cm individual and the slope of the linear relationship between perimeter and total length ($R^2=0.94$).

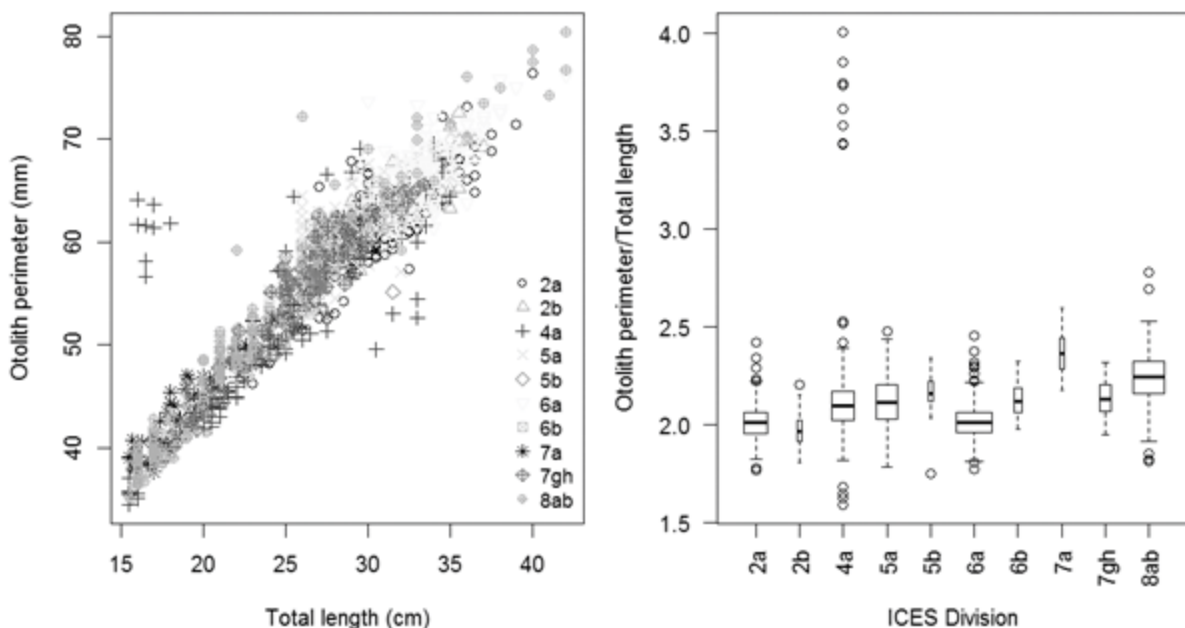


Figure 17: a) Scatterplot of otolith perimeter as a function of body length and b) predicted perimeter with 95% confidence intervals for best fitting linear model for male and female fish with 28 and 38 cm total length. Northern ICES Divisions are in grey.

The ANCOVA showed that sex was the most important variable for explaining variations in the intercept, with ICES Division and sampling year explaining less (Tab. 3). In contrast, year

was the most important factor for explaining variations in the slope (Tab. 3). Using a Tukey HSD pairwise comparison test, the intercept for ICES Division IXa was found to be significantly smaller ($p < 0.05$) than for all other Divisions. For all other Divisions the predicted perimeter at 28 cm total length corresponding to the intercepts of the linear model decreased more or less continuously from North to South (Fig. 17b). The Tukey HSD test did not identify any ICES Divisions for which the slope was different from all other Divisions. However, slopes also generally decreased from North to South with the exception of Iceland and Faroes Waters (Divisions Va and Vb), leading to a less marked North-South gradient for predicted perimeter at 38 cm (Fig. 17b).

Table 3. Analysis of covariance for otolith perimeter. Interactions between factors are noted by a colon (:) (df - degree of freedom; SS - sum of squares; MS - mean sum of squares).

Factor	df	SS	MS	F value	P value
Length	1	1597.84	1597.84	24121.02	$< 2 \cdot 10^{-16}$
Sex	1	48.13	48.13	726.53	$< 2 \cdot 10^{-16}$
ICES Division	12	120.01	10.00	150.98	$< 2 \cdot 10^{-16}$
Year	3	24.24	8.08	121.97	$< 2 \cdot 10^{-16}$
Length:Year	3	7.46	2.49	37.52	$< 2 \cdot 10^{-16}$
Length:ICES Division	12	13.65	1.14	17.18	$< 2 \cdot 10^{-16}$
Length:Sex	1	0.62	0.62	9.42	0.002176
Residuals	1647	109.1	0.07		

Among the 99 Fourier harmonics extracted to describe otolith contours, the first 34 harmonics explained more than 99.99% of the otolith variation and were thus used for the multivariate analysis. Principal Components Analysis of these first 34 Fourier harmonics (i.e. 156 Coefficients of Fourier, see eq. 1) explained 84.01% of the total variance and the first and the second PC accounted for 36.82% and 14.24% of the total variance respectively. Only the first seven PCs were significant as determined by their eigenvalues exceeding the threshold eigenvalue generated by the broken-stick model ($> 3.9\%$ of the total variance). In the RDA

when the first seven PCs were related to total length, the relationship was found to be significant ($p < 0.001$). Therefore in the second RDA, the residuals from the first RDA were used to test the explanatory variables of interest, e.g. sex, year of sampling and ICES Division, as well as second order interactions. All VIF values were smaller than 1.7 providing no evidence for multi-collinearity between exploratory factors. ICES Division ($p < 2.10^{-16}$) and the interaction between year and ICES Division ($p < 0.05$) both explained differences in otolith shapes (Tab. 4). Given no sexual dimorphism was found (sex: $p = 0.538$; Tab. 4), males and females were combined in the subsequent LDA and cluster analysis.

Table 4. Summary of Redundancy analysis (RDA) (n = 1693) of blue whiting otolith shapes (df - degree of freedom).

Factor	df	P value
Year	3	$2.2 \cdot 10^{-16}$
ICES Division	12	$2.2 \cdot 10^{-16}$
Sex	1	0.538
Year : ICES Division	36	$2.2 \cdot 10^{-16}$
Year : Sex	3	0.071
ICES division : Sex	12	0.059

The LDA provided discriminant functions for year-ICES Division combinations using the 34 Fourier harmonics and sampling year as explanatory variables. The overall jack-knifed classification success was 28.41% (Tab. 5). The analysis showed significant differences among groups of blue whiting sampled in different ICES Divisions and years (Wilks' $\lambda = 0.1769$; $F = 24.843$; $p < 0.001$). The misclassification percentage for each group was highest in the west of Scotland area (ICES Division VIa) and the Rockall area (ICES Division VIb), where individuals were misclassified to the Norwegian Sea (IIa) (Tab. 5).

Table 5. Jackknifed correct classification matrix of the linear function discriminant analysis for mature blue whiting (N=1693) between sampling ICES areas and year based on the first normalized 34 harmonics. The percentages in each row represent the classification into the ICES sampling Divisions given in columns (correct classification in grey square), sample sizes are given in parentheses. Overall classification success is 28.41%, Wilks' $\lambda = 0.354$.

		IIa	IIb	IVa			Va		Vb	VIa	VIb	VIIa	VIIg-h	VIIIa-b		%cor
		2010	2010	2008	2010	2011	2006	2011	2008	2011	2008	2011	2006	2006	2011	
IIa	2010	49	7	2	9	0	7	3	3	104	5	3	0	2	7	24
IIb	2010	12	6	1	1	0	4	1	0	15	0	0	0	0	2	14
IVa	2008	7	1	2	2	0	5	1	0	9	2	1	0	0	0	7
	2010	18	1	2	19	15	5	1	2	33	3	8	0	4	4	17
	2011	1	0	1	20	9	2	0	1	3	1	1	0	6	9	20
Va	2006	18	4	3	4	2	19	0	10	36	2	4	3	2	5	17
	2011	16	3	1	2	1	2	5	2	31	2	1	0	0	0	8
Vb	2008	9	0	3	0	1	6	1	4	10	3	1	0	0	0	11
VIa	2011	47	6	2	8	2	19	7	2	180	6	4	0	3	13	60
VIb	2008	11	1	2	3	0	4	2	7	17	8	2	1	0	3	13
VIIa	2011	0	1	0	3	2	0	0	1	0	0	2	22	7	2	55
VIIg-h	2006	7	0	0	7	2	3	0	0	12	2	14	3	6	46	14
VIIIa-b	2006	0	0	1	1	4	0	0	0	2	0	12	3	9	24	20
	2011	4	0	1	4	5	7	1	0	21	3	35	9	17	92	42

The misclassification percentages were particularly high from the Norwegian Sea to the West of Scotland in the North and from the Irish Sea and the Porcupine Bank to the Portuguese Waters in the South. When data from different years of sampling were grouped for a given ICES Division in the LDA, the overall jack-knifed classification success increased only by 6% (34%, Wilks' $\lambda = 0.141$; $F=23.402$; $p<0.001$) (Tab. 6).

Table 6. Jackknifed correct classification matrix of the linear function discriminant analysis for mature blue whiting (N=1693) bandween sampling ICES areas based on the first normalized 34 harmonics. The percentages in each row represent the classification into the ICES sampling Divisions given in columns (correct classification in grey square), sample sizes are given in parentheses. Overall classification success is 34.44%, Wilks' $\lambda = 0.089$.

	IIa	IIb	IVa	Va	Vb	VIa	VIb	VIIa	VIIc	VIIk	VIIgh	VIIIab	IXa	%cor
IIa	42	1	1	2	0	129	0	0	0	0	1	25	0	21
IIb	13	5	0	3	0	14	0	0	0	0	0	7	0	12
IVa	22	0	29	13	2	95	0	1	0	0	0	24	3	15
Va	12	5	22	33	5	71	3	7	1	0	3	15	1	19
Vb	3	1	8	4	2	19	0	0	0	0	0	1	0	5
VIa	62	0	5	7	2	255	5	3	1	0	2	15	4	71
VIb	2	1	5	6	2	38	31	2	6	0	1	4	3	31
VIIa	1	0	0	0	0	11	0	25	2	0	0	1	0	63
VIIc	0	0	0	3	0	28	7	0	6	0	0	0	6	12
VIIk	0	0	0	1	0	22	4	0	5	0	0	0	0	0
VIIgh	4	0	0	1	1	67	0	4	3	1	1	19	1	1
VIIIab	8	1	4	6	1	124	3	11	8	8	7	76	7	29
IXa	0	0	0	3	0	11	2	0	0	0	0	1	78	82

With the aim of achieving a more reliable classification ICES Divisions were combined. Combining ICES divisions into two areas, 71% of individuals were assigned correctly to the northern (from Norwegian Sea to West of Scotland: ICES Divisions IIa-VIa, N=1009) and the southern areas (from Rockall to the Portuguese Waters: ICES Divisions VIb-IXa, N=684) (Wilks' $\lambda = 0.893$; $F=28.834$; $p<0.001$). The hierarchical cluster analysis performed on the matrix of the 34 Fourier harmonics identified two clusters of fishes (Fig. 18).

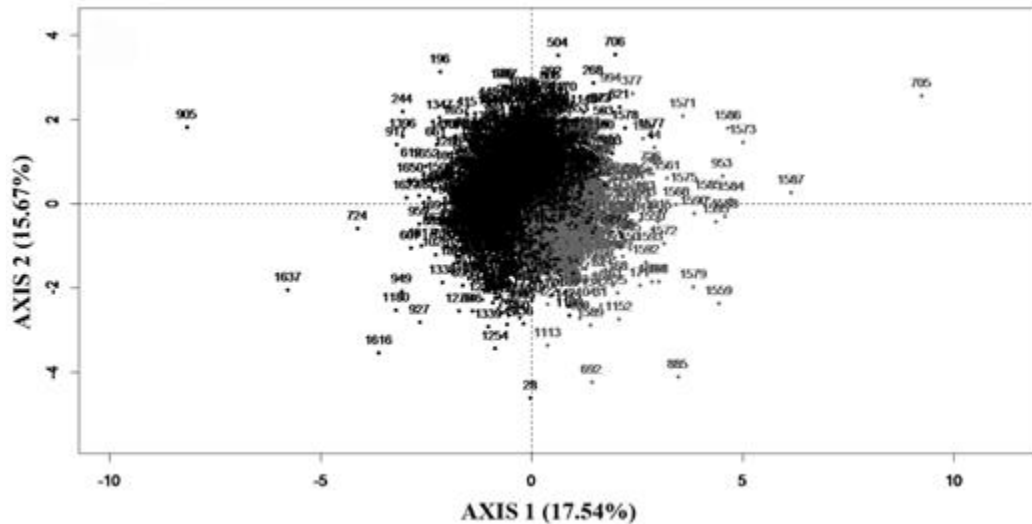


Figure 18: Average individuals from the two clusters identified by hierarchical cluster analysis using Ward's hierarchical algorithm based on the squared Euclidean distances for all blue whiting (N=1693) on the first 2 dimensions. The dots with sample numbers represent individuals.

Cluster 1 (N=573) was exclusively composed of blue whiting sampled from the Norwegian Sea to the West of Scotland (ICES divisions: IIa, IIb, IVa, Va, Vb, VIa and VIb). All fish from the Spitsbergen and Bear Island were found exclusively in cluster 1. Conversely, cluster 2 (N=1120) included individuals sampled in all ICES Divisions and years. For the southern ICES divisions (from Irish Sea to the Portuguese Waters) individuals were found in cluster 2. Combining the ANCOVA on otolith perimeter which revealed a spatial gradient with the multivariate analyses (LDA and cluster analysis) two geographical areas of blue whiting stock structure were identified:

- Northern zone : from Norwegian Sea to West of Scotland (ICES Divisions IIa-VIa)
- Southern zone : from Rockall to the Portuguese Waters (ICES Divisions VIb-IXa)

To visualise differences in average shapes between clusters, the reconstructed outlines of the mean Fourier Descriptors of the two clusters were plotted as overlay picture (Fig. 19). The main shape differences between clusters occurred in the direction of the small axis of the otoliths, especially in the upper (dorsal) part.

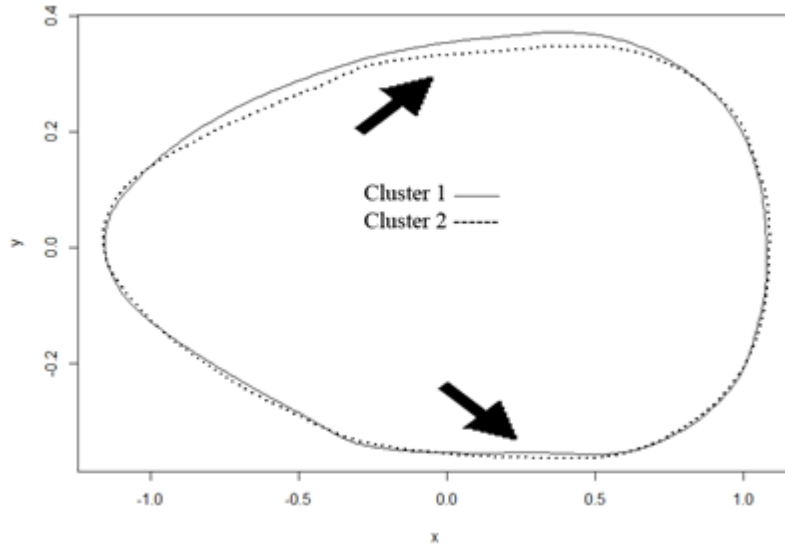


Figure 19. Mean otolith outline shapes formed with reverse Fourier transform of the outline using the first 34 harmonics showing the overlap and variations between two clusters (arrows show the divergence areas).

2.2.6 Discussion

The use of linear morphometric descriptors was found to be of limited use for *M. poutassou* (Keating et al. 2014), that is why the perimeter was used as a single additional morphometric descriptor which gave results in agreement with the elliptical Fourier descriptors. In addition the descriptors allowed the evaluation of the relative contribution of sampling year and ICES Division to the explanation of inter-individual variability. The number of selected Fourier harmonics (PF=34) was higher than those previously identified for *M. poutassou* (PF=10, Keating et al. 2014) and *M. australis* (PF=14, Legua et al. 2013). A majority of studies using this technique compute the cumulated Fourier power PF (Fourier Power) using EFDs (Elliptical Fourier Descriptors) averaged across the full sample or a part of it, so that the selected harmonics describe the average otolith shape. In this study however, in order to ensure that each individual otolith in the sample was reconstructed with a precision of 99.99%, the PF value was calculated for each individual otolith such that individual shape was reconstructed at 99.99%. The maximum number of harmonics across individual otoliths

was then used to statistically reconstruct each individual otolith in the sample. This value was higher than the cumulated PF using averaged EFDs.

ANCOVA and redundancy analysis were carried out to explore the effects of size (total length of fish), sampling year and sex (only for RDA). Since several authors have provided evidence for allometric otolith growth (Castanguay et al. 1991; Campana and Casselman 1993; Begg et al. 2001; Cardinale et al. 2004; Capoccioni et al., 2011). Moreover, Campana and Casselman (1993) found that sexual maturity can modify the final contour of otoliths. Therefore in our study, only otoliths from mature adults were used. Further, a significant correlation between total length of fish and morphological otolith parameters (perimeter and EFDs) was found. To remove this effect the residuals of the first seven PC from the normalised elliptical Fourier descriptors were used.

The effect of sex on otolith perimeter was weak but significant and non-overall shape was found. A sex effect have also been reported on other species, e.g. for herring (*Clupea harengus*, Bird et al. 1986), orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*, Gauldie and Jones 2000), cod (*Gadus morhua*, Paul et al. 2013) and southern blue whiting (*Micromesistius australis*, Legua et al. 2013). Combining data from different years has been done before in otolith shape analysis (DeVries et al. 2002; Tracey et al. 2006; Farias et al. 2009; Neves et al. 2011). For example, Friedland and Reddin (1994) and Campana and Casselman (1993) found no year effect for the otolith shape of Atlantic salmon and cod. In contrast, both the ANCOVA for perimeter and the RDA for EFDs of *M. poutassou* in the present study indicated significant sampling year effects. This difference could be explained by migrations for reproduction or feeding. Further, sampling was carried out over several years spread over different months. Consequently, the year effect could be due to true interannual differences, as identified in the previous small scale otolith shape study of *M. poutassou* (Keating et al. 2014), and/or due to seasonal differences such as found for pacific sardine (*Sardinops sagax*)

(Felix-Uraga et al. 2004; Vergara-Solana et al. 2013). However, a season effect was not tested in the present analysis due to a lack of sufficient sampling coverage across seasons. In addition, a significant interaction between sampling year and geographical area was found in the RDA, which corroborates the results obtained in other gadoids species (Castonguay et al. 1991; Begg and Brown 2000; Petursdottir et al. 2006).

This large scale study, which identified two broad stock components of blue whiting, is in accordance with previous smaller scale studies which also suggested the existence of several stock components of the blue whiting in the northeast Atlantic (Karasev 1990; Isaev and Selivestof 1991; Skogen et al. 1999; Ryan et al. 2005; Brophy et al. 2007; Brophy and King 2007; Was et al. 2008; ICES, 2012; Keating et al. 2014). Karasev (1990), comparing parasite types and infestation rates, concluded that there were three separate stocks from the north to the south: (1) the Barents Sea, Spitzbergen and Iceland (ICES Divisions IIb, Va), (2) the Norwegian Sea, Faeroes and Hebrides (ICES Divisions IIa, Vb, VIa), and (3) the Porcupine Bank, Celtic Sea, Bay of Biscay and areas near Shetland (ICES Divisions VIIg-h & VIIIa-b). Other studies have investigated the existence of only two subcomponents. Although the genetic variability in blue whiting is low from Gibraltar to Norway (Mork and Gjaever 1995), differentiation has been found between the south, Bay of Biscay and Celtic Sea, and the north, Porcupine bank to Papa bank (Was et al. 2006; 2008). A recent study of blue whiting otolith shapes (Keating et al. 2014), which was focused on ICES Divisions VIa and VIb, identified a geographical stock limit along a line from Porcupine Bank to Rockall Bank (Fig. 15). The location of spawning determines the probability of blue whiting eggs drifting northwards or southwards (Skogen et al. 1999) and define the division line between these two stock components. This division line which varies between years was determined to be approximately at 54.5°N corresponding to the northern edge of Porcupine bank. The Skogen et al. (1999) study covered the years 1976 to 1995, which was a period of strong subpolar

gyre activity hence probably a period with a constrained spawning area (Hátún et al. 2009), resembling the conditions for the data collection of the present study, thus the division line was expected to have been in a similar position.

Brophy et King (2007) based on otolith growth increments; found that juvenile growth rate exhibits a north-south gradient with individuals on the feeding grounds in the Bay of Biscay showing a faster growth than individuals on feeding grounds in the Norwegian Sea, and those from the west of Ireland presenting an intermediate pattern in growth. Further, back calculated juvenile growth rates of spawning individuals sampled on Porcupine Bank were more similar to growth increments of individuals from the Bay of Biscay, while juvenile growth rates for individuals sampled in the most northern part of the spawning area were slower and more similar with the individuals of the northern feeding areas. Such spatial retention of juveniles as suggested by their differential growth rate suggest that individuals from the southern feeding grounds, e.g. the Bay of Biscay might spawn primarily at the southern end of the spawning area while individuals from the feeding areas in the Norwegian Sea spawn at the northern range. Given the division line of drifting eggs, this will ensure some separation between the northern and southern stock components. However, due to interdecadal variations in the strength of the North Atlantic subpolar gyre and more locally interannual variations in currents, together with variations in spawning location and drifting direction of eggs will contribute to the persistence along the time of mixing between the northern and the southern component.

Otolith shapes are influenced by environmental conditions and genetic traits (Farias et al. 2009; Vignon 2012). Environmental conditions regulate the quantity of material deposited during otolith formation (Gauldie and Nelson 1990; Smith 1992; Campana and Casselman 1993; Galley et al. 2006). Thus, for the same environmental conditions, differences in otolith shapes are known to be driven by genetic differences (L’Abee-Lund and Jensen 1993;

Cardinale et al. 2004; Galley et al. 2006) as well as individual growth Vignon and Morat (2010) found that genetic variations only affected the otolith shape locally, mainly in the rostral and antirostrum parts. Conversely, Reichenbacher et al. (2007; 2009), concluded that the posterior and postero-ventral angles of sagittal otoliths differed as a consequence of environmental factors rather than different genetic information. In the present study, variations of otolith shape were observed locally in the dorsal and ventral parts (Fig. 19). Thus both environmental conditions and genetic components could explain these differences. However, genetic differentiation in blue whiting seems to be low from Gibraltar to Norway and there is a high probability of genetic mixing on the spawning grounds (Mork and Gjaever 1995). Therefore, the main factors influencing the observed otolith shape differences of blue whiting could be environmentally driven, such as temperature, salinity, food availability, water depth and oxygen. Temperature gradients have been found to influence the spatial distribution and the growth of blue whiting (Kloppman et al. 2001; Hátún et al. 2009; Payne et al. 2012; Trenkel et al. 2015), and they might also explain, at least partly, the difference in otolith shape, similar to that found for *M. australis* (Legua et al. 2013).

In conclusion, though it has proven difficult to disentangle what drives the observed differences in otolith shape between the northern and southern blue whiting stock components identified in the present study. Otolith shape analysis was proven to be a useful tool to describe the two spatial components of the Northeast Atlantic blue whiting stock.

2.3 Etude 2 : Otolith shape as a valuable tool to evaluate the stock structure of swordfish *Xiphias gladius* in the Indian Ocean

Mahe K, Evano H, Mille T, Muths D, Bourjea J (2016). Otolith shape as a valuable tool to evaluate the stock structure of swordfish *Xiphias gladius* in the Indian Ocean. *African Journal of Marine Science*, 38(4), 457-464.

2.3.1 Abstract

Swordfish *Xiphias gladius* is an oceanic-pelagic species. Its population structure in the Western Indian Ocean was studied from the shape of the sagittal otoliths of 391 individuals collected from 2009 to 2014. Normalised elliptical Fourier descriptors (EFDs) were extracted automatically using TNPC software. Principal components analysis (PCA) conducted on EFDs showed no significant effect of side (i.e. left or right otolith). Consequently, all 391 sagittal otoliths were used to identify stocks among six geographical areas: La Réunion, Mozambique Channel, Rodrigues, South Africa, Madagascar South and Sri Lanka. To investigate the effects of sex, sampling year, sampling season, lower jaw fork length or geographical area on variations in otolith shape, redundancy analyses (RDAs) with permutation tests were conducted. The first four were non-significant (respectively, $p = 0.124$, $p = 0.721$, $p = 0.197$, $p = 0.463$), but geographical area appeared to discriminate groups significantly ($p < 0.05$). Furthermore, linear discriminant analysis (LDA) was performed and overall jackknife classification success reached 30%. Finally, a cluster analysis was conducted using Ward's hierarchical algorithm, which discriminated three different groups. However, each group consisted of individual samples from all geographical areas. In conclusion, our results were unable to identify a clear geographical separation of swordfish at the Indian Ocean scale, corroborating recent genetic studies in this region.

2.3.2 Keywords

Connectivity, Fourier descriptors, morphometric markers, sagittal otoliths, stock discrimination

2.3.3 Introduction

Swordfish *Xiphias gladius*, Linnaeus 1758 is a highly migratory oceanic species, currently fully exploited by several commercial fisheries in the Indian Ocean either as a target species (e.g. European Union longline fleet) or a bycatch product (e.g. Taiwanese longline fleet). The spatial structure of large pelagic species is difficult to understand due to their wide geographic distribution, large population size, high fecundity and ability to migrate between oceans (Nakamura 1985). Consequently it is difficult to discriminate among subpopulations based on differences in life-history characteristics, and hence it is similarly difficult to divide populations into stock units that are defined by growth and renewal rates pertinent to geographic areas where fisheries are undertaken (Cadrin et al. 2014). On the basis of the most recent swordfish stock assessment in the Indian Ocean (IOTC 2015), levels of catches in the Indian Ocean as a whole for the period 2005–2014 (22 174 t – 35 693 t) were considered to be below the estimated maximum sustainable yield (MSY; 39 400 t). However, since 2013 and based on the fishery data and some structured stock assessment trials, the scientific committee of the Indian Ocean Tuna Commission (IOTC 2013) requested a population structure to be considered, as the South-West Indian Ocean (SWIO) may host an independent stock. The stock assessment clearly emphasises the importance of better knowledge of the spatial structure of this species at the scale of the Indian Ocean, and its relation with adjacent oceans (i.e. the Atlantic and the Pacific).

Spatial-structure information provides a basis for understanding fish population dynamics and contributes to reliable resource assessment for fishery management (Reiss et al. 2009). Several techniques may be used to identify stock limits, such as tagging experiments, analyses of spatial and temporal variation of genetic or morphometric markers, differentiation of life-history variables, parasites and contaminant concentrations (Pawson and Jennings 1996;

Cadrin et al. 2014) or parasite composition (Garcia et al. 2011). Previous genetic studies identified some differentiation of swordfish in the Indian Ocean, including the Western Indian Ocean (Jean et al. 2006; Lu et al. 2006; Muths et al. 2009; Bradman et al. 2011), but conclusions on stock structure were inconsistent as a result of the marker used, the absence of stratification of sampling in space and time and the lack of information on reproductive behaviour. The reproductive biology of swordfish in the Indian Ocean is not well known. Three spawning grounds have been identified: the Gulf of Bengal, the Somalia coast where spawning takes place after April, and La Réunion where spawning is believed to take place from October to November (Yabe et al. 1959; Palko et al. 1981; Mejuto et al. 2006; Poisson and Fauvel 2009). The existence of these grounds might explain differences between the conclusions of previous studies investigating the genetic stock structure of swordfish. A recent global study on population genetics using a multi-genetic marker approach and spatio-temporal analysis based on 2 231 individuals suggested there is a single panmictic population (i.e. a single stock) of swordfish in the Indian Ocean (Muths et al. 2013). However, that study also underlined the need for other stock discrimination approaches to investigate further the stock structure of this species, particularly in the Indian Ocean.

In the present study, swordfish stock structure was investigated using the shape of sagittal otoliths. Otolith morphology is influenced by both biotic and abiotic factors (Cardinale et al. 2004; Capoccioni et al. 2011). Analysis of the outline of otoliths has previously been used for stock discrimination purposes (haddock *Melanogrammus aeglefinus*: Begg and Brown 2000; cod *Gadus morhua*: Galley et al. 2006; Petursdottir et al. 2006; Stransky et al. 2008; striped red mullet *Mullus surmuletus*: Benzinou et al. 2013). Based on the logistics and sample collection presented in Muths et al. (2013), with additional samples from South Africa, this study focuses on individual swordfish sampled over a wide geographic area, from South

Africa to Sri Lanka. Otolith shape analysis was performed to discriminate components of the Indian Ocean swordfish stock.

2.3.4 Material and methods

2.3.4.1 Sample collection

Swordfish samples from South Africa to Sri Lanka (Fig. 20; Tab. 7) were collected during the period 2009–2014 by observers on board commercial fishing vessels or at landing sites, and associated fishing data were recorded. Samples for this study were obtained from the same swordfish as those used for the genetic study by Muths et al. (2013).

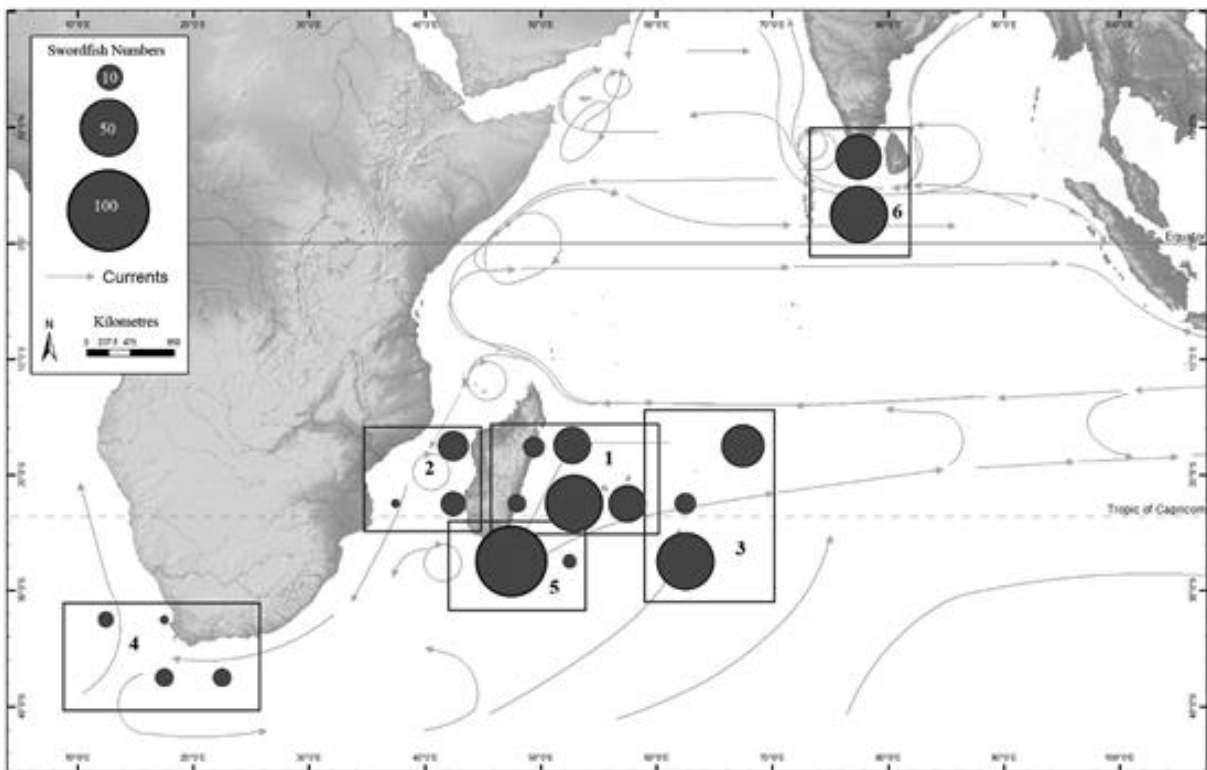


Figure 20: Map of location of swordfish samples collected between 2009 and 2014 in the Indian Ocean. The rectangles indicate sampling areas (1: La Réunion, 2: Mozambique Channel, 3: Rodrigues, 4: South Africa, 5: Madagascar South and 6: Sri Lanka).

Table 7: Number of swordfish otolith samples by year, sex (not available for gutted fish), season (S1 = April–July; S2 = September–January) and sampling area. LJF = mean lower jaw fork length

Sampling area	LJF (cm)	Sex			Sampling year								Total		
		Male	Female	U	2009		2010		2013		2014				
					S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2			
La Réunion	143.0±23.0	38	59	10	12	49	1	45							107
Mozambique Channel	135.1±38.6	11	10	13				34							34
Rodrigues	165.2±29.8	29	54	0		39		44							83
South Africa	185.9±36.9			20						5		15			20
Madagascar South	150.4±34.2	21	48	2	19	43	9								71
Sri Lanka	167.3±57.5	8	20	48		23	48	5							76
Total	155.0±38.6	107	191	93	31	154	92	94		5		15			391

With the exception of South Africa, samples were collected over two years (2009–2010) and following a strategy targeting two distinct seasons – April–July, considered to be the non-spawning season, and September–February, thought to be the spawning season (Poisson and Fauvel 2009). The specimens from South Africa were collected during December 2013 and November 2014. Seasons were defined based on the limited information available on swordfish reproductive condition in the Indian Ocean, but could also be considered broadly as the austral winter and summer, respectively. Information on sampling location (latitude and longitude or 5° square) was noted systematically and the swordfish were classified according to the six sampling areas listed in Table 7. For consistency, we grouped the data as proposed by Muths et al. (2013). Sex and maturity (i.e. immature or mature) were determined by macroscopic examination of gonads. Only mature fish were included in this study to minimise

the potential effect of sexual maturity, which may lead to a change otolith shape (Cardinale et al. 2004). Sagittal otoliths were extracted from a total of 391 individuals ranging from 56 cm to 300 cm lower jaw fork length (LJF) (mean 155.0 cm; SD 38.6).

2.3.4.2 Otolith shape analysis

Swordfish otoliths present a large dorsal area, between the excisura major and the excisura minor, which is very distinct from the antirostrum (Fig. 21). Images of whole left and right sagittal otoliths were scanned (Epson V750) under reflected light and stored at high resolution (3 200 dpi). Image processing was performed using the image analysis system TNPC 7 ('Digital Processing for Calcified Structures; www.tnpc.fr) with the sulcus acusticus facing upwards. In order to compare left and right otolith shapes, a mirror image of left otoliths was used.

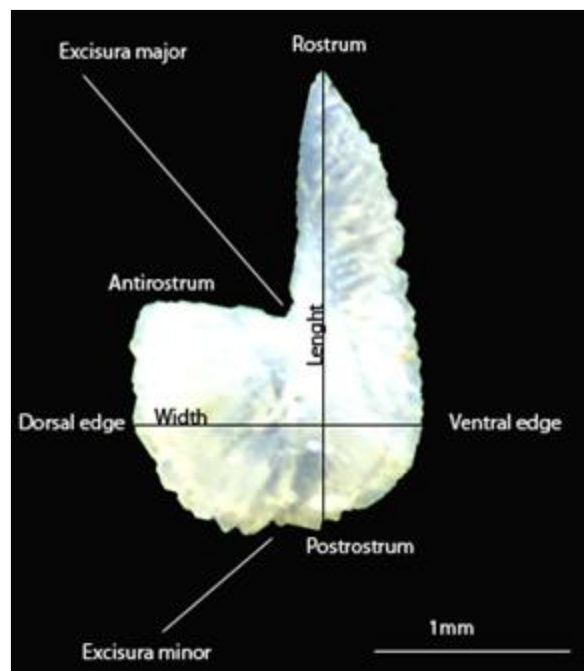


Figure 21: Photograph of a whole swordfish sagittal otolith showing terminology and measurements taken during the study.

Otolith length and width were measured (Fig. 21) and the contour of each otolith was extracted using the automatic threshold in TNPC. To describe otolith contours, elliptic Fourier

analysis (EFA; Lestrel 2008) was carried out. For each otolith, the first 99 elliptical Fourier harmonics (HI) were extracted and normalised with respect to the first harmonic using TNPC, rendering them invariant to otolith size, rotation and starting point of the shape measurements (Kuhl and Giardina 1982). To determine the number of harmonics required to reconstruct the otolith outline, the Fourier power (PF) was calculated for each individual otolith k as a measure of the amount of contour rebuilt by each harmonic:

$$PF(n_k) = \sum_{HI=1}^{n_k} \frac{A_{HI}^2 + B_{HI}^2 + C_{HI}^2 + D_{HI}^2}{2}$$

where A_{HI} , B_{HI} , C_{HI} and D_{HI} are the parameters of the HI^{th} harmonic and n_k is the total number of harmonics included. The value of n_k was chosen such that $PF(n_k)$ explains 99.99% of the variance in contour coordinates, i.e. enabling the shape to be reconstructed at an accuracy of 99.99% (Lestrel 2008).

2.3.4.3 Statistical analyses

The difference in shape between left and right otoliths was tested for 91 individuals. Firstly, principal components analysis (PCA) was applied to a matrix of selected elliptical Fourier descriptors (EFDs) of otolith contours (EFDs as columns and individual otoliths as rows) (Rohlf and Archie 1984) and a subset of the resulting principal components was selected as otolith-shape descriptors according to the broken-stick model (Legendre and Legendre 2012). Secondly, partial redundancy analysis (pRDA) was modelled on the selected principal components (PCs) matrix, with otolith side (left/right) as the potentially influential variable and the individual as the conditioned variable. To visualise differences in otolith shape between right and left sides, an average otolith shape for the group from each side was rebuilt based on average EFDs.

The effects of the variables LJF (cm), sex, sampling year, sampling season and sampling area were tested on 391 individual samples (300 images of right otoliths and 91 mirror images of left otoliths were combined) using an RDA, where the explained matrix was combined with

permutation tests on the selected PC matrix from the PCA, and the explanatory matrix consisted of the tested effects and the interactions between them. For each factor, the sample groups consisting of <10 individuals were removed before the analyses. To test the significance of each explanatory variable, a permutation test (marginal effect, Type II) was used (Legendre and Legendre 2012).

To discriminate fish classified according to the six sampling (fishery) areas, based on their otolith shapes, a linear discriminant analysis (LDA) with jackknifed prediction was applied to the selected PC matrix (Rencher and Christensen 2012). To evaluate the resulting discriminant functions, the percentage correct classification of individuals to sampling area was calculated using jackknife cross-validation and Wilk's lambda criteria (Klecka 1980). Finally, a cluster analysis (Ward's hierarchical algorithm based on squared Euclidean distances) was performed on the selected matrix of EFDs to classify individuals with similar otolith shapes.

Statistical analyses were performed using the 'Vegan' (Oksanen et al. 2013), 'MASS' (Venables and Ripley 2002), 'CAR' (Fox and Weisberg 2011), 'FactoMinR' (Lê et al. 2008), 'HH' (Heiberger and Holland 2004) and 'Ellipse' (Murdoch and Chow 1996) packages in the statistical environment R (R Core Team 2014).

2.3.5 Results

Among the 99 Fourier harmonics extracted to describe otolith contours from left and right otoliths of 91 individuals, the first 39 harmonics explained at least 99.99% of the otolith variation and were thus used for the multivariate analysis. Only the first seven PCs were significant, as determined by their eigenvalues exceeding the threshold eigenvalue generated by the broken-stick model. The pRDA combined with permutation tests showed no significant difference between the left and right otolith shape ($p = 0.143$). This was corroborated by the

comparison of average otolith shape of the group from each side based on average EFDs (Fig. 22).

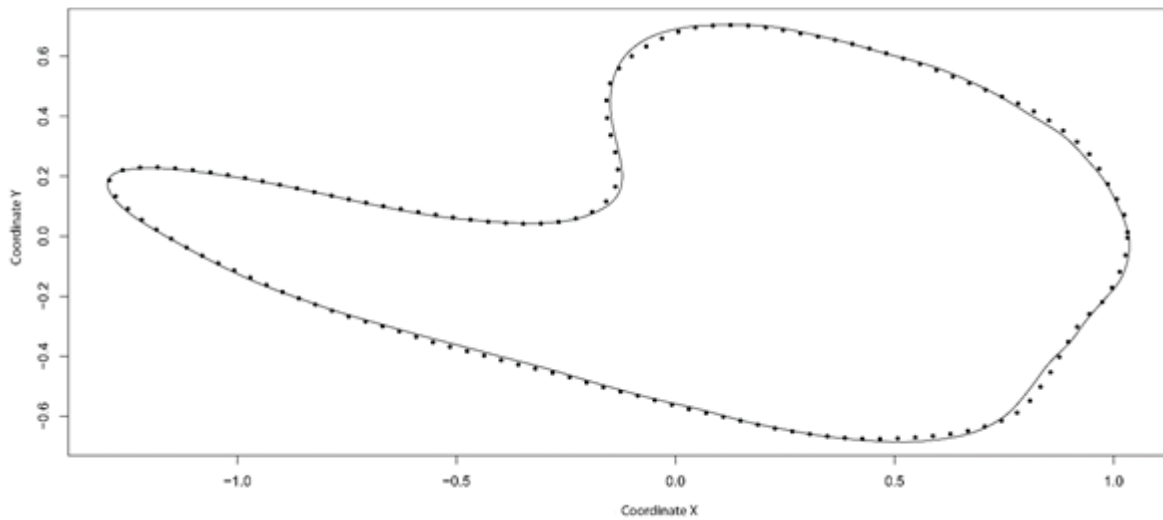


Figure 22: Mean otolith outline shapes formed with reverse Fourier transform of the outline using the first 39 harmonics, showing the overlap and variations between right (dotted line) and left (solid line) otolith shape of swordfish from the Indian Ocean ($n = 91$)

As the left and right otoliths were comparable, 300 images of right otoliths and 91 mirror images of left otoliths were combined. PCA of the first 39 Fourier harmonics showed that the first and the second PCs accounted for 35.5% and 24.8% of the total variance, respectively. Only the first seven PCs were significant, as determined by their eigenvalues exceeding the threshold eigenvalue generated by the broken-stick model. The effect of LJJ ($p = 0.463$), sex ($p = 0.124$), sampling year ($p = 0.721$), sampling season ($p = 0.197$) and sampling area ($p = 0.002$) were tested using an RDA. The interaction between sampling year and sampling season was not significant ($p = 0.693$). The relationship between the ratio of otolith length to otolith width and the LJJ of fish showed that the size effect was not significant ($p > 0.05$).

Only the effect of sampling area was significant ($p < 0.05$), and hence sampling area was used as an explanatory variable in the subsequent LDA. The overall jackknifed classification success was 30% (Tab. 8). The analysis showed significant differences among groups of swordfish sampled in different areas of the Indian Ocean (Wilks' $\lambda = 0.017$, $F = 1.255$, $p =$

0.001). The misclassification percentage for each sampling area was explained by all other areas and not only adjacent areas (Tab. 8).

Table 8: Jackknifed correct classification matrix of the LDA for mature swordfish ($n = 391$) between sampling areas based on the selected PC matrix. The percentages in each row represent the classification into the sampling area in each column (the correct classification is in the shaded squares on the diagonal). Overall classification success: 30%.

Sampling area (n)	South	Madagascar		La		Sri	%
	Africa	South	Mozambique	Réunion	Rodrigues	Lanka	
South Africa (20)	4	3	2	1	9	1	20
Madagascar South (71)	5	20	4	20	9	13	28
Mozambique Channel (34)	3	2	5	11	9	4	15
La Réunion (107)	5	17	16	42	14	13	39
Rodrigues (83)	2	12	8	23	28	10	34
Sri Lanka (76)	2	12	14	13	12	23	30

The hierarchical cluster analysis performed on the matrix of 39 Fourier harmonics identified three clusters of fish (Fig. 23). The three clusters each consisted of individuals from all sampling areas (Tab. 9).

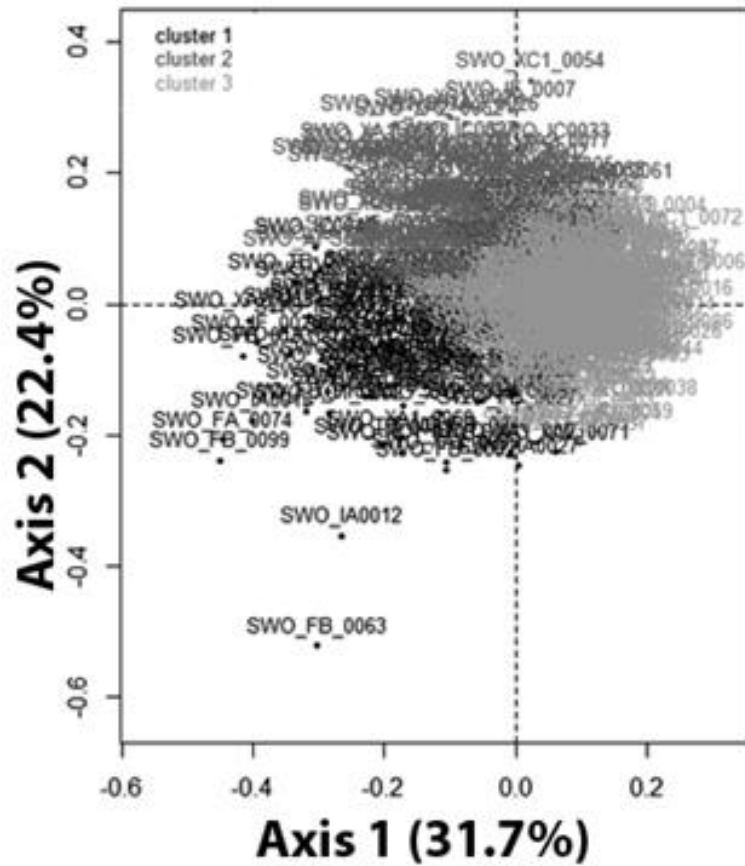


Figure 23: Average individuals (i.e. average otolith shape for each group of individuals) from the three clusters identified by hierarchical cluster analysis using Ward’s hierarchical algorithm based on the squared Euclidean distances for all swordfish ($n = 391$) on the first two dimensions. The dots with sample numbers represent individuals

Table 9: Classification matrix of the hierarchical clustering on principal components for mature swordfish ($n = 391$) between sampling areas, based on the selected PC matrix

Sampling area	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Total
South Africa	2	5	13	20
Madagascar South	11	20	40	71
Mozambique	3	13	18	34
La Réunion	20	23	64	107
Rodrigues	12	23	48	83
Sri Lanka	17	17	42	76
Total	65	101	225	391

2.3.6 Discussion

The genetic study by Muths et al. (2013) identified differences between Atlantic and Indian Ocean swordfish stocks but did not investigate the possibility of subdivisions in Indian Ocean stock(s). Otolith-shape analysis is another efficient stock-identification tool linked to genetic heterogeneity and the influence of environmental factors (Campana and Casselman 1993; Cadrin and Friedland 1999; Torres et al. 2000; Cardinale et al. 2004; Swan et al. 2006; Vignon and Morat 2010). The external contour of otoliths can be described by several techniques such as univariate descriptors (coefficient of form, roundness, circularity, etc.), geometric morphometric analyses (Ponton 2006; Ramirez-Perez et al. 2010; Vergara-Solana et al. 2013), wavelet functions (Parisi et al. 2005; Sadighzadeh et al. 2014), growth markers (Benzinou et al. 2013) and the geodesic method (Benzinou et al. 2013). Among these, the elliptical Fourier analysis remains the most powerful and widely used method to describe otolith external shape (Agüera and Brophy 2011; Capoccioni et al. 2011; Ferguson et al. 2011; Legua et al. 2013; Paul et al. 2013). The method has the advantage of being unaffected by short-term changes in fish condition (Campana and Casselman 1993) resulting from environmental variation (Campana 1999). Nevertheless, its biological interpretation is more complex than in the case of methods based on linear morphometric descriptors (Stransky and MacLellan 2005). Some studies have combined the elliptical Fourier analysis and some basic descriptors of otolith contours to aid interpretation of results (Campana and Casselman 1993; Begg and Brown 2000; Galley et al. 2006; Merigot et al. 2007; Fergusson et al. 2011; Benzinou et al. 2013; Legua et al. 2013). This approach has provided relevant stock-structure information on demersal species such as the striped red mullet in the North-East European region (Benzinou et al. 2013). No study of stock identification using otolith shape has yet been undertaken on large migratory and long-lived tropical pelagic species.

In our study, prior to analysis of the geographical effect on otolith shape, some other factors known to affect shape were tested in order to exclude potential confounding factors (Vignon and Morat 2010). Firstly, no effect of side was observed, i.e. there was no significant difference between the left and the right otolith shape. A similar result was obtained for another highly migratory oceanic species, the bluefin tuna *Thunnus thynnus*, in an analysis of otolith morphological characteristics (Megalofonou 2006).

Sampling in this study was restricted to adult fish to eliminate the effect of sexual maturity, which has the potential to modify the outline contour of otoliths (Campana and Casselman 1993; Cardinale et al. 2004). The effect of LJJ, sex and sampling year were not significant. The absence of a sexual dimorphism effect on otolith shape of swordfish has also been shown for several other species, e.g. Atlantic mackerel *Scomber scombrus* (Castonguay et al. 1991), haddock (Begg et al. 2000), lake trout *Salvelinus namaycush* (Simoneau et al. 2000), Atlantic cod (Cardinale et al. 2004) and blue whiting *Micromesistius poutassou* (Mahé et al. 2016). However, in other species, e.g. herring *Clupea harengus* (Bird et al. 1986), orange roughy *Hoplostethus atlanticus* (Gauldie and Jones 2000) and southern blue whiting *Micromesistius australis* (Legua et al. 2013), there was a significant effect of sex on otolith shape. These authors attributed this to somatic growth rate differences between sexes. However, if female swordfish in the Indian Ocean grow faster and attain a larger maximum body size than males, as is the case in the Pacific Ocean (Sun et al. 2002; De Martini et al. 2007), there would be no significant effect of somatic growth on otolith growth. Sampling year had no significant effect on the swordfish under study, which corroborates studies on species such as Atlantic salmon *Salmo salar* (Friedland and Reddin 1994) and Atlantic cod (Campana and Casselman 1993). Large pelagic fishes are also known to undertake extensive oceanic migrations from spawning areas to foraging grounds (e.g. bluefin tuna; Rooker et al. 2007). We found that otolith shape

of swordfish did not differ significantly during and outside the spawning season, indicating that otoliths of foraging and spawning swordfish are of the same shape.

Finally, the RDA revealed a sampling-area effect on otolith shape of swordfish ($p < 0.05$). This was confirmed by LDA, which indicated significant differences among groups of swordfish sampled in different fishery areas of the Indian Ocean. However, the misclassification percentage of the cross-validation was 70%. Moreover, these specimens were not associated with adjoining sampling areas but with all sampling areas, regardless of location in the Indian Ocean. Thus, no geographical substructures could be distinguished in the Indian Ocean swordfish stock. Large geographic migrations might be an explanation for poor allocation success among geographic areas in this study, particularly if there are feeding aggregations composed by a mixture of multiple spawning groups. The cluster analysis supports this notion, with three groups each comprising fish from all sampling areas. Possible sources of misclassification in otolith-shape analysis are individual variability and migration (Campana and Casselman 1993; Tracey et al. 2006).

Swordfish migration patterns are among the most complex of the pelagic species and are known to be highly variable, with one individual reported to have travelled 3 053 km during a period of 90 days while another remained within 21 km of the tagging location during the same period (Palko et al. 1981; Sedberry and Loefer 2001). The Indian Ocean is divided between two hemispheres and comprises marine ecosystems that vary greatly across latitudes (Sherman and Hempel 2008). Major oceanographic features include the westward-flowing South Equatorial Current and, at around 12° S, the hydrochemical South Tropical Front, which separates two large oligotrophic areas, the Indian Monsoon Gyre Province in the north and the Indian South Subtropical Gyre Province (Longhurst 1998; Schott et al. 2009). However, swordfish is a highly mobile pelagic species with, for example, one individual recaptured 6 670 km to the south-east of the point of release in the Indian Ocean (Kadagi et

al. 2011). Temperature and oxygen are the main environmental factors that control the migration and distribution of large pelagic fishes (Carey 1990; Brill 1994; Prince and Goodyear 2006; Sund et al. 2006). Swordfish appears to be very highly tolerant of variations and extremes of temperature and oxygen and its movement patterns are controlled largely by resource availability and reproduction (Dewar et al. 2011). Consequently, the hydrochemical South Tropical Front does not seem to be a barrier to movement of this species and it seems that there is substantial connectivity between the north and south of the Indian Ocean.

2.3.7 Conclusion

Swordfish is a highly migratory oceanic species, currently fully exploited by several commercial and recreational fisheries in the Indian Ocean. Our results are consistent with those of a recent genetic-based study of swordfish in the Indian Ocean by Muths et al. (2013), in that clear geographic separation of subpopulations could not be identified. Future research should investigate patterns of otolith shape of swordfish sampled in the South-East Atlantic, to elucidate connectivity between the Atlantic and Indian oceans. As previously suggested for the bigeye tuna *Thunnus obesus* (Durand et al. 2005) and for swordfish (Muths et al. 2013), it would be of interest to investigate patterns of habitat use between the two oceans by large pelagic fishes in South African waters.

2.4 Synthèse du chapitre I

- D'un point de vue méthodologique, l'utilisation d'un scanner permet de standardiser l'acquisition des images d'un grand nombre d'otolithes, d'autant plus lorsqu'ils sont de petite taille. De plus, la combinaison des approches par analyse linéaire discriminante (en testant des groupes préalablement définis) et par analyse de clusters (sans utiliser d'information géographique préalable) permet de renforcer les résultats de classification obtenus.
- L'analyse de la forme des otolithes des 2 espèces de poissons pélagiques par les ellipses de Fourier révèle une forme relativement complexe, comme attesté par les nombres d'harmoniques élevés (34 et 39) nécessaires pour atteindre une Puissance de Fourier égale à 99.99%.
- La variabilité intra-individu testée à travers l'asymétrie bilatérale directionnelle chez les 2 espèces de poissons pélagiques analysés est non significative.
- Parmi les facteurs pouvant affecter la forme de l'otolithe, si l'année de prélèvement et la taille de l'individu affectent de façon significative la forme de l'otolithe chez le merlan bleu, cela n'est pas le cas chez l'espadon.
- Les stocks identifiés sur la base de la forme de l'otolithe corroborent ceux identifiés par les marqueurs génétiques.

Chapitre II : Effet de l'asymétrie des otolithes sur l'identification de stock

3.1 Introduction générale du Chapitre II

Il existe plusieurs facteurs confondants qui influencent la forme de l'otolithe au niveau intrapopulation : ce sont le sexe, l'âge (Castonguay *et al.*, 1991), la taille du poisson (Hüssy, 2008) et la maturité sexuelle (Cardinale *et al.*, 2004 ; Mérigot *et al.*, 2007). La plupart de ces facteurs décrivant le stade de vie du poisson traduisent la composante ontogénique (Lleonart *et al.*, 2000). Cependant, il y a aussi une potentielle variabilité intra-individuelle liée à la possible asymétrie pouvant exister entre les otolithes des oreilles droite et gauche à prendre en compte. Parmi les 3 types d'asymétries (présentées en introduction), l'asymétrie fluctuante est une caractéristique reflétant potentiellement des stress ou une hétérogénéité environnementale (Downhower *et al.*, 1990; Lemberget et McCormick, 2009, Diaz-Gil *et al.*, 2015, Green *et al.*, 2017). L'asymétrie peut être aussi directionnelle et n'est alors pas aléatoire. Elle est la conséquence de la composante génétique et/ou de la plasticité phénotypique. De ce fait, le degré d'asymétrie directionnelle pourrait varier entre zones géographiques pour une même espèce. Une étude bibliométrique réalisée à partir de la base de données Web of Science de 1993 à 2017 a montré que, parmi 91 études utilisant la forme de l'otolithe pour discriminer les stocks à partir des descripteurs elliptiques de Fourier (Fig. 24), 67 n'ont pas testé préalablement l'asymétrie directionnelle entre otolithe droit et gauche. Cependant, 6 d'entre elles ont utilisé les 2 otolithes conjointement, de sorte que 61 papiers ont choisi arbitrairement d'utiliser l'un ou l'autre des otolithes sans évaluer si les résultats étaient affectés par ce choix, ce qui représente 67% des études de cas. Parmi les 24 études où l'asymétrie a été testée, 7 espèces présentaient une asymétrie directionnelle significative, ce qui représente 29% des cas.

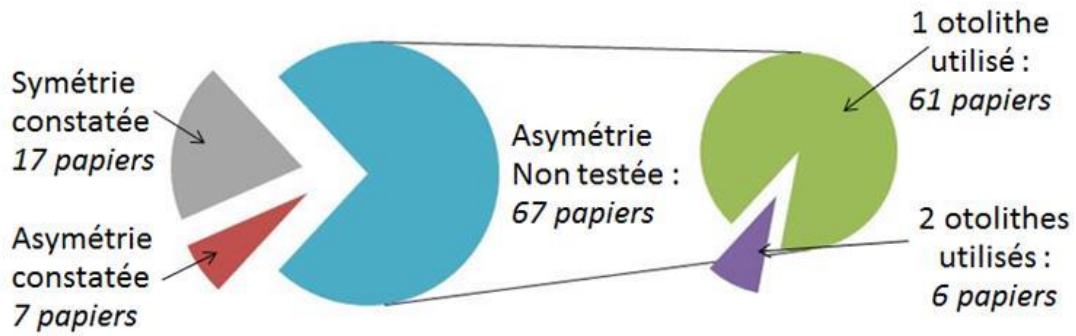


Figure 24 : Diagramme des 91 publications parues de 1993 à 2017 utilisant la forme de l'otolithe pour discriminer les stocks à partir des descripteurs elliptiques de Fourier classées selon le niveau d'asymétrie directionnelle entre les otolithes droit et gauche (données Web of Science).

Partant de ce constat, l'asymétrie directionnelle a été testée dans les études du chapitre I de cette thèse et s'est révélée non significative pour l'espadon et le merlan. A l'inverse, pour le cas de la bogue, l'asymétrie directionnelle apparaît significative. C'est pourquoi, le chapitre II présente une étude à large échelle d'identification des stocks sur cette espèce reprenant des analyses du même type que celles présentées lors du chapitre I mais en les appliquant séparément à la forme de l'otolithe gauche seul, de l'otolithe droit seul et des 2 conjointement. L'objectif est d'évaluer si l'asymétrie directionnelle influence les résultats de l'identification des stocks sur la base de la forme externe des otolithes.

3.2 Etude 3 : Directional bilateral asymmetry in otolith morphology may affect fish stock discrimination based on otolith shape analysis

Mahé K, Ider D, Massaro A, Hamed O, Jurado-Ruzafa A, Goncalves P, Anastasopoulou A, Jadaud A, Mytilineou C, Elleboode R, Ramdane Z, Bacha M, Amara R, de Pontual H, Ernande B (2019). Directional bilateral asymmetry in otolith morphology may affect fish stock discrimination based on otolith shape analysis. ICES Journal of Marine Science, 76(1), 232-243.

3.2.1 Abstract

Otolith shape analysis is an efficient fish stock identification tool. However, most applications used left and right otoliths or only one of them arbitrarily chosen without testing for biases resulting from potential directional bilateral asymmetry (DA) in otolith shape, i.e., a unimodal population-level deviation from bilateral symmetry between right and left otolith shape. In this study, 560 bogues (*Boops boops*) were sampled from 11 geographical locations from the Canary Islands to the Aegean Sea and Elliptical Fourier descriptors were used to describe their otoliths' shape. Firstly, a significant otolith DA was observed at the global scale with an average amplitude of 2.77%. However, at the scale of sampling locations, DA was not always significant and varied in amplitude and direction. Secondly, population structure was investigated using the shape of either right otoliths or left otoliths or both together. Analyses based on right otoliths or both otoliths together, suggested 3 stock units: a North-Western Mediterranean Sea stock, an Eastern Mediterranean Sea stock and a Central-Eastern Atlantic Ocean and South-Western Mediterranean Sea stock. In contrast, no coherent geographical pattern was found based on left otoliths. Our results highlight the importance of accounting for potential otolith DA in otolith-shape based stock identification.

3.2.2 Keywords

Side effect, Boops boops, stock identification, Mediterranean Sea, Elliptical Fourier Analysis

3.2.3 Introduction

Stock identification and the knowledge of population spatial structure provide a basis for understanding fish population dynamics and achieving reliable assessments for fishery management (Reiss *et al.*, 2009). Some studies suggested that a lack of knowledge of population spatial structure in fisheries management might be responsible for fishery collapses (e.g. Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Western Atlantic, Hutchings, 2005; the crustacean fisheries of Alaska, Wooster, 1992; North-Western Atlantic herring, Stephenson *et al.*, 1999). Therefore, a wide number of techniques were developed and applied to identify and discriminate stock units, such as tagging experiments or analyses of spatial variation in arrangement of markers including genetic markers, morphological traits, life-history traits at various life-stages, parasite load or *infracommunity* structure, or contaminant concentration (e.g. Pawson and Jennings, 1996; Garcia *et al.*, 2011; Cadrin *et al.*, 2014; ICES, 2016, Pita *et al.*, 2016). Otoliths are calcified structures overlying the sensory epithelia in the inner ears. The left and right inner ear contain three pairs of otoliths each. They grow throughout the life of the fish and, unlike scales and bones, are metabolically inert (i.e. once deposited, otolith material is unlikely to be resorbed or altered, Casselman, 1987). Consequently, otolith shape remains unaffected by short-term changes in fish condition (Campana and Casselman, 1993) or environmental variations (Campana, 1999). Shape analysis was first used to discriminate fish stocks by using either scales of Atlantic salmon (*Salmo salar*) (de Pontual and Prouzet, 1987, 1988) or otolith of Atlantic cod (Campana and Casselman 1993). Since then, many studies have focused on otolith-shape analysis to discriminate between stock units, reaching an updated total of 91 papers published from 1993 to 2017 exclusively on this topic.

The shape of a fish's otolith depends on its genotype, its developmental stage (potentially described by a series of individual-state variables such as body size, age, sex and sexual maturity status) and both the biotic and abiotic environments encountered during its lifetime

(Castonguay *et al.*, 1991, Lombarte and Lleonart, 1993; Cadrin and Friedland, 1999; Begg and Brown, 2000; Cardinale *et al.*, 2004; Gagliano and McCormick, 2004; Monteiro *et al.*, 2005; Swan *et al.*, 2006; Mérigot *et al.*, 2007; Hüseyin, 2008; Vignon and Morat, 2010; Capoccioni *et al.*, 2011; Mille *et al.*, 2016). Besides inter-individual variation, otolith shape is also known to vary potentially intra-individually as left otolith shape may not be perfectly symmetrical to right otolith shape one and vice-versa (Díaz-Gill *et al.*, 2015). Such deviation or bilateral asymmetry can be of three different types corresponding to three different distributions of its individual values within a population (Palmer and Strobeck 1986, 1992). Fluctuating asymmetry (FA) corresponds to random individual deviations from perfect bilateral symmetry resulting in a normal distribution with mean 0. FA in otolith shape has been reported for some species of both roundfish and flatfish (Lemberget and McCormick, 2009; Lychakov, 2013; Díaz-Gil *et al.*, 2015). Directional asymmetry (DA) relates to a systematic deviation from bilateral symmetry towards one side (e.g. the otolith asymmetry in flatfish, Mille *et al.*, 2015) and is thus characterized by a normal distribution with a mean different from 0 whose sign depends on the side of the deviation. Antisymmetry (A) occurs when there is a systematic but alternating deviation towards one side or the other in the population, thus generating a bimodal distribution with mean 0 in its extreme form (e.g. of the claws of fiddler crabs Palmer and Strobeck, 1986; or lobsters Govind and Pearce, 1986). If DA or A occurs, it may affect the results of otolith-shape based stock discrimination, depending on which otolith is used. Among the 91 published studies on marine fish stock identification based on otolith shape analysis, only 20 of them took into account otolith shape asymmetry (A) and only 3 based their analyses on the two otoliths together. Most studies arbitrarily used otoliths from only one side. In this context, the first objective of the present study was to explore the effect of DA in otolith morphology on stock identification based on otolith shape analysis.

To describe the external contour or shape of otoliths, several techniques have been developed: univariate descriptors such as shape factors that include roundness or circularity (e.g. Tuset *et al.*, 2003), geometric morphometrics (e.g. Ponton, 2006; Ramirez-Perez *et al.*, 2010; Vergara-Solana *et al.*, 2013), wavelet functions (Parisi-Baradad *et al.*, 2005; Sadighzadeh *et al.*, 2014), growth markers (Benzinou *et al.*, 2013), curvature scale space (Mapp *et al.*, 2013) and geodesic methods (Benzinou *et al.*, 2013). However, the Elliptical Fourier Analysis (EFA) remains the most widely used method to describe otolith shape. In recent years, the number of studies using EFA has increased substantially and allowed the analysis of population structure of as diverse species as highly migratory oceanic swordfish (*Xiphias gladius*, Mahé *et al.*, 2016) and sedentary big-scale sand smelt (*Atherina boyeri*; Boudinar *et al.*, 2015).

In this paper, we used the bogue (*Boops boops*; Linnaeus, 1758), a species within the Sparidae family, as a case study for assessing the effect of DA and/or A on stock identification based on otolith shape analysis using EFA. This species has a wide geographical distribution from the Norwegian to Angolan coasts along the northeastern Atlantic, as well as in the Mediterranean and Black seas (Whitehead *et al.*, 1984). Bogue is both demersal and semi-pelagic and inhabits all types of seabed (sand, mud, rock and seagrass beds) down to 350m depth, but is most abundant in the upper 100m. It is an important species for Mediterranean fisheries with an average landing of 27,000 tons from 2010 to 2013 (ranked 7th and accounting for 1.8% of total catches in the Mediterranean Sea, FAO, 2016). This species is currently fully exploited by several commercial fisheries, either as a target species or as bycatch, mainly from pelagic trawlers (FAO, 2016; Dimarchopoulou *et al.*, 2017). Moreover, although bogue is one of the seven most studied species in the Mediterranean Sea (Dimarchopoulou *et al.*, 2017), no information is available on its general stock structure. Hence, the second objective of this study was to investigate the stock structure of the bogue in the Mediterranean Sea and the adjacent area of the Atlantic Ocean.

To reach the two objectives of this study, i.e. (1) to explore the impact of otolith DA on otolith-shape based stock identification and (2) to investigate bogue stock structure in the Mediterranean Sea, we extract left and right otolith shape using Elliptical Fourier descriptors and use them to, first, test for otolith DA and investigate how its varies across sampling locations and, second, investigate stock structure through a combination of linear discriminant analysis and clustering using sequentially the shape of left otoliths only, rights otoliths only and both together.

3.2.4 Materials and methods

3.2.4.1 Sample collection

Sagittal otoliths (left and right) were extracted from a total of 560 individuals ranging from 13 to 26 cm total length (mean±SE: 18.38±2.63 cm), collected from 11 locations from the Canary Islands to the Aegean Sea (Fig. 25 and Tab. 10). Samples were collected between 2013 and 2016 by six Institutes (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer - IFREMER, France; University Abderrahmane Mira, Algeria; APLYSIA institute, Italy; University of Tunis, Tunisia; Instituto Español de Oceanografía - IEO, Spain; Hellenic Centre for Marine Research-HCMR, Greece) during the international bottom trawl survey in the Mediterranean Sea (MEDITS surveys), on board fishing vessels and from fish markets. The sex of the sampled individuals was determined by macroscopic examination of their gonads and only mature fish were included in this study to minimize the effect of sexual maturity, which may affect otolith shape (Cardinale *et al.*, 2004). Moreover, to limit the effect of age on the otolith shape, the age range of fish sampled was limited from two to four years. In order to estimate the age of each individual, whole sagittal otoliths were examined, after cleaning, by two expert age readers in order to limit interpretation errors. To increase the visibility of the growth marks, otoliths were covered with clove essential oil and observed with a stereomicroscope under reflected light on a dark background.



Figure 25: Map of sampling locations of bogues (1: Tenerife Island; 2: Gulf of Oran, 3: Gulf of Bejaia, 4: Gulf of Annaba, 5: Gulf of Tunis, 6: Gulf of Lions, 7: Corsica Island, 8: Ligurian Sea, 9: Tyrrhenian Sea, 10: Ionian Sea, 11: Aegean Sea).

Table 10: Sampling scheme. The number of sampled individuals (Number), their total length (mean and standard deviation) and the sampling years are given by geographical area and year.

Geographical area	Number	Total length (cm) mean±se	Year sampling
Canary Islands	67	19.00±0.93	2016
1: Tenerife Island	67	19.00±0.93	2016
Algeria	179	16.25±3.25	2013/2014/ 2015/2016
2: Gulf of Oran	47	15.50±0.71	2015
3: Gulf of Bejaia	92	15.06±1.70	2013/2014
4: Gulf of Annaba	40	19.12±4.52	2016
Tunisia	48	18.50±1.02	2016
5: Gulf of Tunis	48	18.50±1.02	2016
France	95	19.89±3.75	2016
6: Corsica Island	41	18.50±1.91	2016
7: Gulf of Lions	54	21.00±4.69	2016
Italy	109	18.91±1.91	2015
8: Ligurian Sea	50	19.00±1.74	2015
9: Tyrrhenian Sea	59	18.82±2.07	2015
Greece	62	19.23±2.65	2014
10: Ionian Sea	35	16.80±2.86	2014
11: Aegean Sea	27	20.75±0.71	2014

3.2.4.2 Otolith shape analysis

A calibrated high-resolution image (3.200 dpi) of the proximal face of the whole left and right sagittal otolith was obtained using a scanner with reflected light (Epson V750). During this process, a fixed single magnification was used to ensure as high a resolution as possible. Image processing was performed using the image analysis system TNPC (Digital processing for calcified structures, version 7) with the *sulcus acusticus* facing up. In order to compare left and right otolith shapes, mirror images of left otoliths were used. The length and width of otoliths were automatically extracted as the largest distance along the antero-posterior axis and the ventro-dorsal axis, respectively.

To describe otolith contours, Elliptic Fourier Analysis (e.g. Lestrel, 2008) was carried out on each otolith contour delineated and extracted after image binarization. All Elliptic Fourier Descriptors (EFD's) were obtained by using TNPC 7 software. For each otolith, the first 99 elliptical Fourier harmonics (H) were extracted and normalised with respect to the first harmonic and were thus invariant to otolith size, rotation and starting point of contour

description (Kuhl and Giardina, 1982). To determine the number of harmonics required to reconstruct the otolith outline, the cumulated Fourier Power (F) was calculated for each individual otolith as a measure of the precision of contour reconstruction obtained with n_k harmonics (i.e., the proportion of variance in contour coordinates accounted for by the n_k harmonics):

$$F_{(n_k)} = \sum_{i=1}^{n_k} \frac{A_i^2 + B_i^2 + C_i^2 + D_i^2}{2}$$

where A_i , B_i , C_i and D_i are the coefficients of the H_i harmonic. $F(n_k)$ and n_k were calculated for each individual otolith k in order to ensure that each individual otolith in the sample was reconstructed with a precision of 99.99% (Lestrel, 2008). The maximum number of harmonics $n = \max(n_k)$ across all otoliths was then used to reconstruct each individual otolith.

3.2.4.3 Statistical analyses

DA in otolith shape was analysed as the effect of otolith's location side, i.e., left *versus* right inner ear (side SI , thereafter) on otolith shape. Firstly, Principal Components Analysis (PCA) was applied to the selected Elliptical Fourier Descriptors (EFD's) matrix (EFD's as columns and individual otolith as lines) of otolith contours (Rohlf and Archie, 1984) and a subset of the resulting Principal Components (PC's) was selected as otolith shape descriptor according to the broken stick model (Legendre and Legendre, 1998). The matrix of selected PCs, with PCs as columns and otoliths as lines, is referred to as the shape matrix S hereafter. This procedure allowed us to decrease the number of variables used to describe otolith shape variability while ensuring that the main sources of shape variation were accounted for, as well as to avoid co-linearity between shape descriptors (Rohlf and Archie, 1984).

The shape matrix (S) was analyzed using the following multivariate mixed-effects model:

$$S \sim L + SI + LO + SI:LO + i$$

where otolith shape variations due to side (SI), sampling location (LO) and their interaction ($SI:LO$) are represented by fixed effects. More precisely, SI measures DA at the global scale, LO assesses shape variation across sampling locations affecting both otoliths and $SI:LO$ represents variation in DA across sampling locations. Individuals' total length L was also included as a covariate to remove some potentially confounding ontogenetic effect on otolith shape. Finally, a random intercept (i) was used to account for variability due to individuals (or some of their characteristics, such as total length for instance) and autocorrelation between left and right otolith shape within individuals. The model was fitted with a different variance for each PC of the shape matrix S . Normality of the residuals and the random effects as well as homoscedasticity of the residuals were assessed by visual inspection of diagnostic plots. The significance of explanatory variables at 5% was tested by likelihood ratio tests between nested models while respecting marginality of the effects (type 2 tests; Fox and Weisberg 2011) that are supposed to follow a χ^2 distribution under the null hypothesis. To visualise differences in otolith shape between right and left sides, an average otolith shape was rebuilt for each side based on EFD's. Moreover, the direction and amplitude of DA at the global scale and at each sampling location was extracted from the multivariate mixed-effects model as the estimators of the side effect SI and of the interaction between head side and sampling location $SI:LO$, respectively. To ease interpretation, it was also evaluated as the average percentage of non-overlapping surface between the right and left otoliths' shapes reconstructed on the basis of the EFD's at the individual level. The percentage was computed relative to the total area.

To discriminate fish from the 11 sampled locations based on otolith shape, a Linear Discriminant Analysis (LDA) with jackknifed prediction was applied to the residuals R_S of a redundancy analysis (RDA) $S \sim L$ of the shape matrix S explained by individuals' total length L . The use of the residual matrix R_S instead of the shape matrix S was meant to avoid potential confounding effects due to

otolith shape variation across sampling locations related to variations in individuals' size originating from different size-selectivity of the capture procedure/gear at different sampling sites (Rencher and Christensen, 2012). To evaluate the resulting discriminant functions, the percentage of correct classification of individuals into sampling areas was calculated using jackknife cross-validation (Klecka, 1980) and compared to those obtained from random distribution. Moreover, the performance of the discriminant analyses was assessed using the Wilks' λ . This value is the ratio between the intra-group variance and the total variance, and provides an objective way of calculating the percentage of agreement between real and predicted groups' membership. Wilks' λ values range from 0 to 1 and the closer to 0, the better the discriminating power of the RDA. To complete the stock identification procedure, a cluster analysis according to Ward's hierarchical agglomerative algorithm based on squared Euclidean distances was performed on the residual shape matrix R_S to group individuals with similar otolith shapes. These analyses were carried out three times: on left otoliths only, on right otoliths only and on both.

Statistical analyses were performed using the following packages in the statistical environment R (R Development Core Team, 2016): 'nlme' (Pinheiro *et al.*, 2016), 'Effects' (Fox, 2003), 'Vegan' (Oksanen *et al.*, 2013), 'SP' (Bivand *et al.*, 2013), 'ggplot2' (Wickham, 2016), 'RGEOS' (Bivand *et al.*, 2013), 'MASS' (Venables and Ripley, 2002) and 'RRCOV' (Todorov and Filzmoser, 2009).

3.2.5 Results

3.2.5.1 Directional asymmetry in otolith shape

Among the 99 Fourier harmonics extracted to describe individual otolith contours, the first 26 harmonics explained at least 99.99% of the variation in otolith contour of each individual and were thus used for further analysis. After PCA on the EFD's, only the first six PC's were kept for the shape matrix S according to the broken-stick model (which, in this case, corresponded to a threshold of 2.4% of the total variance explained; Borcard *et al.*, 2011). These 6 PC's explained 78% of the total variance in the EFD's.

The multivariate mixed-effects model on the shape matrix S showed that there was a significant DA between left and right otolith shape at the global scale (Tab. 11, *SI* effect) with

a consistent bias towards the right side (Supplementary Fig. S1). The amplitude of DA, measured as the percentage of the non-overlapping surface between the right and left otolith shapes, was on average equal to 2.77% among all sampling sites. However, there was also a significant effect of the interaction between side and sampling location on otolith shape (Tab. 11; *SI:LO* effect) indicating that the amplitude and/or the direction of DA varied across sampling locations.

Table 11: Results of the multivariate mixed-effects model on the shape matrix *S*. For each explanatory variable, the χ^2 statistic, the associated degrees of freedom (df) and the resulting p-value (P) for a type II test are given. * <0.05 ; ** <0.01 , * <0.001 .**

Variable	χ^2	df	P
TL	422.599	7	<0.001
SI	34.580	7	<0.001
LO	96.822	7	<0.001
SI:LO	121.923	7	<0.001

More precisely, the amplitude of DA varied between 1.25% and 4.66% depending on the sampling site (Fig. 26) and was significant in only 5 of them, located along the Algerian and Italian coasts. The main shape difference between left and right otoliths was located between the rostrum and the antirostrum has shown by average left and right otoliths shape reconstruction at each sampling location (Fig. 26). In addition to its amplitude, the direction of DA also varied according to the considered location (Fig. 26). Among the sampling locations with a significant DA, the right otolith presented a width/length ratio larger than the left one in the Ligurian and Tyrrhenian Seas whereas it was the reverse in the Gulfs of Oran, Bejaia and Annaba (Fig. 26; Supplementary Table S1).

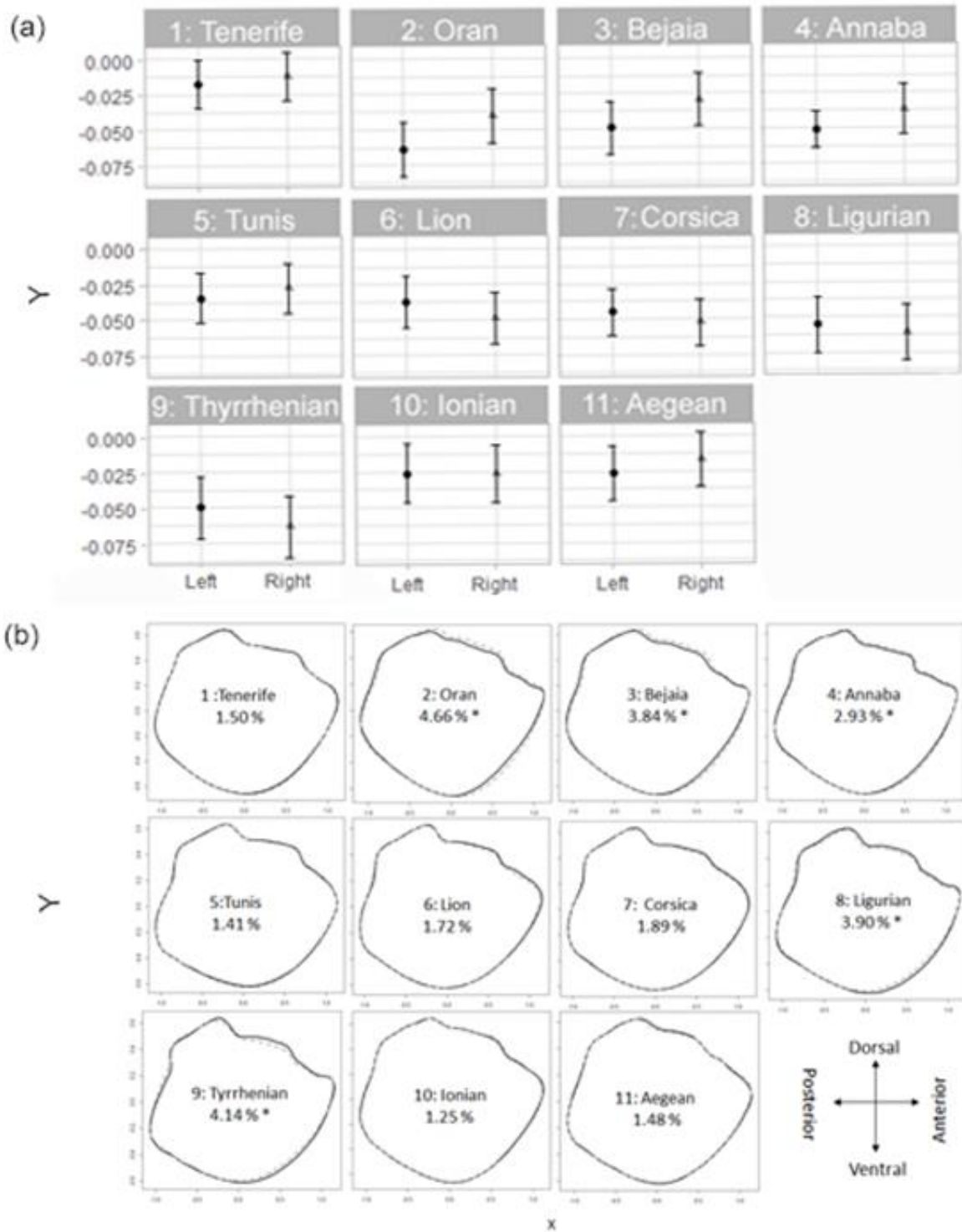


Figure 26: A) Directional asymmetry between left and right otolith shape at each sampling location as estimated by the interaction between side and sampling location in the multivariate mixed-effects model. Black dots and grey triangles represent the estimator for the left and right otolith, respectively, and vertical bars are there 95% confidence intervals. Percentage given in each panel is the average percentage of non-overlapping surface between the two reconstructed otolith shapes at the individual level. B) Difference between right (black line) and left (grey dotted line) otolith shape for each geographical location as shown by average shape reconstruction for each sampling location based on EFD's. Percentages are the average percentages of non-overlapping surface between the two reconstructed otolith shapes at the individual level (*<0.05).

3.2.5.2 Fine-grained geographical structuring of otolith shape

The effect of sampling location on otolith shape was significant in the multivariate mixed effects model (Tab. 11, *LO* effect) suggesting geographical variation in otolith shape that could be used to discriminate individuals from different geographical origins. Sampling location was therefore used as an explanatory variable in the subsequent otolith shape-based LDA. In contrast with the previous analyses, the procedure to produce the otolith shape matrix S was performed separately for left and right otoliths. The first six PC's after PCA on the first 26 harmonics EFD's were selected for the corresponding left and right shape matrices S_L et S_R . After removal of the effect of individuals' total length L by a RDA on S_L and S_R to obtain residual shape matrices R_{S_L} and R_{S_R} , the overall jackknifed classification success of the LDA was 37% for the left otoliths and 39% for the right ones (Tab. 12 & 13).

Table 12 : Jackknifed correct classification matrix of the Linear Discriminant Analysis for left otoliths ($n =560$) between the 11 sampling areas based on the residual shape matrix R_{S_L} . The number in each cell represents the number of individuals of the area of origin corresponding to the cell row classified into the predicted area corresponding to the cell column.

		Predicted Area											%correct
		1: Tenerife	2: Oran	3: Bejaia	4: Annaba	5: Tunis	6: Lions	7: Corsica	8: Ligurian	9: Tyrrhenian	10: Ionian	11: Aegean	
Actual area	1: Tenerife	18	4	24	4	8	3	0	1	0	0	5	27%
	2: Oran	0	16	29	1	0	0	0	1	0	0	0	34%
	3: Bejaia	10	8	61	1	2	5	0	4	0	0	1	66%
	4: Annaba	0	5	10	12	3	2	0	8	0	0	0	30%
	5: Tunis	9	0	8	2	22	4	1	1	0	0	1	46%
	6: Lions	3	2	10	2	6	17	4	10	0	0	0	31%
	7: Corsica	1	0	4	3	3	9	12	8	1	0	0	29%
	8: Ligurian	0	0	12	3	3	4	2	22	4	0	0	44%
	9: Tyrrhenian	6	0	12	11	1	5	2	10	12	0	0	20%
	10: Ionian	3	4	4	0	2	1	1	1	0	6	13	17%
	11: Aegean	3	1	3	1	3	0	0	4	0	5	7	26%
Total	53	40	177	40	53	50	22	70	17	11	27	37%	

Table 13 : Jackknifed correct classification matrix of the Linear Discriminant Analysis for right otoliths ($n = 560$) between the 11 sampling areas based on the residual shape matrix R_{SR} . The number in each cell represents the number of individuals of the area of origin corresponding to the cell row classified into the predicted area corresponding to the cell column.

		Predicted Area											
		1:	2:	3:	4:	5:	6:	7:	8:	9:	10:	11:	%correct
		Tenerife	Oran	Bejaia	Annaba	Tunis	Lions	Corsica	Ligurian	Tyrrhenian	Ionian	Aegean	
Actual area	1: Tenerife	31	3	12	2	8	2	6	1	0	1	1	46%
	2: Oran	4	22	20	1	0	0	0	0	0	0	0	47%
	3: Bejaia	7	9	65	1	0	5	1	1	1	2	0	71%
	4: Annaba	2	1	21	6	0	8	0	2	0	0	0	15%
	5: Tunis	6	0	1	1	27	4	3	1	3	0	2	56%
	6: Lions	7	1	2	0	5	25	8	3	2	0	1	46%
	7: Corsica	8	0	1	1	2	12	4	9	3	0	1	10%
	8: Ligurian	1	1	5	1	5	10	8	8	9	1	1	16%
	9: Tyrrhenian	0	0	1	0	2	17	14	11	13	1	0	22%
	10: Ionian	2	1	2	0	3	0	1	2	1	12	11	34%
	11: Aegean	2	0	3	1	4	0	3	3	0	7	4	15%
Total		70	38	133	14	56	83	48	41	32	24	21	39%

The analysis confirmed significant differences between sampling sites for otoliths of both sides (left otoliths: Wilks' $\lambda = 0.426$; $F_{2860}^{60} = 10.13$; $p < 0.001$; right otoliths: Wilks' $\lambda = 0.351$; $F_{2860}^{60} = 12.97$; $p < 0.001$). For left otoliths, the misclassified individuals were distributed across all locations (Tab. 12) whereas, for right otoliths, they were segregated between two main groups: N-W Mediterranean Sea *versus* other locations (Table 13).

3.2.5.3 Clustering on otolith shape

The hierarchical clustering analysis identified three clusters for left and right otoliths (Tab. 14). No geographical coherence was identified for the three clusters of the left otoliths (Tab. 14). However, for right otoliths, the predicted areas coincided with 1) the north-western part of the Mediterranean Sea (Gulf of Lions, Corsica, Northern Ligurian Sea and Southern Ligurian Sea), 2) a large continuum composed of the central-eastern Atlantic Ocean (Tenerife Island) and the South-Wwestern part of Mediterranean Sea (Gulfs of Oran, Bejaia, Annaba and Tunis) and 3) the eastern part of the Mediterranean Sea (Ionian Sea and Aegean Sea) (Tab. 14).

Table 14 : Classification matrix resulting from hierarchical clustering on the residual shape matrix for left otoliths R_{S_L} and right otoliths R_{S_R} ($n = 560$) between the 11 sampling areas. For each area, the cluster gathering the highest number of individuals is highlighted by a shaded cell.

Area	Left otolith			Right otolith			Total
	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	
1: Tenerife Island	53	14		60	4	3	67
2: Gulf of Oran	36	11		38	1	8	47
3: Gulf of Bejaia	74	18		81	5	6	92
4: Gulf of Annaba	18	22		25	10	5	40
5: Gulf of Tunis	12	36		27	20	1	48
6: Gulf of Lions	26	26	2	25	27	2	54
7: Corsica Island	19	19	3	11	29	1	41
8: Ligurian Sea	35	23	2	28	29	3	60
9: Tyrrhenian Sea	15	32	2	20	28	1	49
10: Ionian Sea	29	6		32	3		35
11: Aegean Sea	17	10		18	9		27
Total	334	217	9	365	165	30	560

The same analyses as above were repeated but using the shape of otoliths of both sides at the same time. The results corroborated those obtained when using the right otoliths only. Firstly, the overall jackknifed classification success was 39%, similar to the one obtained with the right otoliths (Supplementary Table S2; Tab. 14). Secondly, the hierarchical clustering analysis identified the same 3 geographically coherent clusters (Supplementary Table S2; Tab. 14)

3.2.5.4 Stock structure inferred from otolith shape

The stock structure was investigated using right and left otoliths together. Combining the geographical areas into two stocks, the North-Western Mediterranean Sea and the rest consisting of the Atlantic Ocean and the South-Western Mediterranean Sea, 72% of individuals were assigned correctly by the LDA. However, the overall classification success was the same when integrating the Central and Eastern Mediterranean Sea (Gulf of Tunis, Aegean and Ionian Seas) in either of the two previous stocks. The best overall classification success (Wilks' $\lambda = 0.525$; $F_{1106}^{12}=40.13$; p-value<0.001; Correct classification rate = 86%) was obtained with 3 stocks units consisting in:

- the North-Western Mediterranean Sea (from the Gulf of Lions to the Tyrrhenian Sea),
- the Central-Eastern Atlantic Ocean and South-Western Mediterranean Sea (from the Canary Islands to Gulf of Tunis), and
- the Eastern Mediterranean Sea (from the Ionian Sea to Aegean Sea).

The otoliths from the North-Western Mediterranean Sea presented a lower width/length ratio than that of the otoliths from the southern part of the Mediterranean Sea and the Atlantic Ocean. The otoliths from the Eastern Mediterranean Sea were closer to those from the southern part of the Mediterranean Sea than to those from the North-Western Mediterranean Sea in terms of shape (Fig. 27).

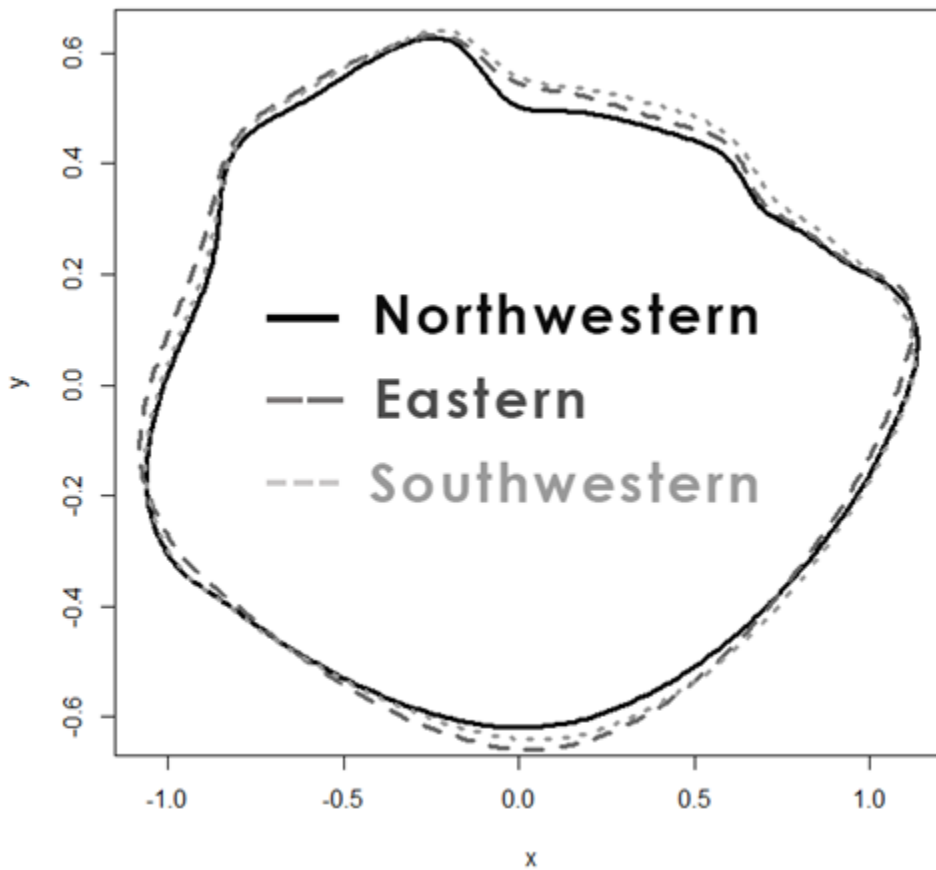


Figure 27: Difference among average reconstructed otolith shapes between the 3 identified stock units: Northwestern Mediterranean Sea (solid line; from the Gulf of Lions to the Tyrrhenian Sea), Eastern Mediterranean Sea (dashed line; from the Ionian Sea to the Aegean Sea) and Southwestern Mediterranean Sea and Atlantic Ocean (dotted line; from the Canary Islands to the Gulf of Tunis).

This split into 3 stocks using both right and left otoliths dataset together was also coherent when using right otoliths' shape (Wilks' $\lambda = 0.627$; $F_{1106}^{12}=31.71$; p-value<0.001; Correct classification rate= 75%), whereas it was not with left otoliths' shape (Wilks' $\lambda = 0.741$; $F_{1106}^{12}=30.45$; p-value=0.081, Correct classification rate = 47%).

3.2.6 Discussion

3.2.6.1 Effect of confounding factors on the otolith shape

The otolith shape of fish from different geographical origins is affected by both abiotic environmental parameters (e.g. temperature, salinity) and biotic parameters such as prey availability, and is dependent on individual genotype (Campana and Casselman, 1993; Cadrin and Friedland, 1999; Torres *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2004; Gagliano and McCormick, 2004; Swan *et al.*, 2006; Vignon and Morat, 2010). Consequently, a combination of both environmental and genetic variation generates the morphological differences in otolith shape that may allow the discrimination of stock units. However, the factors that influence the shape are not fully understood and have not been investigated deeply yet (Burke *et al.*, 2008). A recent study showed that the ontogenetic trajectory of otolith shape could be affected by the environmental disturbance during early life stage (Vignon, 2018). Other studies have attributed shape differences to fish length (Smith, 1992; Campana and Casselman, 1993; Mériqot *et al.*, 2007), age (Bird *et al.*, 1986), year-class (Castonguay *et al.*, 1991; Campana and Casselman, 1993; Bolles and Begg, 2000; Mapp *et al.*, 2017), sexual maturity (Campana and Casselman, 1993; Cardinale *et al.*, 2004) and sexual dimorphism (Campana and Casselman, 1993; Bolles and Begg, 2000). More specifically, otolith shape has been reported to be related to fish growth and thus subsequently size (e.g. Campana and Casselman, 1993). Furthermore, ontogenic changes in otolith shape, also often measured as size-related variation, have been shown to arise from variability in growth rates depending on habitat quality and the developmental processes (Simoneau *et al.* 2000, Monteiro *et al.*, 2005).

Additionally, the formation of a secondary growth centre and/or the appearance of checks in response to stress conditions can modify the otolith shape and the level of crenulation during the early life stages (Campana and Nielson, 1985; Massou *et al.*, 2004; Hüseyin, 2008; Vignon, 2018). Consequently, the complexity of the otolith outline increases with the ontogenetic stage of the fish. To limit this effect, sampling can be restricted to a specific life-stage and/or to a narrow length range. If these factors are not taken into account, results of otolith shape-based stock discrimination might be biased. This is the reason why all analyses in this study were carried out on adults of two to four years old within a limited size range. In addition, the effect of individuals' total length was systematically accounted for.

3.2.6.2 Directional bilateral asymmetry in otolith shape

Our results show that DA can be observed in otolith shape in roundfishes such as bogue. DA between right and left otolith shapes was previously described for other roundfish species such as *Liza ramada* (Rebaya *et al.*, 2017), *Diplodus annularis* (Trojette *et al.*, 2015), *Diplodus puntazzo* (Bostanci *et al.*, 2016), *Clupea harengus* (Bird *et al.*, 1986) and *Scomberomorus niphonius* (Zhang *et al.*, 2016). Conversely, symmetry between left and right otolith shapes was observed for other fish species: *Gadus morhua* (Cardinale *et al.*, 2004; Petursdottir *et al.*, 2006), *Synechogobius ommaturus* (Wang *et al.*, 2011), *Coryphaena hippurus* (Duarte-Neto *et al.*, 2008), *Xiphias gladius* (Mahé *et al.*, 2016), *Scomber scombrus* (Castonguay *et al.*, 1991), and *Lutjanus kasmira* (Vignon and Morat, 2010). Although these studies tested for DA in roundfishes (and sometimes detected), they never studied it in detail. DA has also been reported for flatfish species, such as *Solea solea* (Merigot *et al.*, 2007; Mille *et al.*, 2015), *Limanda limanda* and *Lepidorhombus whiffiagonis* (Mille *et al.*, 2015). Otolith DA is expected in flatfishes and could arise during their early life, particularly after the cranial deformation and the migration of one eye to the other side caused by cell proliferation in suborbital tissue during metamorphosis at the larval stage (Bao *et al.*, 2011). This lateralization process may induce the difference in otolith biomineralisation (carbonate

accretion rates) often observed between the two inner ears of flatfishes, with the blind side generally growing faster in length and weight than the eyed side (Sogard, 1991; Fischer and Thompson, 2004; Helling *et al.*, 2005, Mille *et al.*, 2015).

In contrast, in bilaterally symmetrical organisms, i.e., most vertebrates including roundfishes, symmetry is expected to be the rule and to be maintained by *homeostasis* processes (Palmer, 2009). Deviations from bilateral symmetry in roundfish otolith shape have been reported as potentially resulting from FA and/or DA (Lemberget and McCormick, 2009; Lychakov, 2013). The origin and consequences of otolith FA on fish remain largely unknown and debated (Diaz *et al.*, 2015), although it has been documented in several fish species and is regularly associated with stress and/or environmental heterogeneity and thus thought as an indicator of developmental instability (Downhower *et al.*, 1990; Lemberget and McCormick, 2009, Green *et al.*, 2017). Lemberget and McCormick (2009) supported that otolith FA could be considered as a sensitive indicator of fish health that directly affects the fish performance because otoliths are essential to balance and hearing. More studies need to be carried out to improve the understanding of otolith FA, including its sources and effects.

Regarding DA, which is a consistent bias towards one side, even less is known regarding its potential origin in roundfishes. Although it has been observed in some previous studies, it was only considered as a nuisance in otolith shape analysis and not considered further. Specifically, there was no study trying to identify potential geographical or phylogenetic patterns in otolith DA in roundfishes. The present study shows that DA can be observed for one roundfish species in some geographical areas, whereas it is not in others. In addition, the direction of DA can change according to the geographical area where it is detected. Although it is difficult to say whether these results could be generalized to other roundfish species, they suggest that variability in otolith DA in bogue at least could be related to population geographical structuration and thus could be a phenotypically plastic response to

environmental drivers, such as temperature, current patterns and food availability, and/or result from genetic differentiation between geographical locations.

Whether varying DA across geographical location results from adaptive or passive phenotypic plasticity and/or adaptive or neutral genetic differentiation is then an open question. Otolith shape asymmetry, be it FA or DA, could generate some dysfunction of the vestibular sensing (Hilbig *et al.*, 2011). Notably, otolith asymmetry affects the acoustic functionality (sensitivity, temporal processing and sound localization) (Lychakov and Rebane, 2005; Lychakov *et al.*, 2008) and is related to kinetotic swimming of fish (aberrant movement pattern or static space sickness) (Anken *et al.*, 1998; Beier *et al.*, 2002; Hilbig *et al.*, 2003; Hilbig *et al.*, 2011). In contrast, no obvious advantage of otolith asymmetry has been put forward in the literature, which suggests that, be it of plastic or genetic origin, otolith DA in roundfishes could be non-adaptive.

3.2.6.3 Stock structure of bogue in the Mediterranean Sea and the Atlantic Ocean

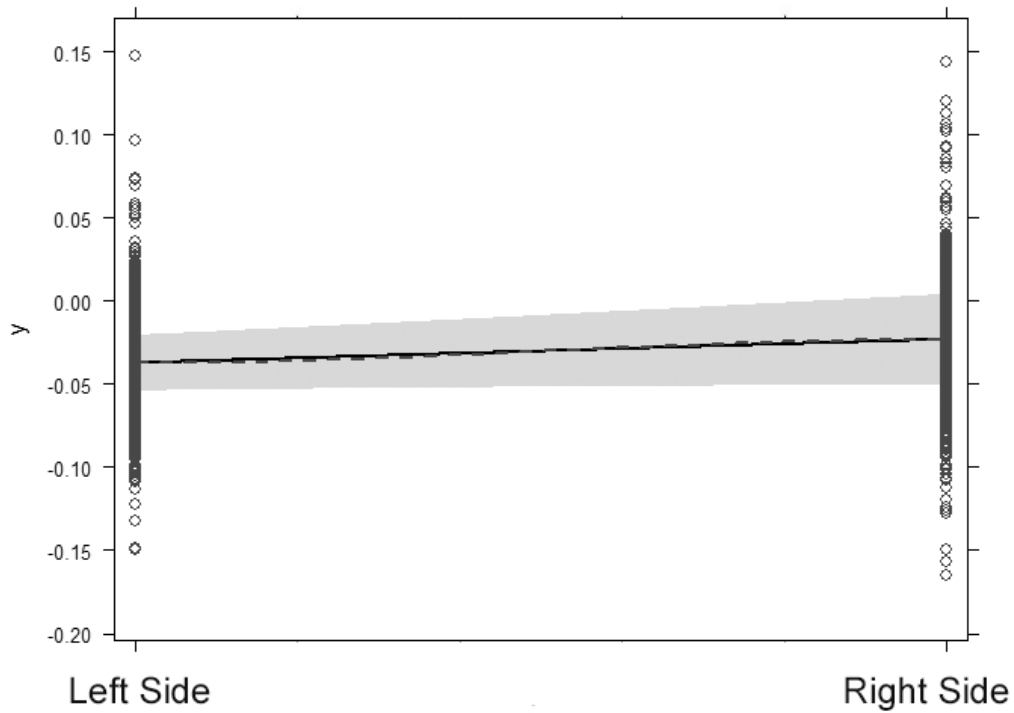
The stock structure revealed by shape analysis of the right otoliths was similar to that obtained when using otoliths from both sides. Three different stocks were identified: North-Western Mediterranean Sea (from the Gulf of Lions to the Tyrrhenian Sea), Central-Eastern Atlantic Ocean and South-Western Mediterranean Sea (from the Canary Islands to the Gulf of Tunis) and Eastern Mediterranean Sea (from the Ionian Sea to the Aegean Sea). This stock structure is similar to that observed for other species in the same areas such as sardine or cephalopods (see Jemaa *et al.*, 2015; Keller *et al.*, 2017). Ider *et al.* (2017) analyzing only the data from the Algerian coasts, identified only one stock for this area just as the present study conducted at much larger geographic scale, which indicates consistency of otolith shape-based stock discrimination across multiple geographic scales. Factors structuring bogue stocks at the level of the Mediterranean region seem to be linked to environmental features, notably physical oceanographic characteristics of the studied area. The Mediterranean Sea presents a complex circulation pattern. In the South-Western Mediterranean Sea, the

environmental conditions are directly influenced by oceanographic processes (Catalan *et al.*, 2013) with the entrance of the Atlantic current being the main forcing agent modulating hydrological processes (Garcia-Lafuente *et al.*, 1998). This exchange of water masses creates the Almeria-Oran front, with Atlantic water entering the Mediterranean Sea at the surface (up to 150–200m), and generates a strong current that feeds the Algerian current. This circulation pattern could explain the presence of one stock unit from the Canary Islands to the Algerian coast and its isolation from one stock unit in the North-Western Mediterranean Sea, the latter being also under the influence of the Northern current. The Sicily Channel is a known physical barrier between the western and the eastern basins of the Mediterranean Sea because of its relatively low depth and its peculiar circulation pattern. Regarding the latter, it is under the mixed influence of the Atlantic Ocean current in the western part and, conversely, of the Levantine Intermediate Water current (LIW), which moves water masses from east to west, in the eastern part (Skloris, 2014). This would explain the separation of the eastern Mediterranean stock from the two more western ones. On top of the hydrological regime, variations in environmental conditions are also likely to play a major role in the observed differences in otolith shape within the studied geographic areas. Water temperature is a key factor influencing primary production in the Mediterranean Sea and these two factors combined are important drivers of fish growth. The average annual sea surface temperature (SST from 2013 to 2016, sampling period, Supplementary Fig. S3) exhibited a clear gradient between the northwestern and the southeastern parts of the Mediterranean Sea with higher values along the Levantine coast (Shaltout and Omstedt, 2014). Conversely, primary production (measured as average annual chlorophyll-a concentration) decreased along a gradient from the North-Western Mediterranean Sea characterized by oligotrophic waters to the southeastern Mediterranean Sea identified as ultraoligotrophic waters (Supplementary Fig. S4; Stambler, 2014). As for the circulation pattern, the Sicily Channel stands out as a

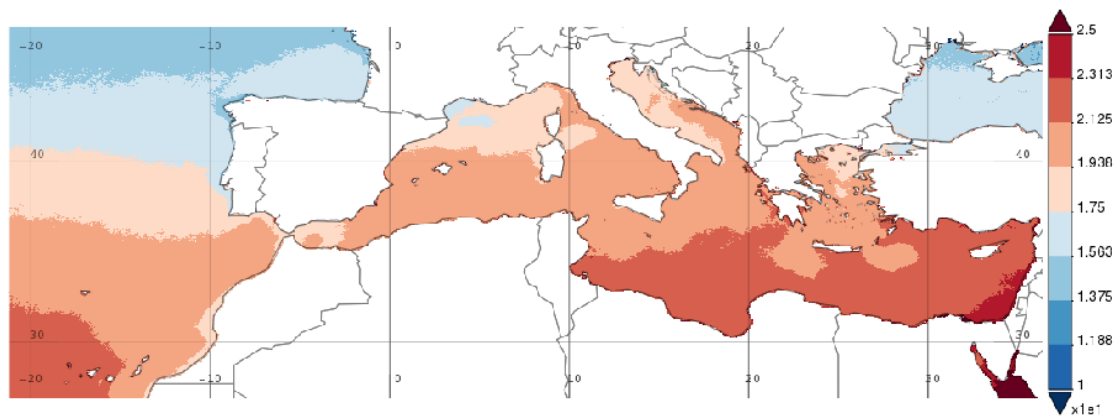
transition zone in terms of environmental conditions. It is characterized by intermediate temperatures (Supplementary Fig. S2) and a mix of high primary production along the Tunisian coasts, and more specifically in the Gulf of Gabes, and low primary production in the rest of the Channel (Supplementary Fig. S3), which generates some variations of the food web in the area (Rumolo *et al.*, 2017). The higher rate of misclassification of fish sampled in Tunisia is likely to result from the transitional nature of the Sicily Channel in terms of circulation and environmental conditions.

These results highlight the importance of taking into account potential otolith DA when using otolith shape analysis for fish stock identification. Our analyses suggest that there are 3 bogue stocks in the study area that are geographically coherent and make sense relative to the circulation pattern and environmental conditions in the Mediterranean Sea when using right otoliths or otoliths of both sides together, whereas no population structuration is found when using left otoliths. These results about bogue population structure would need to be confirmed by further studies including genetic analyses of specimens included in the otolith shape analysis and/or otolith microchemistry.

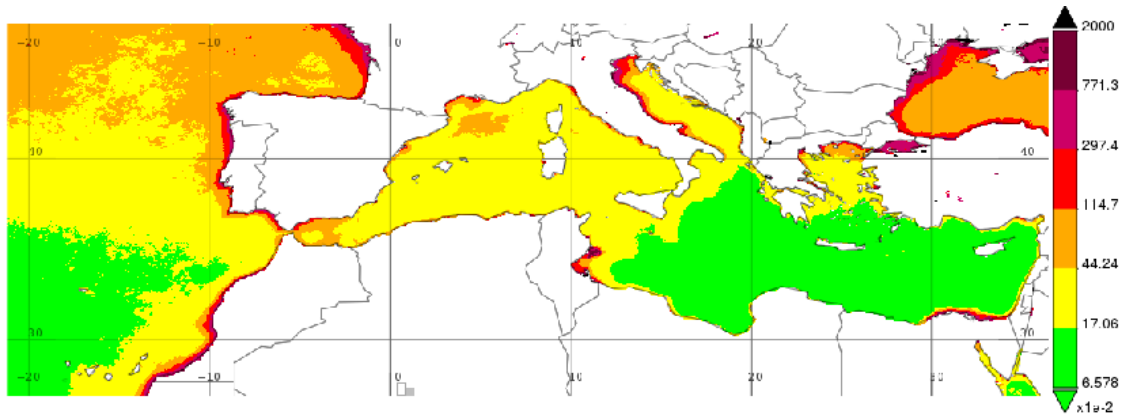
3.2.7 Données supplémentaires



Supplementary Appendix Figure S1: Directional asymmetry between left and right otolith shape at the global scale as estimated by the side effect SI in the multivariate mixed-effects model.



Supplementary Appendix Figure S2: Average annual Sea Surface Temperature (SST) over the studied area from 2013 to 2016 (SeaWiFS Satellite data).



Supplementary Appendix Figure S3: Average annual concentration of chlorophyll-a (Chl-a) over the studied area from 2013 to 2016 (SeaWiFS Satellite data).

Supplementary Appendix Table S1: Average Width/Length ratio for the left and right otoliths at each sampling location.

Width/Length	Left otolith	Right otolith
1: Tenerife Island	88.49%	88.48%
2: Gulf of Oran	88.75%	87.45%
3: Gulf of Bejaia	88.19%	87.08%
4: Gulf of Annaba	86.72%	87.45%
5: Gulf of Tunis	87.28%	87.27%
6: Gulf of Lions	87.45%	87.46%
7: Corsica Island	87.45%	87.45%
8: Ligurian sea	87.27%	87.44%
9: Tyrrhenian sea	87.29%	87.45%
10: Ionian Sea	87.49%	87.47%
11: Aegean Sea	87.45%	87.46%

Supplementary Appendix Table S2 : Jackknifed correct classification matrix of the LDA for left and right otoliths together (n =560) between the 11 sampling locations based on the residual shape matrix R_S . The number in each cell represents the number of individuals of the area of origin corresponding to the cell row classified into the predicted area corresponding to the cell column. The correct classification cells are thus on the main diagonal (shaded). Overall classification success: 39.1% (Wilks' lambda= 0.177, P<0.001).

		Predicted Area											%correct
		1: Tenerife	2: Oran	3: Bejaia	4: Annaba	5: Tunis	6: Lions	7: Corsica	8: Ligurian	9: Tyrrhenian	10: Ionian	11: Aegean	
Actual area	1: Tenerife	30	1	12	3	9	2	3	2	0	3	2	45%
	2: Oran	2	18	24	3	0	0	0	0	0	0	0	38%
	3: Bejaia	8	8	67	1	5	1	0	0	0	2	0	73%
	4: Annaba	4	6	17	9	0	1	1	2	0	0	0	23%
	5: Tunis	10	1	0	1	29	1	1	1	2	0	2	60%
	6: Lions	6	1	3	2	4	16	8	7	7	0	0	30%
	7: Corsica	8	0	1	1	2	15	2	10	2	0	0	5%
	8: Ligurian	1	0	1	1	1	7	5	21	21	2	0	35%
	9: Tyrrhenian	2	0	0	0	0	5	3	23	16	1	0	32%
	10: Ionian	6	2	15	0	1	0	2	3	0	6	0	17%
	11: Aegean	4	0	7	2	5	0	0	3	2	1	3	11%
Total		81	37	147	23	56	48	25	72	50	15	7	39%

Supplementary Appendix Table S3: Classification matrix resulting from hierarchical clustering on the residual shape matrix for left otoliths R_S (n = 560) between the 11 sampling areas. For each area, the cluster gathering the highest number of individuals is highlighted by a shaded cell.

Area	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Total
1: Tenerife	59	4	4	67
2: Oran	32	7	8	47
3: Bejaia	70	9	13	92
4: Annaba	23	12	5	40
5: Tunis	30	10	8	48
6: Lions	20	31	3	54
7: Corsica	14	25	2	41
8: Ligurian	21	32	7	60
9: Tyrrhenian	18	30	1	49
10: Ionian	31	4		35
11: Aegean	16	9	2	27
Total	334	173	53	560

3.3 Synthèse du chapitre II

- Le niveau et le sens de l'asymétrie directionnelle entre la forme des otolithes droits et la forme des otolithes gauches varient d'une zone d'étude à l'autre au niveau intra-spécifique.
- Lorsqu'une asymétrie directionnelle est constatée chez une espèce, l'identification de stocks sur la base de la forme des otolithes peut différer selon l'otolithe qui est choisi et donc il est nécessaire de réaliser une analyse préalable avant d'utiliser l'un ou l'autre des otolithes.

Chapitre III : Effet de facteurs environnementaux sur l'analyse de forme des otolithes testés en milieu contrôlé

4.1 Introduction générale du Chapitre III

Après les 3 études *in situ* des chapitres 1 et 2, ce dernier chapitre présente 2 études expérimentales réalisées sur une espèce-modèle en expérimentation animale : le bar commun (*Dicentrarchus labrax*). La connaissance avancée de son cycle de vie en élevage permet de se focaliser uniquement sur l'étude de l'effet de paramètres précis sans se soucier de difficultés dues à de mauvaises connaissances zootechniques. Après avoir étudié la structuration des stocks et évalué l'importance des composantes génétique et environnementale sur la forme de l'otolithe, cette dernière partie, quant à elle, se veut être une contribution à une meilleure compréhension des facteurs environnementaux pouvant influencer la morphogénèse de l'otolithe et donc sa forme. Les études de ce chapitre portent également une attention particulière sur les effets dus à l'ontogénie et en particulier au développement de l'asymétrie des otolithes droits et gauches au cours des premiers stades de vie du poisson. Nous avons analysé les effets de facteurs environnementaux, comme la température de l'eau mais aussi ceux de la composition du régime alimentaire en termes d'acides gras polyinsaturés oméga-3 (n-3AGPI) sur la forme de l'otolithe. Pour tester les effets de ces facteurs, la première étude a été menée sur des bars, provenant d'une souche génétique Atlantique, élevés entre 0 et 200 jours post-fertilisation (jpf) à des régimes constants de température de 15°C et 20°C et nourris avec des taux de n-3AGPI de 0.73% et de 1.65% (niveau bas avec des farines de Colza et de poissons/niveau haut avec des farines de poissons uniquement). La deuxième étude a été menée quant à elle sur des individus, provenant d'une souche génétique méditerranéenne, élevés de 0 à 150 jpf à 16°C puis transférés par lots tous les 30 jours jusqu'à 230 jpf vers des

bassins à 21°C pour tester l'effet du facteur température à différents stades du développement. Pour analyser l'effet de la température sur la forme des otolithes, le concept de temps thermique ou unité thermique a été utilisé. Celui-ci repose sur le nombre de degrés-jours de croissance emmagasinés par l'individu (Neuheimer et Taggart, 2007). Cette approche par degrés-jours quantifie les opportunités thermiques de croissance en agrégeant les températures journalières auxquelles la température agit sur la croissance (Fig. 28).

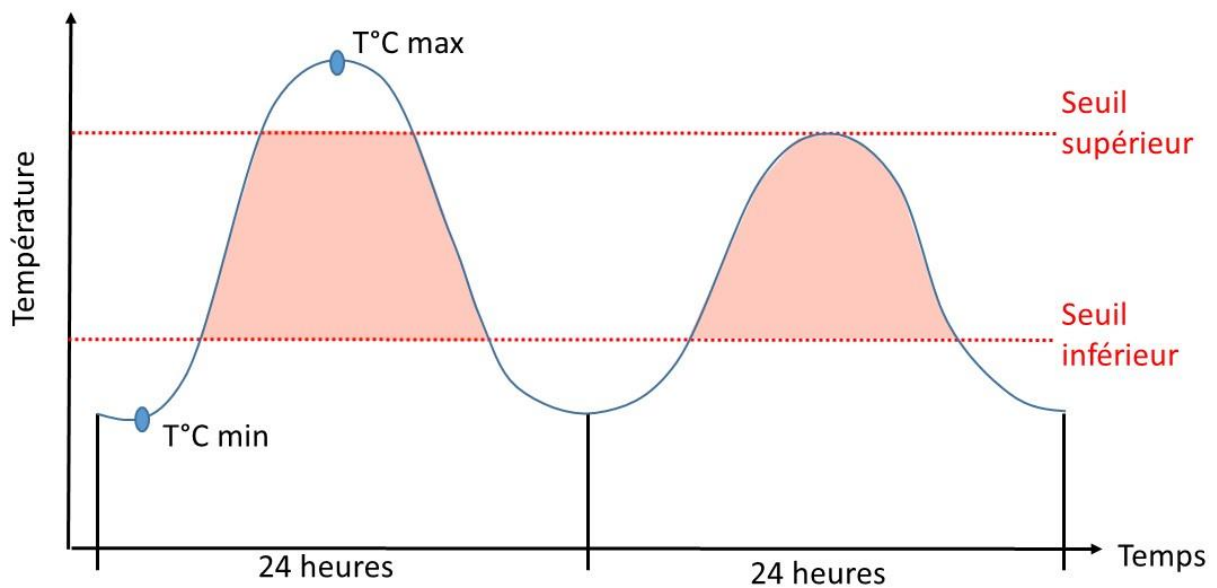
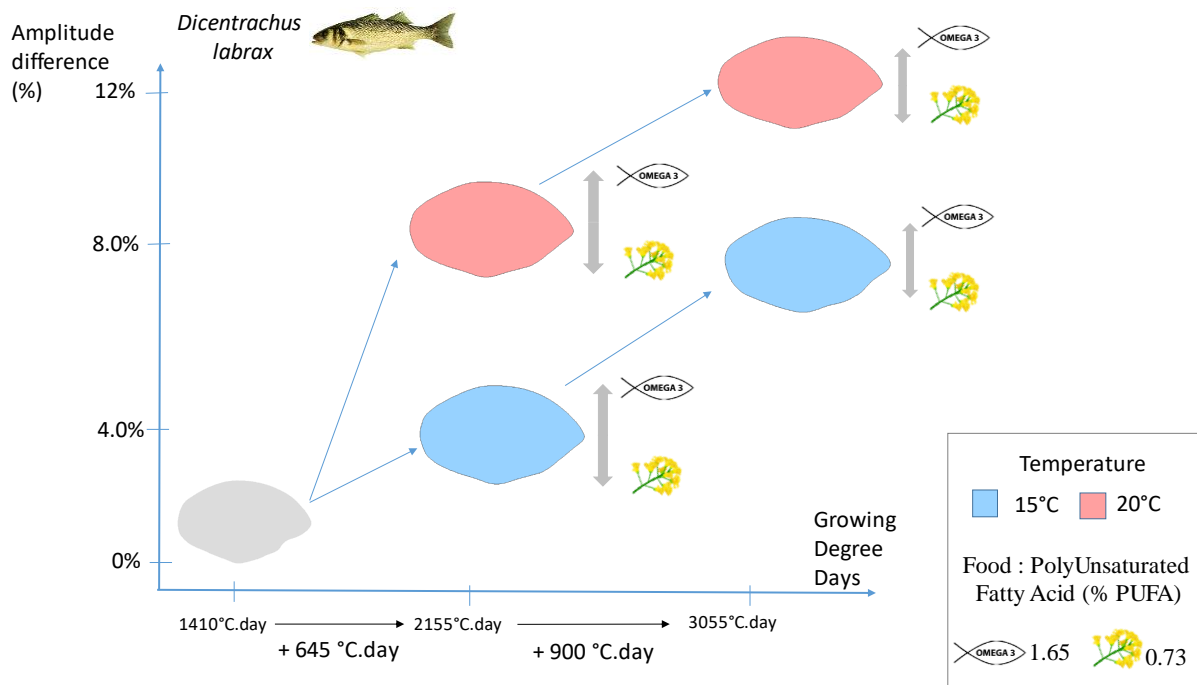


Figure 28: Accumulation des degrés-jour situés entre les seuils thermiques (minimum et maximum) de croissance. La totalité des zones colorées représente l'intégration d'énergie dédiée à la croissance en °C.

4.2 Etude 4 : Do environmental conditions (temperature and food composition) affect otolith shape during fish early-juvenile phase? An experimental approach applied to European Seabass (*Dicentrarchus labrax*)

Mahé, K., Gourtay, C., Bled Defruit, G., Chantre, C., de Pontual, H., Amara, R., Claireaux, G., Audet, C., Zambonino-Infante, J.L., Ernande B. 2019. Do environmental conditions (temperature and food composition) affect otolith shape during fish early-juvenile phase? An experimental approach applied to European Seabass (*Dicentrarchus labrax*). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. *Accepted*

4.2.1 Graphical abstract



4.2.2 Abstract

Otolith shape is an efficient tool for fish stock discrimination. Therefore, it is crucial to identify the environmental parameters that could influence otolith morphogenesis and growth. Current global ocean warming negatively affects the production of polyunsaturated fatty acids (EPA and DHA) by phytoplankton and thus their availability in marine food webs. As EPA and DHA are essential nutrients for most fish species, their deficiency could affect many aspects of fish physiology, notably otolith morphogenesis. The goal of this study was to

assess experimentally the combined influences of temperature (T) and dietary polyunsaturated fatty acid (PUFA) content on European seabass (*Dicentrarchus labrax*) otolith morphogenesis during early life stages. 300 individuals were reared from 94 to 200 days post hatch (dph) at 15 or 20°C and fed a high (1.65% PUFA) or low (0.73% PUFA) nutrient diet. To analyze the temperature effect, Growing Degree Days (GDD) were used. Otolith morphometric measurements, shape factors and normalized Elliptical Fourier coefficients describing outline shape were extracted using image analysis. The directional asymmetry (DA) between left and right otolith shapes was not significantly correlated to the GDD or food nutrient level. The effects of T and PUFA on otolith shape were estimated using four linear mixed effects models and, for all descriptors of otolith outline, the best model included GDD, PUFA and T and their interaction as predictors. This temperature effect was described by GDD value and the interaction between GDD and T. Consequently, temperature has an effect on the speed but also on the morphogenesis trajectory of the otolith. Conversely, the concentration of PUFA in the diet had no significant effect on otolith shape. The otolith shape was first modified by a decrease in the width/length ratio during the first period of experiment and by the distance between rostrum and antirostrum during the second period of experiment. Our results indicate that otolith shape is very sensitive to environmental temperature and, as such, can be an effective tool for identifying fish stocks that have experienced different temperature regimes.

4.2.3 Highlights

- No directional bilateral asymmetry found between left and right otoliths during early life stages of seabass
- Growing Degree Days is better descriptor than the number of days or/and the temperature of the experiment to follow otolith shape amplitude
- Otolith shape is more sensitive to environmental temperature than to food quality (dietary polyunsaturated fatty acid content)

4.2.4 Keywords

n-3 polyunsaturated fatty acids, otolith shape, temperature effect, elliptic fourier descriptors, multivariate mixed-effects models, directional asymmetry

4.2.5 Introduction

Climate change involves principally an increase of sea surface temperature of 0.74°C during the last century that is expected to be followed by a further increase of about 1.5 °C by the end of the century (Allen et al., 2018). Several studies have shown that elevated temperatures may significantly influence whole ecosystems and affect animals' physiology in relation to their thermal optima or tolerance (Thomas et al., 2004; Mieszkowska et al., 2006; Hofmann and Todgham, 2010; Pörtner, 2010).

Global climate change also induces ocean acidification and deoxygenation episodes (Diaz, 2001; Caldeira and Wickett, 2003; Pörtner and Knust, 2007; Feely et al., 2008; Rabalais et al., 2009). These environmental changes could reduce and modify the base of marine food webs, notably phytoplankton species assemblages, with potential negative consequences on the production of omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) (Ackman and Tocher 1968; Thompson et al., 1992; Renaud et al. 2002; Guschina and Harwood 2006; Capuzzo et al., 2017). Fatty acids are the primary constituents of polar and neutral lipids, specifically phospholipids and triacylglycerols, respectively. N-3 PUFA, particularly eicosapentaenoic acid (20:5n-3, EPA) and docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA), contained in phospholipids (Henderson and Tocher, 1987), are exclusively synthesized by phytoplankton species. There is a negative correlation between temperature and the production of n-3 PUFA by phytoplankton. n-3 PUFA have a critical role as the primary building blocks of cell membranes as components of phospholipids, according to the concept of homeoviscous adaptation (i.e. adjustment of the n-3 PUFA to ensure the viscosity and membrane exchanges necessary for the proper functioning of the organism; Ernst et al., 2016). N-3 PUFA are

essential fatty acids (EFA) that animals, including fish, must ingest as they are almost exclusively produced by phytoplankton and can rarely be synthesized *de novo* by the animals themselves (Brett and Müller-Navarra, 2003). A climate-change-induced reduction in dietary PUFA availability could thus impact fish physiology by changing cell membrane fluidity, the production of eicosanoids and main physiological processes (growth, respiration and reproductive rates) with potential consequences on fish recruitment (Brett and Müller-Navarra, 2003). For example, in European seabass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) juveniles, Skalli and Robin (2004) showed that growth was positively correlated to dietary n-3 PUFA concentration. Consequently, global climate change has, along with direct effects, indirect bottom-up effects on fish growth, notably via n-3 PUFA availability (Brett and Groves, 1979; Jobling, 1996; Brett and Müller-Navarra, 2003).

Otoliths are calcified structures located in the inner ear of teleost fish that are characterized by accretional growth and are metabolically inert (i.e. once deposited, otolith material is unlikely to be resorbed or altered) (Casselman, 1987). Otolith shape is influenced by both abiotic (e.g. temperature) and biotic (e.g. food availability) environmental parameters and depends on individuals' genotype (Vignon and Morat, 2010). Since otolith growth is related to fish growth (Mahé et al., 2017) and otolith shape co-varies with fish diet in the wild (Mille et al. 2016), global climate change may affect otolith morphogenesis and growth through its effects on both temperature and n-3 PUFA availability. As stocks are characterized by different environmental conditions and genetic makeup, associated variation in otolith growth, which generates variation in otolith shape, may allow stock discrimination along species distributional range (Cadrin et al., 2014). In fact, the otolith shape is commonly used as a tool to identify species and to discriminate between fish stocks. Since Campana and Casselman's seminal work (1993), many fishery scientists have used this approach for stock discrimination studies in order to understand fish population dynamics and achieve reliable exploited fish

stock assessments for fishery management (Reiss et al., 2009). Therefore, it is crucial to identify environmental variations that could influence otolith morphogenesis and growth. In addition, the shape of otoliths could differ systematically (as opposed to randomly) between right and left inner ears (e.g. side effect). A recent study on *Boops boops* showed that, for this species, the amplitude of directional bilateral asymmetry (DA) varied geographically, at least partly due to environmental conditions (Mahé et al., 2018).

The present study investigates under controlled conditions the crossed effects of temperature (15°C and 20°C) and dietary n-3 PUFA content (0.73% EPA+DHA versus 1.65% EPA+DHA) on otolith morphogenesis and growth in European seabass. We investigated how otolith morphological variability within individuals, i.e. directional bilateral asymmetry, and between individuals is affected by environmental drivers, more precisely water temperature and dietary n-3 PUFA content, during the early life of seabass. This species is commercially important for both fisheries and aquaculture in Europe, especially in the Mediterranean Sea. The world aquaculture production of European seabass was 191.003 tons in 2016 (FAO FishStat data). The effects of temperature or dietary n-3 PUFA concentration on seabass somatic growth have been well-studied for aquaculture purposes (Person-Le Ruyet et al., 2004a, 2004b; Skalli and Robin, 2004), but their effects on otolith morphogenesis and growth are currently unknown

4.2.6 Materials and methods

4.2.6.1 Fish and rearing conditions

Seabass adults were captured and then reared in captivity for three years, after which a batch of 4 females and 10 males was used to obtain the eggs for this study. The experiment was carried out in 2017 using 93-day-old juveniles that were offspring of adult European seabass captured in winter 2013 in the Gulf of Morbihan (France). At 2 days post hatching (dph), seabass larvae were divided among three conical tanks (230 L, 10µm filtered seawater, UV,

salinity 35‰, initial density 10 000 larvae tank⁻¹). Water temperature in the tanks was progressively increased from 14°C to 20°C from 2 to 8 dph. From the mouth opening stage to 39 dph, larvae were fed with *Artemia*. At 40 dph, larvae were co-fed with *Artemia* and a microparticulate diet (Marinstart, Le Gouessant, Lamballe, France) for four days, and then fed exclusively with the microparticulate diet until 74 dph. Thereafter, juveniles were fed with larger pellets for ornamental fish (EPA + DHA = 1.5%, Le Gouessant, Lamballe, France) until the beginning of the experiment at 93 dph.

4.2.6.2 Experimental design

A two-level full-factorial experiment with temperature and dietary PUFA content as treatment factors was conducted using 3 600 seabass from 93 to 204 dph (Fig. 29). 300 individuals were reared in each of 12 indoor 500 L tanks supplied with filtered and aerated natural seawater. Fish were reared at either 15 or 20°C. They were fed diets containing either only fish oil, a reference n-3 PUFA diet (1.65% EPA+DHA, current level observed in wild fishmeal), or mixed fish and vegetable oils (50% rapeseed oil and 50% fish oil), i.e. a low n-3 PUFA diet (0.73% EPA+DHA corresponding to European seabass nutritional requirements, Gourtay, 2018). Experimental set-up was based on a full-factorial design, with 3 replicates (tanks) for each experimental condition (i.e. temperature-food combination). Each day, feeding took place for 7 h during daytime (08:00 to 15:00) using an automatic feeder (2 cm h⁻¹). For more details on diets see Gourtay et al. (2018).

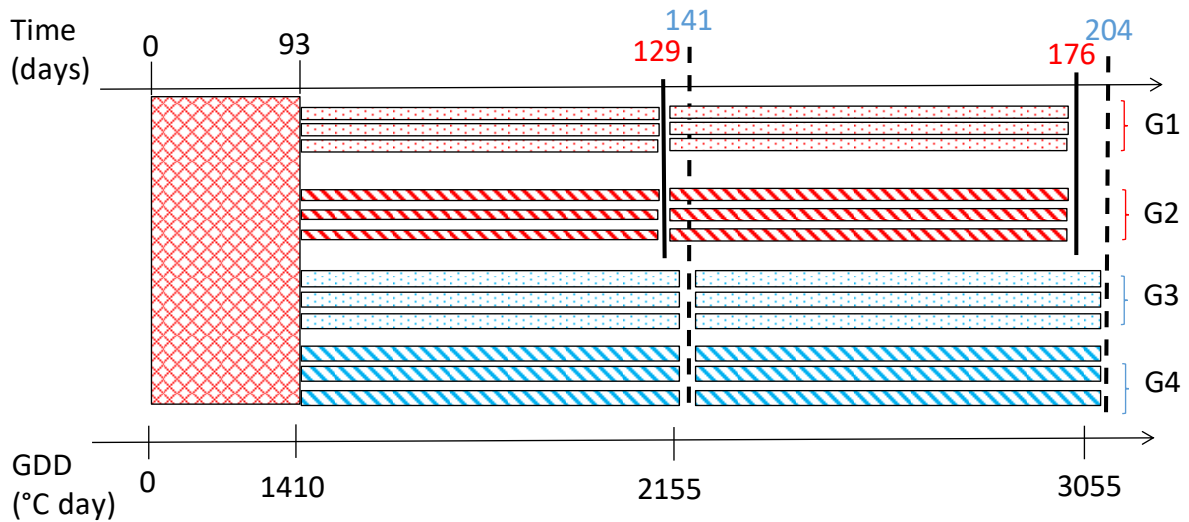


Figure 29: Main steps of the experimental design for seabass with 5 samplings at 93, 129, 141, 176 and 204 dph. Each Group (G) was composed of 3 replicates. To test the temperature effect, 15 °C (blue) and 20 °C (red) were used and for concentrations of PUFA, 1.65 (dotted) and 0.73 (striated) were used.

To follow-up the otolith growth and shape variation through time, fish were sampled 3 times over the course of the experiment. At 93 dph, 30 individuals were sampled and then at the other two samplings, 10 fish per tank (i.e. 30 fish per each experimental condition and each at each time) were also sampled. To analyze the temperature effect on growth and shape of the otolith, we used the “heat units approach” that has been developed since about 1730 (e.g., Réaumur, 1735), initially to quantify the thermal opportunity for the growth and the development of plants by aggregating temperatures relevant to these processes. Designated by a number of expressions, including “thermal time”, “heat units”, “thermal units”, or “growth units”, thermal opportunity for growth is usually measured in “growing degree days” (*GDD*; Wang, 1960; Bonhomme 2000; Trudgill et al., 2005; Neuheimer and Taggart; 2007) that are calculated as follows:

$$GDD = \sum_{i=1}^n (T_i - T_{th}) \cdot \Delta d$$

where T_i represents the average temperature at day i , T_{th} is the threshold temperature below which growth is expected to cease and Δd is time (in days). In our study, T_{th} was set at 10°C

to minimize the bias introduced by this factor (Charnov and Gillooly, 2003, Chezik et al., 2013). This threshold was chosen in accordance with Barnabé (1991) who showed that juvenile seabass growth ceased between 10 and 15°C. The GDD approach quantifies the thermal opportunity for growth by aggregating temperatures relevant to growth (Rittner, 2009). It is thus more precise than the calendar time approach when describing growth (Neuheimer and Taggart, 2007). The first sampling occurred at 93 dph (GDD=1 410 °C.day). Then, the two other samplings were carried out depending on the rearing temperature, i.e. at 129 and 176 dph for 20°C and at 141 and 204 dph for 15°C, which corresponded to GDD=2 115°C.day and GDD=3 055°C.day for the 2nd and 3rd sampling event, respectively, whatever rearing temperature (Fig. 29).

4.2.6.3 Otolith shape analysis and measures

After measuring the total length (TL± 0.1 cm) of fish, their sagittal otoliths (left and right) were extracted from the cranial cavity and cleaned. In order to minimize distortion errors in the normalization process during image analysis, each otolith was placed on a microscope slide with the sulcus facing downward and the rostrum pointing left. The outline of each otolith was digitized using an image analysis system consisting of a high-resolution camera (Hamamatsu Orca 3G) connected to an automated microscope using reflected light (Zeiss Axio Imager Z2). Each digitized image was analyzed using the image-analysis software TNPC (Digital processing for calcified structures, version 7). To compare the shapes of the left and right otoliths, mirror images of the right otoliths were used. Otolith shape was assessed by analyzing three types of descriptors: the otoliths' size parameters (Length: L_o ; Width: W_o ; Perimeter: P_o ; Area: A_o), shape indices (Table S1) and Elliptic Fourier Descriptors (EFDs; e.g. Lestrel, 2008). Size parameters are measurements directly related to the size of the otolith, unlike shape indices, which are dimensionless measurements and therefore independent of the size of the otolith. The shape indices measure otolith

morphology similarity to ideal geometric shapes calculated using size parameters (Table S1): Roundness (*Ord*) and Form-factor (*Off*) quantify similarity to a circle, Ellipticity (*Oel*) to an ellipse, and Aspect-Ratio (*Oar*) and Rectangularity (*Ore*) to a rectangle. EFDs were obtained by using TNPC 7 software to perform Fourier analysis on binarized image. For each otolith, the first 99 elliptical Fourier harmonics (H) were extracted and normalized with respect to the first harmonic so as to be invariant to otolith size, rotation and starting point of contour description (Kuhl and Giardina, 1982). To determine the number of harmonics required to reconstruct the otolith outline, the cumulated Fourier Power (F) was calculated for each otolith k as a measure of the precision of contour reconstruction obtained with n_k harmonics (i.e., the proportion of variance in contour coordinates accounted for by the n_k harmonics):

$$F_{(n_k)} = \sum_{i=1}^{n_k} \frac{A_i^2 + B_i^2 + C_i^2 + D_i^2}{2}$$

where A_i , B_i , C_i and D_i are the coefficients of the i th harmonic. n_k was chosen for each otolith k in order to ensure that it was reconstructed with a precision of $F_{(n_k)} = 99.99\%$ (Lestrel, 2008). The maximum number of harmonics $n = \max(n_k)$ across all otoliths was then used to reconstruct each individual otolith. Only the first 31 harmonics were necessary to ensure reconstruction of each otolith shape with a precision of 99.99% and were thus used for further analyses.

The resulting matrix containing EFDs (as columns) for each otolith (as rows) was subjected to Principal Components Analysis (PCA) (Rohlf and Archie, 1984) and the 7 first Principal Components (PCs) were selected as otolith shape descriptors or shape matrix (S) according to the broken stick model (Legendre and Legendre, 1998), which in this case, corresponded to a threshold of 3.4% of the total variance explained (Borcard et al., 2011). In total, these 7 PC's explained 82.1% of the total variance in the EFD's. This procedure allowed us to decrease the

number of variables used to describe otolith shape variability through EFDs while ensuring that the main sources of shape variation were kept and to avoid co-linearity between shape descriptors (Rohlf and Archie, 1984).

4.2.6.4 Statistical analyses

4.2.6.4.1 Directional bilateral asymmetry in otolith shape

To analyse the directional bilateral asymmetry (DA) between left and right otolith shape, the effect of inner ear side (*Si*) on otolith morphology *O* (described by either size parameters or shape indices or the shape matrix *S*) was tested using linear mixed-effects models (univariate models for size parameters, shape indices and multivariate models for shape matrix *S*) :

$$O \sim \alpha_0 + \Delta\alpha_{0,in} + \alpha_1 Si + \alpha_2 GDD + \alpha_3 Si.GDD + \alpha_{4,PUFA} Si.GDD \quad (1)$$

where inner ear side (*Si*), growing degree day (*GDD*) and their interaction with dietary PUFA content (*PUFA*) are fixed effects and individual (*in*) is introduced as a random effect ($\Delta\alpha_{1,in}$) on the intercept to account for the fact that left and right otoliths' shapes are more likely to be similar when originating from the same individual. The *GDD* values were centered around the value at the beginning of the experiment (1 410 °C.day) so that the intercept of the model represents otolith morphology at that point in time.

The multivariate versions of model (1) applied to shape matrix *S* were fitted while accounting for variance heterogeneity between PCs (columns of *S*). Normality of the residuals and the random effects as well as homoscedasticity of the residuals were assessed by visual inspection of diagnostic plots. The models were fitted by maximizing the restricted log-likelihood. The significance of the fixed effects was tested by likelihood ratio tests between nested models while respecting marginality of the effects (type 2 tests; Fox and Weisberg, 2011) that are supposed to follow a χ^2 distribution under the null hypothesis. Their p-values were adjusted for Multiple Comparisons through the Bonferroni correction (McDonald, 2014).

To visualise shape differences between right and left otoliths, or DA amplitude, average left and right shapes were rebuilt based on EFDs averaged for each side. DA amplitude was then computed as the percentage of non-overlapping surface between the reconstructed right and left otolith average shapes relative to the total area they covered after superposition.

4.2.6.4.2 Temperature and food composition effects on otolith morphogenesis

To test Temperature (T) and food composition ($PUFA$) effects on otolith morphogenesis, i.e. the change with time in otolith shape O , four mixed-effects models (univariate or multivariate depending on shape descriptors) were fitted:

$$O \sim \alpha_0 + (\alpha_1 + \Delta\alpha_{1,i})D + \alpha_2 D.T + \alpha_{3,PUFA}D + \alpha_{4,PUFA}D.T \quad (2)$$

$$O \sim \alpha_0 + (\alpha_1 + \Delta\alpha_{1,i})GDD + \alpha_{2,PUFA}GDD \quad (3)$$

$$O \sim \alpha_0 + (\alpha_1 + \Delta\alpha_{1,i})D + \alpha_2 D.GDD + \alpha_{3,PUFA}D + \alpha_{4,PUFA}D.GDD \quad (4)$$

$$O \sim \alpha_0 + (\alpha_1 + \Delta\alpha_{1,i})GDD + \alpha_{2,PUFA}GDD + \alpha_3 GDD.T + \alpha_{4,PUFA}GDD.T \quad (5)$$

Where sampling day (D), dietary PUFA content ($PUFA$, 0.73% / 1.65%), temperature (T , 15°C / where sampling day (D), dietary PUFA content ($PUFA$, 0.73% / 1.65%), temperature (T , 15°C / 20°C), growing degree day (GDD), and their interaction are fixed effects. PUFA was a categorical variable in the 4 used models. In contrast, different options were applied to account for the effect of temperature on otolith morphogenesis: either by considering explicitly time D and temperature T (model 2) or by including a combined measure of thermal time GDD (model 3) or by examining a combination of GDD and D (model 4) or GDD and T (model 5) in case thermal time did not fully account for either real time effect or real temperature effect. Random effects ($\Delta\alpha_{1,i}$) on D or GDD effect were used to account for variability in otolith morphogenesis due to rearing tanks (i). These random effects affected only the model slopes and not the intercepts because fish lived in the same tank until 93 dph, i.e. the beginning of the full-factorial experiment at which $D = GDD = 0$.

We used the smallest Akaike's Information Criterion (AIC) to choose the most appropriate model between the 4 options. Model fitting, diagnostics and significance tests of fixed effects in the selected model were performed as described for DA analysis.

In a second step, individuals' total length TL was also included as a covariate in the selected model that was re-fitted to estimate some potential confounding ontogenetic effects on otolith shape, i.e. the fact that temperature or food composition could affect otolith shape indirectly through their direct effect on fish body growth and the subsequent effect of fish body size on otolith shape. Also, the potential sensibility of the results of these models to the threshold temperature (T_{th}) used to compute GDDs was tested by varying the value of this parameter from 0°C to 15°C by 1 degree increments and refitting the different models according to the procedure described above.

Only the fixed part of the selected models is presented in the result section. Random effects, which were included to account for variation due to tanks and thus to obtain robust estimates, are presented in the Supplementary Material (Table S2). As for the DA analysis, to visualise and to evaluate the amplitude of differences in otolith shape between pairs of groups characterized by different rearing conditions, an average otolith shape by group was rebuilt based on EFDs and the percentage of non-overlapping surface between reconstructed average shapes of the two groups was calculated. Finally, the significance of shape difference between all group pairs was tested using a mixed-effects model while correcting for multiple comparisons using a Bonferroni procedure.

Statistical analyses were performed using the following packages in the statistical environment R: 'nlme' (Pinheiro et al., 2016), 'lme4' (Bates et al., 2011), 'Vegan' (Oksanen et al., 2013), 'car' (Fox et al., 2011) and 'MASS' (Venables and Ripley, 2002).

4.2.7 Results

4.2.7.1 Directional bilateral asymmetry (DA) in otolith shape

For all descriptors of otolith shape, the side value (i.e. the difference between the values measured on the right otolith and on the left otolith), was always negative reflecting measurements of the right otolith always lower than that of the left otolith (Table 15). According to the aspect of otolith morphology considered, the mixed-effects models did not show the same trend (Table 15). Regarding otolith size, represented by the four size parameters (*Lo*, *Wo*, *Po* and *Ao*), DA was significant since the beginning of the experiment (column *Si*, Table 15) but varied also according to experienced thermal opportunity (column *Si.GDD*, Table 15) and this differently depending on dietary PUFA content (column *Si.GDD.PUFA*, Table 15).

Table 15 : Statistical testing of directional bilateral asymmetry in otolith size and shape. p-values obtained in the mixed-effects models (1) for the effects of inner head side effect (*Si*) and their interactions with growing degree days (*GDD*) and food composition (*PUFA*) (Bonferroni corrected P-values for Multiple Comparisons: p-values < 0.0045: grey cases).

Type of data	Response variable	Si value	Si	GDD	Si.GDD	Si.GDD.PUFA
Size parameters	Length : <i>Lo</i>	-0.691	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	Perimeter : <i>Po</i>	-0.359	< 0.001	< 0.001	0.001	< 0.001
	Area: <i>Ao</i>	-0.700	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	Width : <i>Wo</i>	-0.698	< 0.001	< 0.001	0.008	< 0.001
Shape indices	Rectangularity : <i>Ore</i>	-0.513	0.104	< 0.001	0.464	0.274
	Ellipticity : <i>Oel</i>	-0.475	< 0.001	< 0.001	0.934	0.600
	Roundness : <i>Ord</i>	-0.410	< 0.001	< 0.001	0.963	0.121
	Aspect ratio : <i>Oar</i>	-0.450	< 0.001	< 0.001	0.784	0.382
	Form-factor : <i>Off</i>	-0.316	0.959	< 0.001	0.797	0.444
EFDs	matrix S		0.046	0.040	0.999	0.344

Regarding otolith shape independent of size, represented by the other descriptors (Shape indices and EFDs), some DA was again detected since the beginning of the experiment (column *Si*, Table 15), except for rectangularity and the form-factor (lines *Ore* and *Off*, respectively, Table 15). However, in contrast with otolith size, DA in otolith shape did not vary with thermal opportunity (column *Si.GDD*, Table 15) nor with dietary PUFA content

(column *Si.GDD.PUFA*, Table 15) The DA amplitude was on average equal to 1.17% throughout the experiment (Fig. 30). At 1410°C.day, the DA amplitude was 0.94% and increased with thermal opportunity but the values were higher at 15°C (2115°C.day: 1.31%; 3055°C.day: 1.36%) than at 20°C (2115°C.day: 1.04%; 3055°C.day: 1.08%). Given that DA in otolith shape was constant whatever thermal opportunity (GDD) and dietary PUFA content, only right otoliths were used in the following analyses.

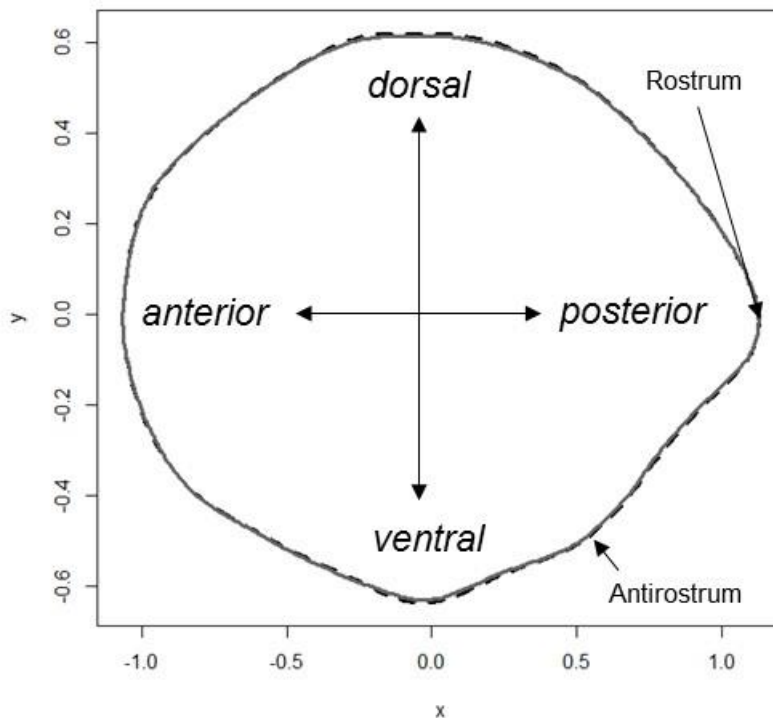


Figure 30: Difference between left (black dotted line) and right (grey line) average otolith shape.

4.2.7.2 Temperature and food composition effects on otolith morphogenesis

Among the four tested mixed-effects models, model (5) was always the best one according to the AIC whatever the response variable (Table 16). This model included *GDD*, *PUFA*, *T* and their interactions as fixed effects and applied similarly to fish somatic growth (i.e. fish total length as response variable), otolith growth (i.e. size parameters as response variables) and otolith morphogenesis (shape indices and matrix *S* as response variable).

Table 16: Akaike's Information Criterion values for the 4 alternative mixed-effects models (columns) fitted to the different response variables (lines) describing fish total length (TL) and otolith morphology (size parameters, shape indices and matrix S).

Response variable		model 2 : <i>D+D:T+D:PUFA</i> + <i>D:T:PUFA+i</i>	model 4 : <i>D+D:GDD+D:PUF</i> <i>A+</i> <i>D:GDD:PUFA+i</i>	model 5 : <i>GDD+GDD:PUFA+</i> <i>GDD:T+GDD:PUFA:T</i> <i>+i</i>	model 3 : <i>GDD+GDD:PUFA</i> <i>+i</i>
Fish growth	<i>TL</i>	3021.7	3221.4	2927.7 **	3260.4
Size parameters	<i>Lo</i>	-738.2	-622.2	-766.5 **	-598.1
	<i>Po</i>	342.1	442.3	302.9 **	463.7
	<i>Ao</i>	6775.8	6924.5	6746.6 **	6952.2
	<i>Wo</i>	-1260.0	-1128.9	-1286.7 **	-1096.6
Shape indices	<i>Ore</i>	3021.7	3231.8	2927.6 **	3260.4
	<i>Oel</i>	-2352.8	-2348.5	-2330.5 **	-2349.8
	<i>Ord</i>	5121.4	5107.6	5103.7 **	5104.6
	<i>Oar</i>	-880.5	-902.6	-906.8 **	-904.0
	<i>Off</i>	4643.7	4606.8	4601.9 **	4635.2
EFDs	<i>matrix S</i>	-22116.04	-21890.45	-25977.1 **	-25668.8

This suggests that thermal opportunity (*GDD*) was a better descriptor than the separate effects of time (*D*) and temperature (*T*) as represented in model 2. Thermal opportunity alone (model 3) was enough to account for time effect but it was not to account for the full temperature effect, so that interactions with time (*D*) were not necessary (model 4) but those with temperature (*T*) were (model 5).

Despite better support for model 5 by AIC whatever the response variable, significance of the different fixed effects varied across explained variables (Table 17). Fish growth (*TL* as response variable) depended significantly on *GDD* but also on its interaction with *T*. Otolith growth (size parameters as response variables, Table 17) depended significantly only on *GDD* (response variables: *Lo*, *Po*, *Wo*) except for growth in otolith area (*Ao*) for which the interaction with *T* was also significant. For otolith morphogenesis (shape indices and matrix *S* as response variables, Table 17), results were more balanced with some indices (*Oel*, *Ord* and

Oar) indicating a significant effect of *GDD* only and others (*Ore*, *Off* and matrix *S*) also of the interaction with *T*. It looked like the more complex was the index used to describe otolith shape, the more likely to observe a significant interaction between *GDD* and *T*. In contrast, the concentration of PUFA in diet had no significant effect on fish and otolith growth nor on otolith morphogenesis (Table 17).

Table 17: Results of mixed-effects models testing for the effects of food composition (PUFA, 0.73%/1.65%), experimental temperature (T, 15°C/20°C), growing degree day (GDD), and their interaction for each response variable (Adjusted P-values for Multiple Comparisons: p-values < 0.0045: **).

Type of data	Response variable	Explanatory variable	χ^2	df	p-value
Fish growth	TL	GDD	3404.4205	1	< 0.001 **
		GDD:PUFA	1.9803	1	0.159
		GDD:T	42.6184	1	< 0.001 **
		GDD:PUFA:T	1.0344	1	0.309
Size parameters	Lo	GDD	650.4437	1	< 0.001 **
		GDD:PUFA	0.0080	1	0.928
		GDD:T	0.0986	1	0.753
		GDD:PUFA:T	0.0022	1	0.963
	Po	GDD	727.4510	1	< 0.001 **
		GDD:PUFA	0.0233	1	0.879
		GDD:T	0.0579	1	0.810
		GDD:PUFA:T	0.0210	1	0.885
	Ao	GDD	4291.9324	1	< 0.001 **
		GDD:PUFA	2.9141	1	0.088
		GDD:T	28.3203	1	< 0.001 **
		GDD:PUFA:T	1.1427	1	0.285
	Wo	GDD	322.1920	1	< 0.001 **
		GDD:PUFA	0.0076	1	0.930
		GDD:T	0.0217	1	0.883
		GDD:PUFA:T	0.0705	1	0.791
Shape indices	Ore	GDD	95.8393	1	< 0.001 **
		GDD:PUFA	0.0974	1	0.7550
		GDD:T	9.3282	1	0.002 **
		GDD:PUFA:T	0.2599	1	0.610
	Oel	GDD	527.4	1	< 0.001 **
		GDD:PUFA	2.301	1	0.129
		GDD:T	3.6395	1	0.056
		GDD:PUFA:T	0.0583	1	0.809
	Ord	GDD	581.3443	1	< 0.001 **

		GDD:PUFA	2.4954	1	0.114	
		GDD:T	2.4173	1	0.120	
		GDD:PUFA:T	0.0263	1	0.871	
	Oar	GDD	549.2033	1	< 0.001 **	
		GDD:PUFA	2.1935	1	0.139	
		GDD:T	2.6449	1	0.104	
	Off	GDD:PUFA:T	0.0314	1	0.859	
		GDD	196.6761	1	< 0.001 **	
		GDD:PUFA	2.6622	1	0.103	
	EFDs	matrix S	GDD:T	74.3587	1	< 0.001 **
			GDD:PUFA:T	0.3677	1	0.544
			GDD:PUFA	4.1173	7	0.766
EFDs	matrix S	GDD:T	71.5240	7	< 0.001 **	
		GDD:PUFA:T	7.3534	7	0.393	
		GDD:PUFA	4.1173	7	0.766	

To test the effect of fish body size on the otolith shape, individual total length TL was included as a covariate in model 5. There was no significant ontogenetic effect on the otolith shape. Moreover, the effect of the temperature threshold (Tth) was also tested in model 5. While modifying the value of Tth from 0°C to 15°C by 1-degree increment, no changes occurred in the significance of explanatory variables (Table S3).

The evolution of normalized otolith shape during the experiment showed that there were two main changes which were related to the dorso-ventral axis and the area between the rostrum and anti-rostrum (Fig. 31).

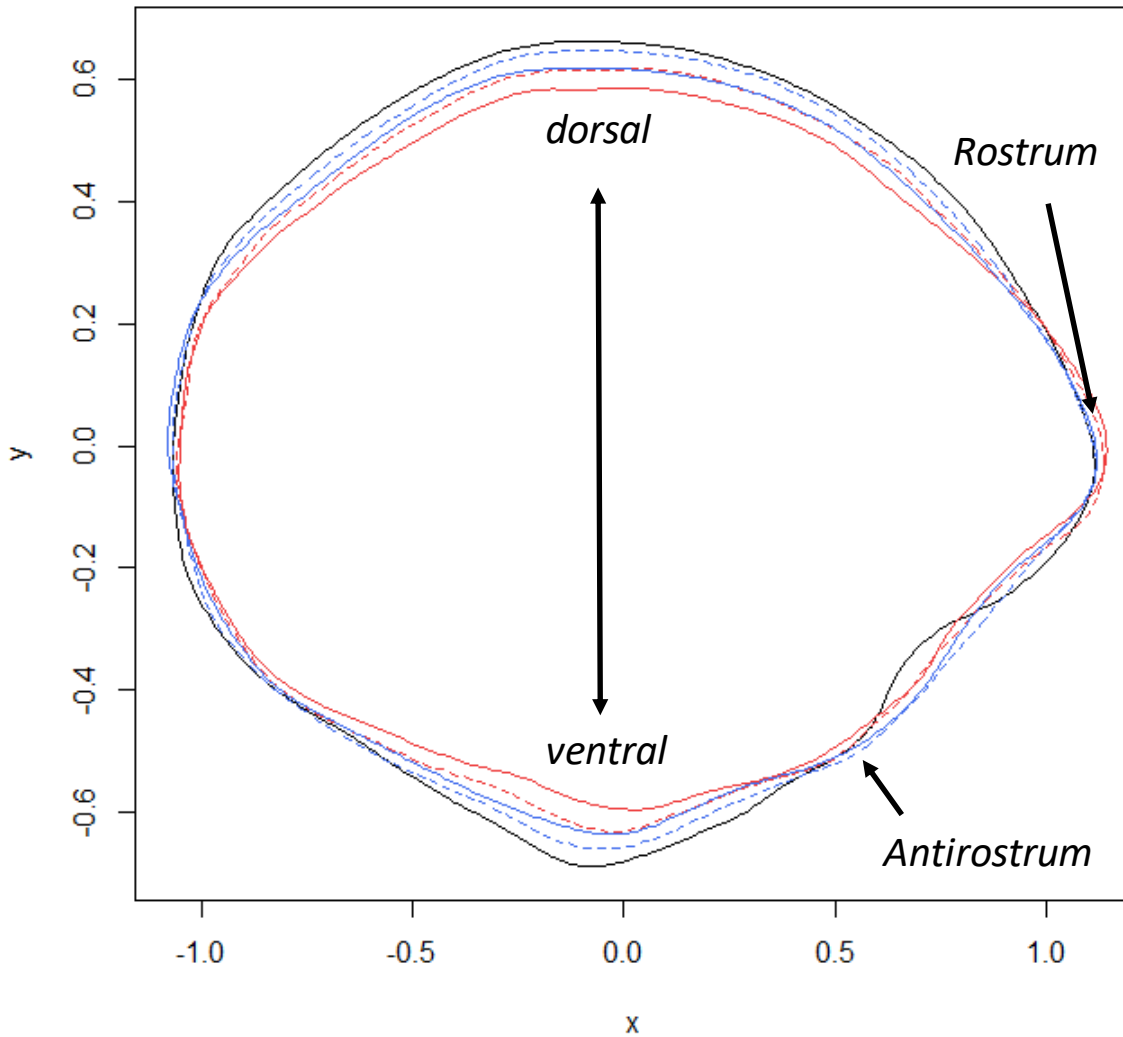


Figure 31: Evolution of otolith normalized shape during the experiment: D-93 (1410°C day; black line), D-129 (2155°C day; 20°C; red dashed line), D-146 (2155°C day; 15°C; blue dashed line), D-176 (3055°C day; 20°C; red line) and D-204 (3055°C day; 15°C; blue line).

The otolith shape was modified by a decrease of width/length ratio and of the distance between the rostrum and the anti-rostrum as GDD and T increased. When comparing average shapes observed for each condition and each sampling time to the first one at 93 dph (Fig. 31), we observed that differences between temperatures at similar GDD were only concerning the amplitude of the modification relative to the initial otolith shape (in other terms, the speed of otolith morphogenesis) and not the direction of the modification (in other terms the trajectory of otolith morphogenesis). At 20°C, otolith shape changed faster than at 15°C. This was evidenced by the percentage of non-overlapping surface between average otolith shape at

93 dph and that at various points in “thermal time” later which was always significantly higher at 20°C than at 15°C at the same “thermal time” (*GDD*; Table 18). In contrast, the percentage of non-overlapping surface between average otolith shapes for different dietary PUFA concentrations at the same *GDD* and *T* values was always lower than 2 % and was never significant (Table 18).

Table 18: Average percentage of non-overlapping surface between reconstructed average otolith shapes for pairs of rearing conditions (: p-value<0.05).**

		1410 °C.day	2155 °C.day				3055 °C.day			
		D93	D129 1.85% 20°C	D129 0.85% 20°C	D141 1.85% 15°C	D141 0.85% 15°C	D176 1.85% 20°C	D176 0.85% 20°C	D204 1.85% 15°C	D204 0.85% 15°C
1410 °C.day	D93									
2155 °C.day	D129_1.85% _20°C	7.82**								
	D129_0.85% _20°C	8.36**	1.85							
	D141_1.85% _15°C	4.35**	5.14**	5.93**						
	D141_0.85% _15°C	3.00**	6.61**	7.34**	1.89					
3055 °C.day	D176_1.85% _20°C	12.04**	5.47**	4.55**	9.96**	9.85**				
	D176_0.85% _20°C	11.10**	4.51**	3.67**	8.90**	8.75**	1.64			
	D204_1.85% _15°C	7.59**	2.74**	2.56**	4.52**	4.64**	6.10**	4.25**		
	D204_0.85% _15°C	6.91**	3.19**	3.32**	3.76**	3.85**	6.85**	5.11**	1.64	

4.2.8 Discussion

4.2.8.1 Directional bilateral asymmetry in seabass otolith

In the present experiment, we found evidence of DA in otolith size reflecting measurements of size parameters (length, width, area and perimeter) from the right otolith that are always lower than that of the left otolith. The size of otoliths differed systematically (as opposed to randomly) between right and left inner ears (e.g. side effect). The amplitude of DA varied with GDD and n-3 PUFA concentration in diet. This indicates that the amplitude of the size difference between left and right otoliths depends on thermal regime and diet quality during the early-juvenile phase. Such directional bilateral asymmetry (DA) in shape (as opposed to fluctuating asymmetry) is more important for flatfish than for roundfish because metamorphosis causes unique asymmetric body shape and a lateralized behavior adapted to a bottom-living lifestyle (Okada et al., 2001, Mille et al., 2015). However, significant DA has been observed for roundfish species such as *Liza ramada* (Rebaya et al., 2017), *Diplodus annularis* (Trojette et al., 2015), *Diplodus puntazzo* (Bostanci et al., 2016), *Clupea harengus* (Bird et al., 1986), *Scomberomorus niphonius* (Zhang et al., 2016) and *Merlangius merlangus* (Mille et al., 2015). A recent study on *Boops boops* showed that, for this species, the amplitude of DA varied geographically, at least partly due to environmental conditions (Mahé et al., 2018). The variability of otolith DA in *Boops boops* at least could be related to population geographical structuration and thus could be a phenotypically plastic response to environmental drivers, such as temperature, current patterns and food availability, and/or result from genetic differentiation between geographical locations. Moreover, the ontogenetic trajectory of otolith shape is affected by environmental conditions during early life stages (Vignon, 2018), thus DA and its amplitude could vary accordingly. Although we found a significant DA of the otolith size, in size-normalized otolith shape, the DA of the otolith shape was not significant, and it was not affected by the environmental temperature nor food quality, suggesting that these two factors do not affect DA in otolith shape in juvenile seabass.

This study suggests that for seabass, considering a similar trajectory of otolith morphogenesis between left and right sides, otolith growth rate is different which could reveal a functional adaptation with lateralization of hearing functions.

4.2.8.2 Effect of dietary n-3 PUFA concentration on otolith morphogenesis

Water temperature influences essential n-3 PUFA content in zooplankton and consequently its availability to species at higher trophic levels such as fish (Gladyshev et al., 2011), which may impair their growth. Skalli and Robin (2004) showed that, indeed, below a minimal threshold (0.70%), dietary concentration of n-3 PUFA was positively correlated to mass growth in European sea bass juveniles. In this study, our results showed that the effect of dietary n-3 PUFA content on otolith morphogenesis was not linked to environmental conditions, especially temperature. Using juvenile sea bass from the same experiment as the present paper, Gourtay et al. (2018) found lower body growth and a significant decrease in n-3 PUFA content in muscle tissues when fish oil was partly replaced by vegetable oil. The dietary n-3 PUFA content also affected organ mass allometry with total mass for the heart and the gastrointestinal system being smaller when temperature was high (20°C), whereas those of liver and mesenteric fat were affected at lower temperatures (15°C) (Gourtay et al., 2018). This suggests that environmental conditions, especially temperature, could also modify the n-3 PUFA metabolism pathways in fish and thus, modulate several physiological functions, as found in other species (Farkas et al., 1980; Olsen and Skjervold, 1995). Besides somatic growth, Benitez-Santana et al. (2007) showed that the dietary n-3 PUFA could influence swimming activities in gilthead seabream (*Sparus aurata*), which may be related to effects on the sensory system. Dietary n-3 PUFA are clearly necessary for brain and retina development during the first life stages of egg, larvae and juveniles (Bell and Dick, 1991; Furuita et al., 1998). For example, it has been shown that an elevation of dietary DHA and EPA content increases eye diameter of gilthead seabream larvae (Izquierdo et al., 2000). Similarly, dietary

n-3 PUFA could have a potential effect on the fish audio-vestibular system development and especially on otolith biomineralisation, which relies on a minor organic fraction representing 0.2 to 10% of their total material (Degens et al., 1969). One hypothesis was that diet composition may affect the synthesis of endolymph organic constituents by the saccular epithelium, notably saccular endolymph proteins that are precursors of the otolith organic matrix, and this probably conditions the biomineralisation process and the morphogenesis of otoliths during the first life stages of fish. More specifically, n-3 PUFA, through their effect on membrane viscosity, could affect the transport of the organic precursors in the endolymph by the saccular epithelium and thus affect otolith biomineralisation. However, no evidence for an effect of dietary n-3 PUFA content on the morphogenesis of otoliths in sea bass juveniles was observed in the present study. Therefore, these results do not exclude a potential effect of the dietary n-3 PUFA content on otolith morphogenesis below the minimal threshold.

4.2.8.3 Growing Degree Day is good proxy to represent temperature effect on otolith morphogenesis

The thermal opportunity concept, often measured by growing degree days (GDD), has been widely used for linking temperature and climate effects on the growth of plants and field crops (Bonhomme, 2000; Trudgill et al., 2005). In fisheries sciences, this approach is still underused to analyse fish development and growth. An extensive review of the literature (Web of Science) showed that since 2000, 5 to 8 papers per year have used this concept, which represents only 3 to 5% of temperature-related growth studies in fish. More specifically, we did not find any studies on otolith morphogenesis that used GDD to follow the ontogeny of otolith shape. We found that the best model to describe otolith morphogenesis (whatever the descriptor of otolith size and shape), always included GDD and not calendar time (D). This suggests that thermal opportunity or thermal time is more relevant to otolith growth and morphogenesis than calendar time.

Fish growth and temperature are always linked (Weatherley and Gill, 1987) because, over a mid-range of temperatures, somatic growth depends on metabolic enzyme activity, which is necessarily temperature dependent (Jobling, 1994). The GDD approach accounts for this relationship but assumes that growth is only a function of temperature and that this function is linear (Legg, 1998). However, there are other biotic or abiotic factors (e.g. population density, genetic make-up, food availability or composition, oxygen availability which may modulate the effect of temperature on fish growth. Under the assumption that temperature is the main contributor to growth, GDD can be a good descriptor of temperature-dependent processes that have been proven to be more relevant than calendar time and temperature value for growth in some fish species (Uphoff et al., 2013). Notably, Neuheimer and Taggart (2007) showed that variation in length-at-age among 17 stocks of North Atlantic cod (*Gadus morhua*) was significantly correlated with GDD and not with calendar time. Our study shows similar trend with seabass growth and otolith morphogenesis. However, the use of GDD required testing potential effects of T values. Moreover, the effect of total length was tested in the models. Similarly to Chezik et al. (2013), our study showed that the value of T (from 0°C to 15°C in 1 degree increments) did not significantly contribute to the model for fish length or otolith shape. The value of T can bias the analysis only among populations, not within one population (Chezik et al., 2013). In the same way, the models including GDD did not show any interaction or influence with the fish total length covariate. Consequently, there was no direct size-dependent effect on the otolith shape. Thus using GDD seems to be very appropriate to test the effect of temperature on otolith morphogenesis.

4.2.8.4 Effect of water temperature on the somatic growth and otolith shape

The temperature effect, in this study, was explained by only GDD for several shape descriptors (e.g. Lo, Po, Wo, Oel, Ord and Oar), and by GDD together with the GDD-T relationship for other shape descriptors (e.g. Ao, Oci, Ore, Off and PCs). This difference between the shape descriptors is explained by the level of details of the contour that is

integrated in the descriptor. Many of the commonly used descriptors (e.g. size parameters, shape indices and EFDs) for otolith shape are correlated (Table S4). Hence, the number of used descriptors could be decreased. In seabass, the otolith morphogenesis takes place in two stages, firstly, a decrease of the width/length ratio and secondly, a modification on the surface area between the rostrum and the anti-rostrum. In cod (*Gadus morhua*), the otolith shape increases in crenulations and the number of lobes (Hüssy, 2008). Several shape descriptors (length, perimeter, width, ellipticity, roundness and aspect ratio) are not able to describe this type of development. Conversely, the weight or the volume of the otolith could be good proxies to characterize otolith shape in three dimensions. Moreover, the reconstruction of individual evolution of otolith shape could be used to better understand the biomineralisation process and consequently the resulting otolith shape (Fablet et al., 2009).

Temperature affects fish growth through direct effects (e.g. metabolism) and indirect effects (e.g. relationship with biotic factors such as availability of food) (Uphoff et al., 2013). In a controlled experimental environment, we minimized indirect food effects. In the same way, we tried to reduce the genetic background effect by using 4 females and 10 males to produce the individuals used for this study. However, we cannot exclude individual genetic effects that may have influenced the effect of temperature, since genetics directly affect the growth of poikilotherms by influencing enzymatic activity and the stability of proteins configuration and, therefore, the metabolic rates (Higley et al., 1986; Clarke and Johnston, 1999; Pauly, 2010). Fish exhibit higher growth rates when their metabolic activity rises with increasing temperature (in mid-range temperatures, Clarke and Johnston, 1999). Our results on seabass corroborated this observation and also showed the same trend for otolith growth. A previous experimental study with zooplanktivorous age-0 walleye (*Sander vitreus*) had shown that food consumption rates could also increase with increasing temperatures (Johnston and Mathias, 1994). Another recent study using carbon isotopic ratios with juvenile Australasian

snapper (*Chrysophrys auratus*) reared in the laboratory showed that the $\delta^{13}\text{C}$ in otoliths was not linked to the dietary regime but rather temperature because of an overall increase of metabolic rates in all fish tissues (Martino et al., 2019). Our study, which indicated that the effect of temperature on otolith shape was the sum of GDD value and the interaction between GDD and mean temperature, shows that the effect of temperature is to accelerate otolith morphogenesis and to modify the evolution trajectory because at fixed GDD values, for any two given temperatures, the otolith shapes are different.

4.2.9 Conclusion

Our results indicate that otolith shape is more sensitive to the environmental temperature than to food quality (i.e. EPA and DHA contents) and, as such, can be an effective tool for identifying fish stocks living in different thermal environments. Growing Degree Day (GDD) is a very efficient tool to analyze the temperature effect on otolith growth. However, otolith shape is also influenced by the relationship between GDD and water temperature. In fact, otolith shape is significantly influenced by the cumulative sum of GDD, but the evolution trajectory of the otolith morphogenesis is positively correlated with the temperature of the environment.

4.2.10 Données supplémentaires

Table S1: Size dimension parameters and shape indices of otolith used to describe seabass otolith outline.

Size parameters	Shape indices	
Length : L_o	Rectangularity :	$O_{re} = \frac{A_o}{L_o \cdot W_o}$
Perimeter : P_o	Ellipticity :	$O_{el} = \frac{L_o - W_o}{L_o + W_o}$
Area: A_o	Roundness :	$O_{rd} = \frac{4 A_o}{\pi L_o^2}$
Width : W_o	Aspect ratio :	$O_{ar} = \frac{L_o}{W_o}$
	Form-factor :	$O_{ff} = \frac{4 \pi A_o}{P_o^2}$

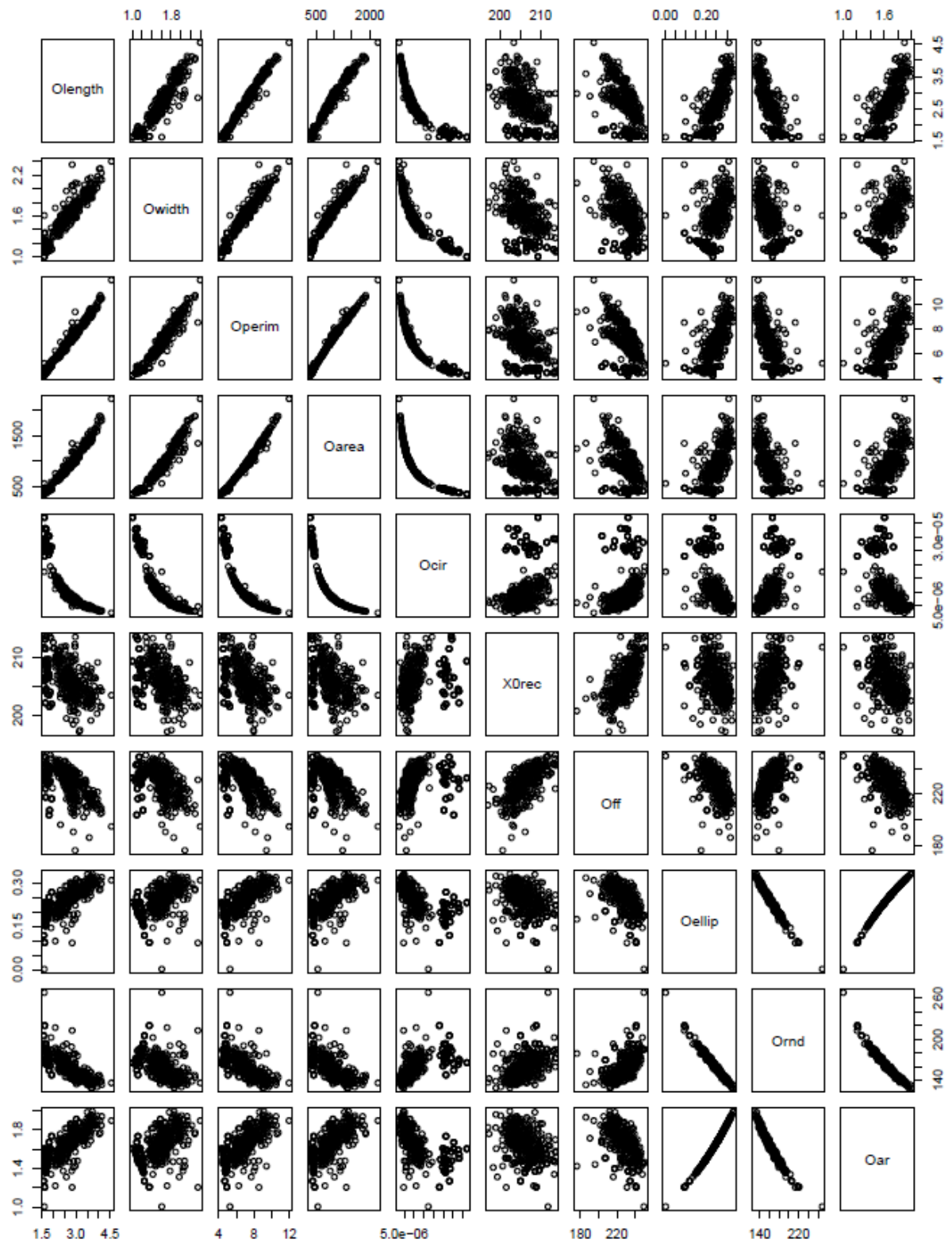
Table S2: Results of mixed-effects models testing for the effects of food composition (PUFA, 0.73%/1.65%), experimental temperature (T , 15°C/20°C), growing degree day (GDD), and their interaction for each significant principal components from EFDs (p-value<0.05: grey case).

Response variable	Estimate	s.e.	df	t-value	p-value
PC1	-0.10241706	0.003563537	4336	-28.740	< 0.001
PC2	-0.03756235	0.005701480	4336	-6.588	< 0.001
PC3	-0.01056886	0.003325900	4336	-3.178	0.001
PC4	-0.00870133	0.001909022	4336	-4.558	< 0.001
PC5	-0.02114013	0.001663642	4336	-12.701	< 0.001
PC6	0.00226606	0.001616343	4336	1.402	0.161
PC7	0.01865885	0.001538232	4336	12.130	< 0.001
PC1 : GDD	-0.00003485	0.000012564	4336	-2.773	0.005
PC2 : GDD	0.00004621	0.000021338	4336	2.166	0.030
PC3 : GDD	0.00001340	0.000009185	4336	1.459	0.144
PC4 : GDD	0.00000278	0.000007032	4336	0.395	0.692
PC5 : GDD	0.00002388	0.000005844	4336	4.087	< 0.001
PC6 : GDD	-0.00001656	0.000006049	4336	-2.736	0.006
PC7 : GDD	-0.00002354	0.000005756	4336	-4.090	< 0.001
PC1 : GDD : PUFA	-0.00000919	0.000014386	4336	-0.638	0.523
PC2 : GDD : PUFA	0.00000531	0.000020890	4336	0.254	0.799
PC3 : GDD : PUFA	-0.00000539	0.000011177	4336	-0.482	0.629
PC4 : GDD : PUFA	0.00000109	0.000007657	4336	0.142	0.886
PC5 : GDD : PUFA	-0.00000506	0.000006707	4336	-0.754	0.450
PC6 : GDD : PUFA	0.00000724	0.000005922	4336	1.222	0.221
PC7 : GDD : PUFA	0.00000884	0.000005800	4336	1.523	0.127
PC1 : GDD : T	0.00000128	0.000000585	4336	2.191	0.028
PC2 : GDD : T	-0.00000103	0.000000835	4336	-1.236	0.216
PC3 : GDD : T	-0.00000028	0.000000461	4336	-0.610	0.541
PC4 : GDD : T	-0.00000009	0.000000309	4336	-0.295	0.767
PC5 : GDD : T	-0.00000047	0.000000273	4336	-1.719	0.085
PC6 : GDD : T	0.00000075	0.000000237	4336	3.151	0.001
PC7 : GDD : T	0.00000062	0.000000232	4336	2.662	0.007
PC1 : GDD : PUFA : T	0.00000054	0.000000806	4336	0.668	0.504
PC2 : GDD : PUFA : T	-0.00000029	0.000001168	4336	-0.248	0.803
PC3 : GDD : PUFA : T	0.00000027	0.000000634	4336	0.431	0.666
PC4 : GDD : PUFA : T	-0.00000003	0.000000427	4336	-0.074	0.941
PC5 : GDD : PUFA : T	0.00000029	0.000000376	4336	0.760	0.447
PC6 : GDD : PUFA : T	-0.00000045	0.000000331	4336	-1.364	0.172
PC7 : GDD : PUFA : T	-0.00000049	0.000000324	4336	-1.519	0.128

Table S3: Results of mixed-effects models testing for the effects of *food composition* (PUFA, 0.73%/1.65%), experimental temperature (T, 15°C/20°C), growing degree day (GDD), and their interaction for PCs according to value of *T_{th}* (°C) (Adjusted p-values for Multiple Comparisons: p-values < 0.0045: **).

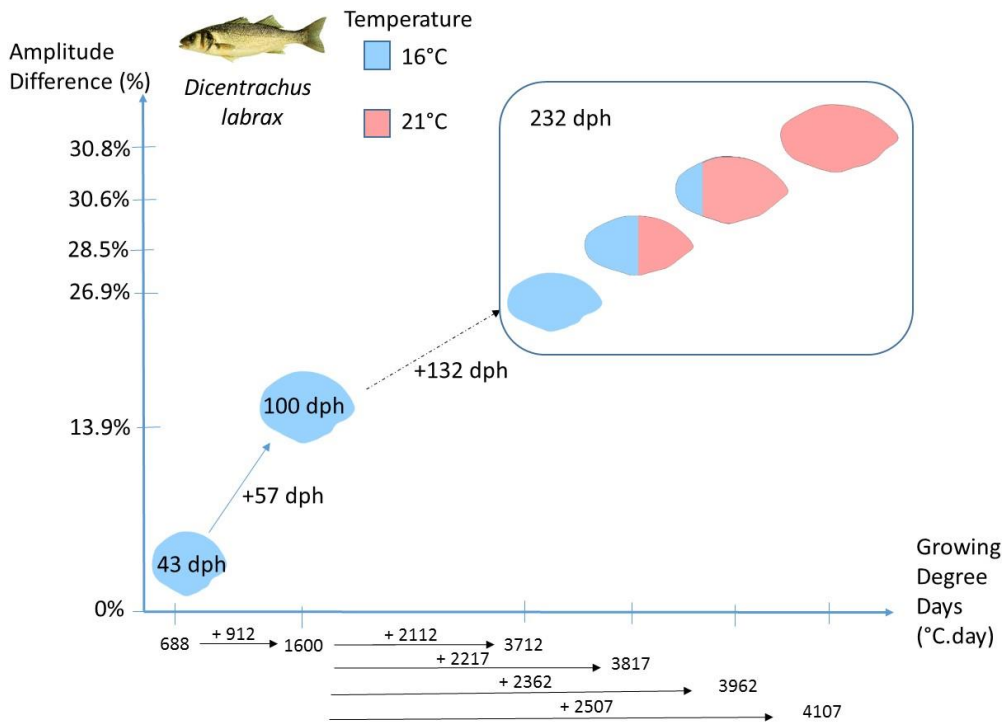
Response variable	value of <i>T_{th}</i> (°C)	Explanatory variable	χ^2	df	p-value
PCs	0°C	PC	2254.6478	7	< 0.001 **
		PC:GDD	1212.9162	7	< 0.001 **
		PC:GDD:PUFA	4.1173	7	0.766
		PC:GDD:T	71.5240	7	< 0.001 **
		PC:GDD:PUFA:T	7.3534	7	0.393
PCs	5°C	PC	2984.4577	7	< 0.001 **
		PC:GDD	433.3596	7	< 0.001 **
		PC:GDD:PUFA	1.8822	7	0.966
		PC:GDD:T	28.0111	7	< 0.001 **
		PC:GDD:PUFA:T	8.0444	7	0.328
PCs	10°C	PC	3027.7117	7	< 0.001 **
		PC:GDD	394.7369	7	< 0.001 **
		PC:GDD:PUFA	1.6708	7	0.976
		PC:GDD:T	28.2843	7	< 0.001 **
		PC:GDD:PUFA:T	7.2122	7	0.407
PCs	15°C	PC	3291.9376	7	< 0.001 **
		PC:GDD	104.3952	7	< 0.001 **
		PC:GDD:PUFA	2.0575	7	0.956
		PC:GDD:T	17.9162	7	< 0.001 **
		PC:GDD:PUFA:T	2.8067	7	0.522

Table S4 : Scatter matrix of main otolith size descriptors.



4.3 Etude 5 : Otolith morphogenesis during the early life stages of fish is temperature-dependant: validation by experimental approach applied to European Seabass (*Dicentrarchus labrax*)

4.3.1 Graphical abstract



4.3.2 Abstract

Understanding the morphogenesis of the otolith and the physiological and external drivers which control it are important, because this step determines the final otolith shape at the adult stage and this is often used as a tool in fish stock identification. Moreover, changes in environmental conditions such as those predicted by climate change scenarios, could also effect the otolith shape. The goal of this study was to assess experimentally the influence of changing temperature and ontogenic evolution, on the shape component of the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) otolith during early-life stages. 1079 individuals were reared with temperature water of 16°C up to 232 days post-fertilization (dpf). During this experiment, several specimens were transferred at 153 dpf, 182 dpf and 211 dpf, into tanks

with temperature water of 21°C, to obtain at the end of this study four temperature conditions, each with different ratios between the number of days at 16°C and 21°C. To evaluate the otolith morphogenesis, samples were examined at 43 dph, 72 dph, 86 dph and 100 dph. For each individual total length was recorded, as were otolith morphometric measurements, shape factors and the extracted, normalized Elliptical Fourier coefficients describing outline shape, for the left and the right otoliths. Amplitude of directional asymmetry (DA) increased from 43 to 100 dph to reach 1.89% of non-overlapping surface found in the dorso-posterior area and then stabilised around this value, which showed that DA was not significant for this species. The evolution of normalized otolith shape from hatching up to 100 dph, showed that there were two main successive changes, primarily with faster growth in the antero-posterior axis than in the dorso-ventral axis, changing the circular shape otolith from that observed at hatching and secondly the increasing complexity which was related to the area between the rostrum and anti-rostrum. To test the effect of changing temperature, growing degree-day was used in three linear mixed effect models. Otolith morphogenesis was positively correlated to growing degree-day, but was also dependant on temperature level. Otolith shape is influenced by environmental factors, particularly temperature, making it an efficient tool for fish stock identification.

4.3.3 Keywords

Otolith shape, ontogenic effect, growing degree day, multivariate mixed-effects models, directional asymmetry

4.3.4 Introduction

The identification of drivers of fish growth is necessary for ongoing sustainable management of commercial species. Fish growth is determined essentially by genetic variation and the phenotypic plasticity which is an adaptive physical response (e.g. changes of morphometrics, behavior, physiology, metabolism) of a specific genotype to environmental conditions (Price

et al. 2003, Fusco and Minelli 2010). Among environmental factors (e.g. salinity, chlorophyll-a, currents, depth), water temperature is the most important factor which influences the fish growth. The literature on the temperature effect on the growth of fish was well known from the beginning of the twenty century, especially Fulton (1904). Ocean temperature, within optimum thermal ranges of species, can increase growth rates as fish are ectothermic and available somatic energy reflects water temperatures (Neuheimer et al. 2011, Barrow et al. 2017, Smoliński and Mirny 2017). In fact, the very common model of Von Bertalanffy was based on the correlation between oxygen consumption of fish and the rate of protein degradation determined by the temperature effect to model the growth of fish (Bretts, 1967). Moreover, this environmental factor in particular is changing in response to global climate evolution, with the ocean forecast to warm by up to 4°C by 2100 and increasing occurrences of extreme climatic events (IPCC, 2014). Several studies have shown that elevated temperatures may significantly influence whole ecosystems or/and affect animals' physiology (specifically above organisms' thermal optima or tolerance) (Hay et al., 2005; Hofmann and Todgham, 2010; Mieszkowska et al., 2006; Pörtner, 2010; Pörtner and Knust, 2007; Thomas et al., 2004).

The otoliths, calcified structures, which are metabolically inert and located in the inner ear cavity, grew during the life of the fish and retain chemical and physical signatures that correspond to biological and environmental histories throughout a fish's life (Casselman, 1987). Therefore, a direct proportionality exists between otolith growth and fish growth (Lagardère and Troadec, 1997; Fossen et al. 2003; Mahé et al. 2017). The otolith shape within one species, is used to identify and then to discriminate stock-units because it integrates all variability in environmental conditions and climate forcing, which affect life history characteristics. The otolith shape differences have been attributed to regional differences in fish metabolic activity due to the environmental factors and genetic contribution, which alter

the growth of otoliths, determining the size and shape of individual otoliths (Gauldie and Nelson 1990; Smith 1992; Begg & Brown, 2000). Since Campana and Casselman (1993), many fishery scientists have developed this type of analysis for stock discrimination studies. However, the otolith morphogenesis was characterized from originally being circular at the larval stage, into a more complex shape for adult stage, especially studied in gadoid species by elongation due to the rise of lobes number and in flatfish by progressing number of secondary growth centres (Jearld. et al.,1993; Lagardère and Troadec, 1997; Modin et al., 1996; Brown et al., 2001; Hüsey, 2008; Irgens et al., 2017). This development of otolith shape is influenced by environmental factors (Hüsey, 2008; Irgens, 2018) and the consequences could be different between right and left inner ear providing directional asymmetry on the otolith shape (Mille et al., 2015; Mahé et al., 2018). During the first early life of stages (larvae and juveniles), the small size of otoliths and their fast relative accretion rates could better detect the potential effect of genetic or environmental drivers than during adult stage. This experimental study examined the otoliths of fish from hatching to 232 days post hatching (dph). The studied species, European seabass (*Dicentrarchus labrax*), is a commercially important species in Europe and represents one key organism in experimental studies. Finally, contrary to gadoid or flatfish species, the structure of otolith outline of this species showed no lobes and no secondary growth centres. Consequently, this study investigated two nested questions:

- How changes the otolith shape according to the ontogenic development from the circular shape?
- How changing temperature affects the otolith shape?

To determine the answer to these crucial questions, Elliptic Fourier analysis, Size parameters and shape indices, combined with mixed effects models, were used to distinguish otolith

shapes according to the experimental conditions. Otolith information combined with mixed-effects modeling provides a powerful approach for estimating biological (intrinsic) and environmental (extrinsic) effects (Weisberg et al. 2010, Morrongiello and Thresher 2015, Mahé et al., 2018; Martino et al., 2019).

4.3.5 Materials and methods

4.3.5.1 Experimental Design

This study was carried out on 1079 European sea bass produced in March 2017 by artificial fertilization in a full factorial mating from a West-Mediterranean population. Floating eggs were separated from sinking (dead) ones 48 hours post fertilization (2 dph) according to the sea bass rearing standard (Chatain, 1994; by decantation at a salinity of 38‰) and introduced in equal proportion into two 450 l tanks with temperature water of 16°C. Juvenile European sea bass were hatched and reared at the Ifremer aquaculture experimental research station in Palavas-les-Flots (Hérault, France). Four samplings were made at 43 dph, 72 dph, 86 dph and 100 dph (Fig. 32, Tab. S1). At 100 dph, all fish have reached the minimum size to be tagged with a nanotag (Lutronics, Nonatec RFID, Lutronic International, Rodange, Luxembourg, www.nonatec.net; size 1 mm × 6 mm; mass 10 mg; frequency: 13.56 MHz) according to the standard tagging procedure (Cousin et al., 2012 ; Ferrari et al., 2014) because all transferred fish from one replicat at 16°C were reared in only one replicat at 21°C. Throughout all experiment, fish density remained comparable among all tanks. After 100 dph, 3 times, several specimens (Tab. S1), from two 450 l tanks with temperature water of 16°C, were transferred at 153 dph, 182 dph and 211 dph in two 450 l tanks with temperature water of 21°C to obtain at the end of this study (232 dph), 4 temperature conditions with the different ratios between the days number at 16°C and 21°C (Fig. 32). All sampled fish were measured (total length; TL± 0.1 cm) from digitized images, using the image-analysis software TNPC (Digital processing for calcified structures, version 7). This process uses an automatic

procedure to extract TL information from calibrated images. To analyze the temperature effect on the growth of fish or otoliths, we used the thermal time or Heat Units, a concept that has been widely used to determine this for more than three centuries e.g., Réaumur 1735, for the effect of growing season length on vegetable and field crops (Bonhomme 2000; Trudgill et al., 2005) which is based on the growing degree-days (Neuheimer and Taggart 2007) as follows:

$$GDD = \sum_{i=1}^n (T_i - T_{th}) \cdot \Delta d$$

Where T_i represented the daytime temperature at i and T_{th} was the threshold temperature and Δd was the time. In this case, T_{th} was fixed to set at 0°C because the effect of threshold temperature included in GDD formula had no significant effect on the results of the models. This degree-day approach quantifies the thermal opportunity for growth by aggregating temperatures relevant to growth (Rittner, 2009). Although the degree-day approach is more precise than calendar time approach when describing growth (Neuheimer and Taggart 2007). Consequently, 4 temperature conditions with the different ratios between the days number at 16°C and 21°C , sampled at end of this study showed the values of GGD different according to the date of transferred day (153 dph= $4107^{\circ}\text{C}\cdot\text{day}$, 182 dph= $3962^{\circ}\text{C}\cdot\text{day}$, 211 dph= $3817^{\circ}\text{C}\cdot\text{day}$ and 232 dph= $3712^{\circ}\text{C}\cdot\text{day}$) (Fig. 32).

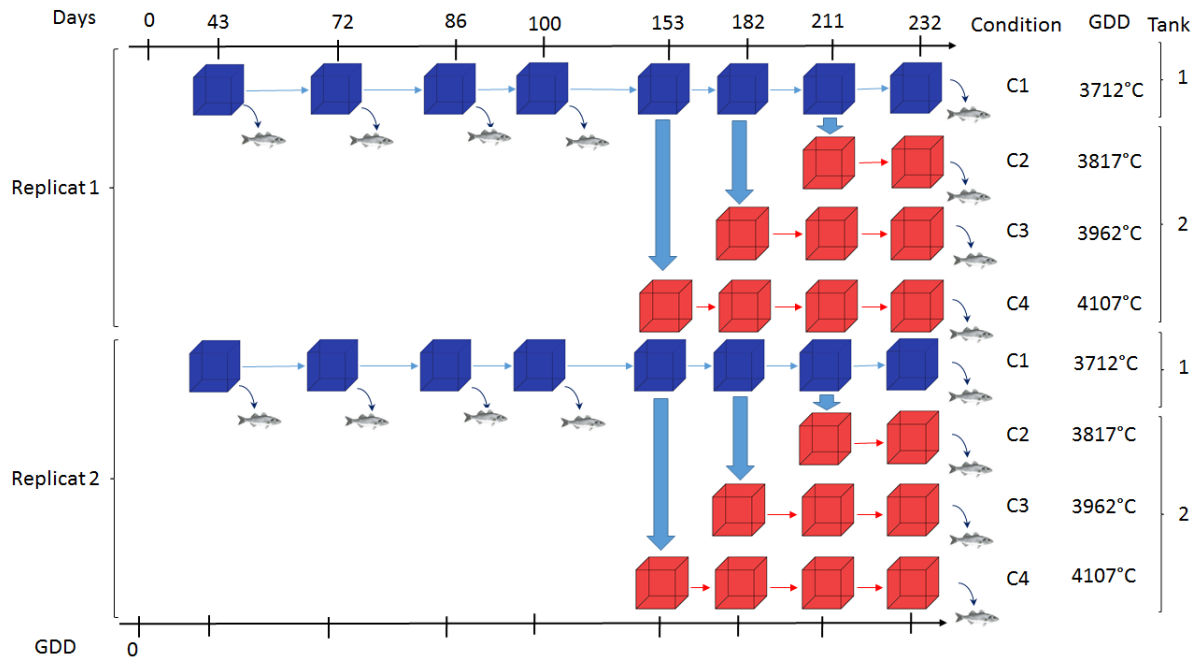


Figure 32: Main steps of the experimental design for seabass with 4 samplings at 43 dph (GDD=688°C.day), 72 dph (GDD=1152°C.day), 86 dph (GDD=1376°C.day), 100 dph (GDD=1600°C.day) during the experiment. At the end (232 dph), there were 4 conditions with a GDD different according the transfer date from 16°C (blue) to 21°C (red). For each sampling date and condition, there were 2 replicates (Curved arrow and Fish indicated the sampling fish; Wide arrow indicated transfer of fish).

4.3.5.2 Otolith shape analysis and measures

Sagittal otoliths (left and right otoliths) were extracted from the cranial cavity. After cleaning, to minimize distortion errors within the normalization process during image analysis, each otolith was placed on a microscope slide with the sulcus facing downward and the rostrum pointing left. The outlines of the otoliths were digitized using an image analysis system consisting of a high-resolution camera connected to an automated microscope using reflected light. Each digitized image was analyzed as fish shape using the image-analysis software TNPC (Digital processing for calcified structures, version 7). To compare the shapes of left and right otoliths, a mirror image of the right otolith was used. Otolith shape was assessed using three methods: the size parameters (Length; Width; Perimeter; Area); shape indices and the Elliptic Fourier Analysis (e.g. Lestrel, 2008) (Tab. S2). These indices described specific aspects of shape: surface area irregularity (Form-factor: O_{FF}), circle shape (Roundness: O_{RD})

and Circularity: O_{CI}), ellipse shape (Ellipticity: O_{EL}) and rectangularity shape (Aspect-Ratio: O_{AR} and Rectangularity: O_{RE}) (Tab. S2). All Elliptic Fourier Descriptors (EFD's) were obtained by using TNPC 7 software from image binarisation. For each otolith, the first 99 elliptical Fourier harmonics (H) were extracted and normalized with respect to the first harmonic and were, thus, invariant to otolith size, rotation and starting point of contour description (Kuhl and Giardina, 1982). To determine the number of harmonics required to reconstruct the otolith outline, the cumulated Fourier Power (F) was calculated for each individual otolith as a measure of the precision of contour reconstruction obtained with harmonics (i.e., the proportion of variance in contour coordinates accounted for by the harmonics):

$$F_{(n_k)} = \sum_{i=1}^{n_k} \frac{A_i^2 + B_i^2 + C_i^2 + D_i^2}{2}$$

Where A_i , B_i , C_i and D_i are the coefficients of the harmonic. $F_{(n_k)}$ and n_k were calculated for each individual otolith in order to ensure that each individual otolith in the sample was reconstructed with a precision of 99.99% (Lestrel, 2008). The maximum number of harmonics across all otoliths was then used to re-construct each individual otolith.

To test Elliptical Fourier Descriptors (EFDs) of otolith outline, firstly, Principal Components Analysis (PCA) was applied on EFDs matrix (Rohlf and Archie, 1984) and a subset of the resulting Principal Components (PCs) was then selected as otolith shape descriptors according to the broken stick model (Legendre and Legendre, 1998). This procedure allowed us to decrease the number of variables used to describe otolith shape variability while ensuring that the main sources of shape variation were kept, as well as to avoid co-linearity between shape descriptors (Rohlf and Archie, 1984).

4.3.5.3 Statistical analyses

4.3.5.3.1 Directional asymmetry

All descriptors of otolith shape (size parameters, shape indices and EFDs) have been tested to analyze the directional asymmetry between left and right otolith shape (i.e. the effect of inner ear location or side on otolith shape : Si) using linear mixed-effects models (univariate models for size parameters and shape indices and multivariate models for shape matrix S) :

$$O \sim \alpha_0 + \Delta\alpha_{0,in} + \alpha_1 Si + \alpha_2 GDD + \alpha_3 Si.GDD \quad (1)$$

where inner ear side (Si) and growing degree day (GDD) are fixed effects and individual (in) is introduced as a random effect ($\Delta\alpha_{1,in}$) on the intercept to account for the fact that left and right otoliths' shapes are more likely to be similar when originating from the same individual. The multivariate versions of model (1) applied to shape matrix S were fitted while accounting for variance heterogeneity between PCs (columns of S). Normality of the residuals and the random effects as well as homoscedasticity of the residuals were assessed by visual inspection of diagnostic plots. The models were fitted by maximizing the restricted log-likelihood. The significance of the fixed effects was tested by likelihood ratio tests between nested models while respecting marginality of the effects (type 2 tests; Fox and Weisberg, 2011) that are supposed to follow a χ^2 distribution under the null hypothesis. Their p-values were adjusted for Multiple Comparisons through the Bonferroni correction (McDonald, 2014). To visualise differences in otolith shape between right and left sides, an average otolith shape of each side group was rebuilt based on EFDs of the averaged shape and the percentage of non-overlapping surface between the right and left otolith mean shapes, was calculated.

4.3.5.3.2 Temperature effect on the otolith shape

To test Temperature (T) effect on the otolith shape (O , described by size parameters, or shape indices or the PCs matrix for EFDs) between 4 temperature conditions, three mixed-effects

models (multivariate for EFDs and univariate for size parameters or shape indices) were fitted and compared:

$$O \sim \alpha_0 + \alpha_1 \cdot GDD \quad (2)$$

$$O \sim (\alpha_0 + \mu_{0,C}) + \alpha_1 \cdot GDD \quad (3)$$

$$O \sim (\alpha_0 + \mu_{0,R} + \mu_{0,C}) + (\alpha_1 + \mu_{1,R}) \cdot GDD \quad (4)$$

where otolith shape variations due to growing degree day (*GDD*) are represented by fixed effects. Random effects (*i*) were used to account for variability due to rearing tanks ($\mu_{0,R}$) and also if there is an effect of temperature other than *GDD* ($\mu_{0,C}$). These models were fitted with a modelled different variance heterogeneity for each PC of the shape matrix *S*. The three models were fitted by maximizing the restricted log-likelihood. We tested the probability ($p < 0.05$) between all models to choose the most appropriate model. Finally, the significance of *GDD* at 5% was tested by likelihood ratio tests between nested models while respecting marginality of the effects (type 2 tests; Fox and Weisberg, 2011) that are supposed to follow a χ^2 distribution under the null hypothesis. As for side effect analysis, to visualise and to evaluate the amplitude difference differences in otolith shape between groups characterized by different treatments, an average otolith shape by group was rebuilt based on EFDs of the averaged shape and the percentage of non-overlapping surface between two groups was calculated. The significant difference was tested between all groups by comparison for each pair from pRDA. Statistical analyses were performed using the following packages in the statistical environment R: ‘nlme’ (Pinheiro et al. 2016), ‘lme4’ (Bates et al., 2011), ‘ggplot2’ (Wickham, 2016), ‘gridExtra’ (Auguie and Antonov, 2017), ‘car’ (Fox et al., 2011) and ‘MASS’ (Venables and Ripley, 2002).

4.3.6 Results

4.3.6.1 Ontogenic effect

To analyze the EFDs of otolith outline, the 99 first Fourier harmonics were extracted for each individual otolith contours. Only the first 32 harmonics were necessary to explain 99.99% of the variation in otolith contour of each individual and were thus used for further analysis. After PCA on the EFD's, only the first seven PC's were kept for the shape matrix according to the broken-stick model (which, in this case, corresponded to a threshold of 6.62% of the total variance explained). These 6 PC's explained 94.75% of the total variance in the EFD's. The pRDA detected no significant directional asymmetry between left and right otolith shape ($p=0.23$). The amplitude of DA, measured as the percentage of the non-overlapping surface between the right and left otolith shapes throughout the experiment, was on average equal to 1.33%. Amplitude of DA increased from 43 to 100 dph to reach a value of 1.89% of non-overlapping surface found in the dorso-posterior area (Fig. 33).

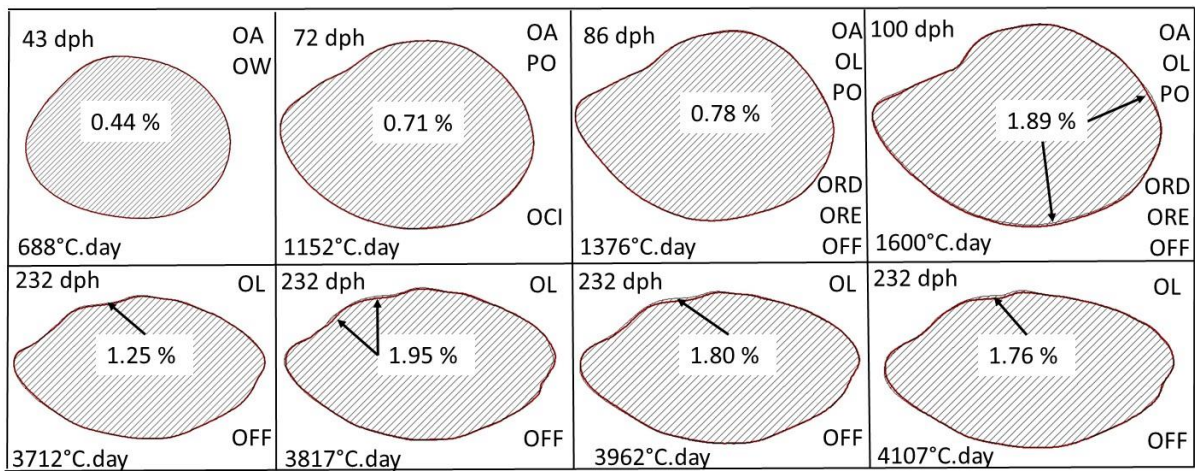


Figure 33: Percentage of non-overlapping surface between left (red line) and right (black line) otolith shape according to the sampling date (dph) and the GDD value (°C.day) (Arrows identified the main areas of difference between both otoliths). Size dimension parameters and shape indices of otolith used to describe seabass otolith outline are identified according to the sampling date and the GDD value when the difference between side was significant ($P<0.05$).

After 100 dph, the observed DA according to the temperature condition were around this value but by contrast characterized by the antero-posterior area (i.e. rostrum and antirostrum area). Among size parameters and shape indices, OA and OW showed significant difference

between right and left otoliths at 43 dph ($p>0.05$, Mixed-effects models; Fig. 34). During this life stage, many shape indexes showed a significant difference between left and right ear (OA, OL, PO, ORD, ORE and OFF; Fig. 34).

From 43 dph to 100 dph, the growth of otolith according to its length (OL) and width (OL) and fish length (Total Length, TL) had the same trend (Fig. 34). However, the otolith growth was not the same in all directions and this was expressed by a shift of otolith shape. O_{CI} and O_{FF} decreased significantly from 43 dph (i.e. $GDD=688^{\circ}C.day$) to 100 dph (i.e. $GDD=1600^{\circ}C.day$) (Fig. 34).

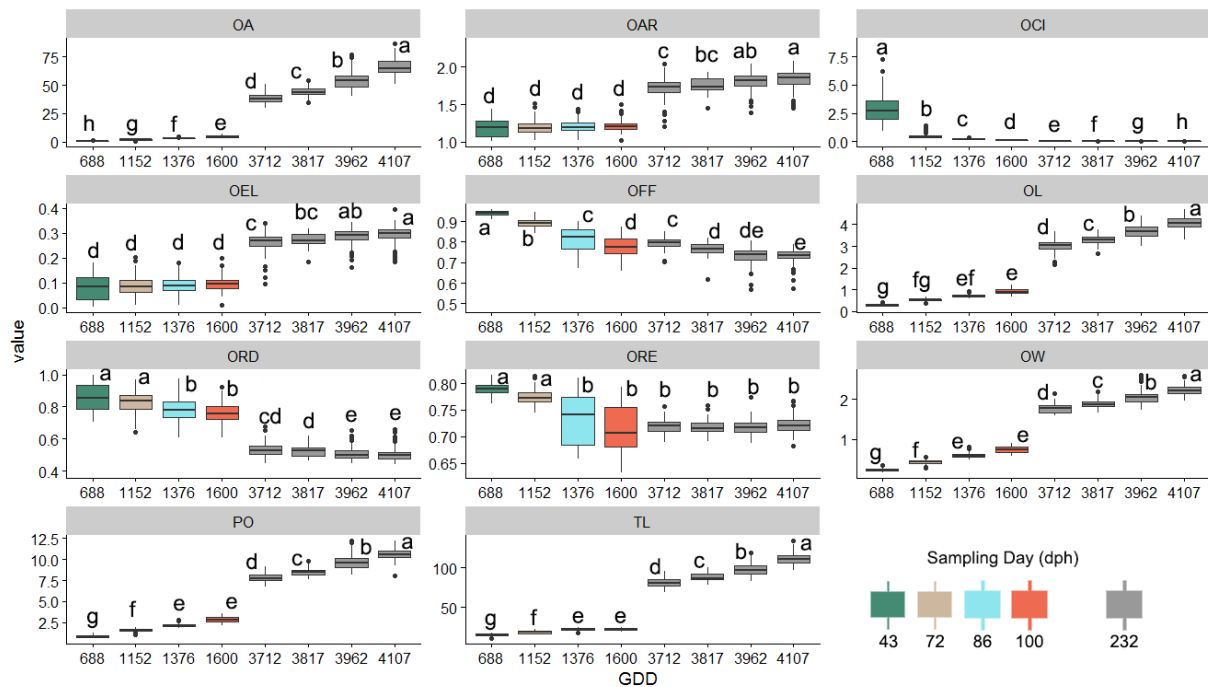


Figure 34: Mean value of Fish Total length (TL; mm) and otolith morphometric variables at Growing Degree Day (GDD, °C.day) of larvae and juveniles of seabass reared at 16°C and 21°C (color of boxplot indicated the sampling date). Different uppercase letters indicate significant differences ($P<0.05$) between values of GDD.

Moreover, during this time, the value of average percentage of non-overlapping surface between the two levels of GDD or time decreased regularly with the age of fish (Tab. 19). The evolution of normalized otolith shape from the hatching to 100 dph (i.e. $GDD=1600^{\circ}C.day$) showed that there were two main successive changes with primarily a growth in antero-posterior axis faster than one in dorso-ventral axis changing the circular

shape otolith at hatching and secondly the increasing complexity which was related to the area between the rostrum and anti-rostrum (Fig. 31).

Table 19: Average percentage of non-overlapping surface between the two reconstructed otolith shapes at the GDD level.

	688°C.day	1152°C.day	1376°C.day	1600°C.day	3712°C.day	3817°C.day	3962°C.day	4107°C.day
688°C.day								
1152°C.day	7,195							
1376°C.day	10,279	3,477						
1600°C.day	13,861	6,896	5,169					
3712°C.day	26,868	21,340	20,517	18,203				
3817°C.day	28,524	23,049	22,076	19,875	2,733			
3962°C.day	30,576	25,260	24,268	21,879	5,476	2,478		
4107°C.day	30,803	25,654	24,749	22,440	5,786	3,512	2,143	

4.3.6.2 Temperature effect

As during the first 100 days of this experiment, the otolith growth and the fish growth are linked, However, O_{RE} did not showed significant difference from 86 dph (i.e. GDD=1376°C.day) which translated into the relative stability of rectangularity expressed by the otolith shape. If the final temperature conditions showed the difference with the value of many morphometric variables at 100 dph (i.e. GDD=1600°C. day), these same descriptors showed the significant difference within the end of this experiment. This temperature effect was observable between four normalized otolith shapes with this evolution which followed the GDD value (Fig. 35).

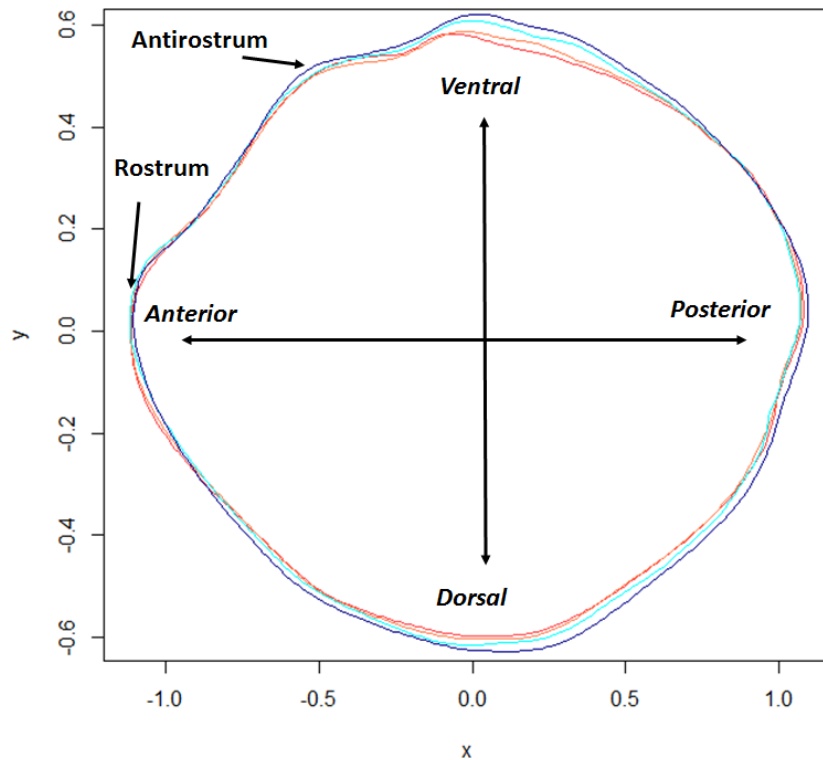


Figure 35: Comparison of otolith normalized shape at the end of experiment (232 dph) for 4 conditions of temperature: C1 (3712°C.day, dark blue line), C2 (3817°C.day, light blue line), C3 (3962°C.day, orange line) and C4 (4107°C.day, red line).

However, the difference between two reconstructed otolith shapes decreased with GDD value (Tab. 20 and Tab. S3). To model the somatic growth (i.e. total length of fish as response variable) and for otolith shape (i.e. size parameters, shape indices and EFDs as response variable), three tested multivariate mixed-effects models were applied and then the best model fitted of the data was selected (Tab. 20). As for fish growth, the selected model for many otolith shape descriptors did not integrated the variability due to rearing tanks and temperature conditions, which was not the case of the selected model for otolith shape described by elliptic Fourier descriptors. GDD had always a significant effect on all otolith shape descriptors with the exception of rectangularity (O_{RE} , $P=0.571$; Tab. 20). Regarding the evolution of the morphometric variables during this second part of this experiment (i.e. from 100 dph to 232 dph), there was a significant modification between the otolith shape (Fig. 35).

The otolith morphogenesis was positively correlated to the level of growing degree-day but it also was depend on the temperature level (Fig. 35, Tab. 20).

Table 20: Selected model and effect of GDD in each model by fish total length (TL) and used otolith morphometric variables.

Response variable	selected model	GDD effect
TL	$O \sim \alpha_0 + \alpha_1.GDD$	P<0,05
OL	$O \sim \alpha_0 + \alpha_1.GDD$	P<0,05
PO	$O \sim \alpha_0 + \alpha_1.GDD$	P<0,05
OA	$O \sim \alpha_0 + \alpha_1.GDD$	P<0,05
OW	$O \sim \alpha_0 + \alpha_1.GDD$	P<0,05
Oel	$O \sim \alpha_0 + \alpha_1.GDD$	P<0,05
Ord	$O \sim \alpha_0 + \alpha_1.GDD$	P<0,05
Oar	$O \sim \alpha_0 + \alpha_1.GDD$	P<0,05
Oci	$O \sim (\alpha_0 + \mu_{0,C}) + \alpha_1.GDD$	P<0,05
Ore	$O \sim (\alpha_0 + \mu_{0,C}) + \alpha_1.GDD$	P=0.571
Off	$O \sim (\alpha_0 + \mu_{0,C}) + \alpha_1.GDD$	P<0,05
PCs	$O \sim (\alpha_0 + \mu_{0,R} + \mu_{0,C}) + (\alpha_1 + \mu_{1,R}).GDD$	P<0,05

4.3.7 Discussion

4.3.7.1 Ontogenic effect

The growth mechanisms of otoliths and their morphogenesis during the early life stages of fish are poorly understood. The shifts in otolith shape are linked to physiological modifications due to environmental disturbance (Geffen, 1987; Dean, 1992; Toole et al., 1993; Vignon, 2018). For flatfish species, the sagittal otoliths are circular and after the metamorphosis, their shape became more complex with the formation of accessory growth

centres (Sogard, 1991; Karakiri et al., 1989; Toole *et al.*, 1993; Modin et al., 1996; Lagardère & Troacdec, 1997) and more precisely during settlement to be adapted to a bottom-living lifestyle (Alhossaini et al., 1989; Karakiri et al., 1989; Okada et al., 2001). Development of secondary growth centres may be governed by changes in the direction of gravity during the shift from dorso-ventral to lateral swimming orientation (Ambrose et al., 1993; Toole et al., 1993). However, as flatfish species, for gadoids species (roundfish species), sagittal otolith was also subjected to several morphological changes as fish transform from larvae to juveniles. The initial spherical form became elongate with accessory growth centres then crenulated shape (Radtke, 1989; Brown et al., 2001; Hüsey, 2008; Irgens et al., 2017). Seabass larvae did not have a settlement period as flatfish and gadoid species and development of secondary growth centres but their otoliths have also undergone an important transformation. Otolith growth patterns are characterized by a negative allometric relationship between length and width (Simoneau et al., 2000). This study on the seabass corroborated the studies on the other fish species indicating the first shift period with the elongation of otoliths which took place prior 70 dph. After this date, the otolith shape of seabass continued to become more complex particularly at level of area between the rostrum and anti-rostrum. This life stage is characterized from hatching by metamorphosis but also by the time of first feeding. This processes is linked to other factors such as food availability (including the match/mismatch hypothesis; Cushing, 1990) and predation pressure (e.g. 'bigger-is-better' mechanism) (Hare and Cowen, 1997).

The metamorphosis mechanism, in addition to having an effect on the otolith shape of fish, was the source of the shape asymmetry between the right and left otoliths because it causes unique asymmetric body shape and a lateralized behavior to be adapted to a bottom-living lifestyle (Okada et al., 2001). This is relocation of the anterior part of the frontal bones from the blind side to the ocular side (Brewster, 1987). This modification of body shape involved

gravity effect as source of otolith asymmetry in flatfish (Schreiber, 2006). However, other factors could explain this significant directional symmetry especially for roundfish species which have been studied, such as *Boops boops* (Mahé et al., 2018), *Liza ramada* (Rebaya et al., 2017), *Diplodus annularis* (Trojette et al., 2015), *Diplodus puntazzo* (Bostanci et al., 2016), *Clupea harengus* (Bird et al., 1986; Mille et al., 2015), *Merlangius merlangus* (Mille et al., 2015) and *Scomberomorus niphonius* (Zhang et al., 2016). The amplitude of directional asymmetry could be dependent on the sampled location and partly considered as a response to the environmental patterns (Mahé et al., 2018; 2019). Our analysis showed that the amplitude of DA increased from 43 to 100 dph due to the dorso-posterior area (Fig. 33). After 100 dph, the DA according to the temperature condition were stabilised without that this value of DA was not significant in seabass.

4.3.7.2 Temperature effect

Temperature affects the growth of fish through direct effects (i.e. metabolism) and indirect effects (i.e. relationship with biotic factors as available food) (Paloheimo and Dickie, 1966; Uphoff et al., 2013). Fish experience higher growth rates when their metabolic activity rises with increasing temperature (Brett, 1979; Clarke and Johnston, 1999). During the early life stage of cod (*Gadus morhua*), among the factors affecting the formation and the number of crenulations in otolith outline, the results of Irgens (2018), Cardinale et al. (2004) and Hüsey (2008) showed that environmental factors, especially temperature and feeding level, have a greater influence than genetic difference. The temperature effect during these early life stage has been demonstrated on the otolith growth and shape. Our results on the seabass corroborated the finding that the temperature positively influenced the fish and otolith growth. These studies have been carried out by comparing larvae or juveniles from different periods *in situ* or from different experimental temperature conditions in parallel (Radtke, 1989; Otterlei et al., 2002; Stormer and Juanes, 2016; Hüsey, 2008; Irgens, 2018). If temperature is a key factor affecting growth in fishes and their otoliths, resulting in mean temperature around the

fish life positively influencing growth, the temperature range could also be a crucial component of the temperature effect, particularly where habitats change during migrations (.e.g. season, feeding, and reproduction, settlement etc...). Adult and juvenile fish possess competent physiological processes that enable these organisms to acclimate to changing environmental conditions (Ishimatsu et al., 2008). However, early life stages are more vulnerable to environmental challenges because they possess higher surface area to volume ratios and have not yet fully developed the homeostatic mechanisms present in adult fish (Hurst et al., 2013). Seabass, larvae and juveniles develop in the sheltered coastal areas or estuarine nurseries during a part of first year of life and then migrate (Kelley, 1988). Only one study had analyzed the effect of changing temperatures on otolith growth and increment deposition rate in larval herring using an experimental approach (Folkvord et al., 2004). Analysing the otolith size at fish length of herring Folkvord et al. (2000; 2004) showed that the otolith growth is more temperature-dependant than somatic growth. Our results on the seabass showed that both otolith and somatic growth were temperature dependent. A recent study on juvenile Australasian snapper (*Chrysophrys auratus*) reared in the laboratory which was focused on metabolic effects on carbon isotope in fish tissues, showed that the $\delta^{13}\text{C}$ in otoliths reflecting the proportional contributions of environmental water and diet, was linked to the temperature level (Martino et al., 2019). Consequently, the metabolic rate was directly proportional to the temperature level influence carbon incorporation for all tissues including the otolith. This partly explained the difference in otolith growth according to the experiment temperature. The experiment on herring larvae (Folkvord et al., 2004) consisting of four temperature conditions (4°C, 12°C and 2 others shifted two times with 4/8/4°C and 12/8/12°C) showed that the size and width of otolith daily increment were temperature-dependant. Our study showed at 232 dph, seabass otolith growth was correlated positively to growing degree-day. Moreover, for herring larvae, a significant temperature effect was

observed on the otolith growth rate (slower growing fish having larger otoliths) (Folkvord et al., 2004). Our study, in the same way, identified the seabass at 21°C having firstly the highest otolith growth and secondly the highest otolith elongation (e.g. smaller ratio between width on length). Consequently, temperature effect due to level and changing temperature had the same trend on the shape otolith for a small pelagic species (e.g. herring) and demersal species (e.g. seabass).

To observe the otolith morphogenesis, this work showed that among the commonly used descriptors (i.e. size parameters, shape indices and EFDs), EFDs described better the otolith outline than all univariates descriptors. Consequently, the number of used descriptors in the analysis could be decreased. This difference between shape descriptors is explained by the detailed level of outline which is integrated into the descriptor. Conversely, the weight or the volume of otolith could also be good proxies to characterize otolith shape because they integrate the growth in three dimensions. The effect of temperature on the otolith shape is the sum of GDD and also the relationship between GDD and tank temperature. In fact, the otolith shape is significantly influenced by the sum of degree-days but the evolution speed is correlated positively to the tank temperature. Moreover, GDD is used widely for measuring the temperature and climate effects on the growth of vegetables and field crops (Bonhomme, 2000; Trudgill et al., 2005). In fisheries sciences, this approach is still under used to analyse the ontogenic growth and the factors which could influence this, (only 5% of temperature-related growth studies between 1980 and 2006; Neuheimer and Taggart, 2007), but it is tending to increase. The degree-day assumes growth of fish or otoliths to be linear with and solely a function of temperature (Legg et al., 1998). However, there are temperature independent regulators of fish growth (i.e. population density, genetic, food availability) which decrease the effect of temperature on the fish growth. On the other hand, assuming temperature is the only contributor to growth allows to GDD to be uniquely account for

temperature dependent processes. Consequently, this index is more relevant than calendar time and temperature value (Uphoff et al., 2013). Neuheimer and Taggart (2007) showed that length-at-age in 17 stocks of North Atlantic cod (*Gadus morhua*) was significantly correlated with GDD without correlation with calendar time. In our study, GDD value could be tested on the same period, the effect of changing temperature. The results showed independently the date of changing temperature, the otolith shape and growth followed positively the GDD value.

In conclusion, the growth and the morphogenesis of otoliths during the early life stages of fish are due to ontogenic effect but also temperature-dependent. The temperature affected only the modification level of the initial otolith shape (e.g. evolution speed of otolith shape) without to influence their final otolith shape (e.g. development direction of otolith shape). The effect of temperature according to the constant value or with shift during this period of fish life depends on the Growing Degree Day.

4.3.8 Données supplémentaires

Table S1: Fish Number sampled by GDD value and days number at 16°C and 21°C. Total length characteristics (mean ± SD) are given for each sample.

N	Lt	GDD (°C.day)	Nb Days at 16°C	Nb Days at 21°C
130	14,92±0,00	688	43	0
156	18,66±0,00	1152	72	0
160	22,47±0,00	1376	86	0
72	22,35±0,00	1600	100	0
96	81,31±6,39	3712	232	0
36	88,04±5,88	3817	211	21
170	97,47±7,81	3962	182	50
148	111,15±7,66	4107	153	79

Table S2: Size dimension parameters and shape indices of otolith used to describe seabass otolith outline.

Size parameters	Shape indices	
Length : OL	Circularity :	$Oci = \frac{Po}{Ao^2}$
Width : OW	Ellipticity :	$Oel = \frac{Lo - Wo}{Lo + Wo}$
Perimeter : PO	Roundness :	$Ord = \frac{4 Ao}{\pi Lo^2}$
Area: OA	Aspect ratio :	$Oar = \frac{Lo}{Wo}$
	Rectangularity :	$Ore = \frac{Ao}{Lo . Wo}$
	Form-factor :	$Off = \frac{4 \pi Ao}{Po^2}$

Table S3: Ratio between average percentages of non-overlapping surface between the two reconstructed otolith shapes at the different levels of GDD and the difference of degree.days.

	688°C.day	1152°C.day	1376°C.day	1600°C.day	3712°C.day	3817°C.day	3962°C.day	4107°C.day
688°C.day								
1152°C.day	0,016							
1376°C.day	0,015	0,016						
1600°C.day	0,015	0,015	0,023					
3712°C.day	0,009	0,008	0,009	0,009				
3817°C.day	0,009	0,009	0,009	0,009	0,026			
3962°C.day	0,009	0,009	0,009	0,009	0,022	0,017		
4107°C.day	0,009	0,009	0,009	0,009	0,015	0,012	0,015	

4.4 Synthèse du chapitre III

- L'asymétrie directionnelle de la forme des otolithes droits et gauches peut être observable dès que la phase de métamorphose est terminée, c'est-à-dire de l'ordre de 70 dph pour le bar.
- La morphogenèse de l'otolithe se déroule en 2 phases avec premièrement un allongement selon un axe dorso-ventral dû essentiellement à l'évolution ontogénique puis des modifications de forme au niveau de la région entre l'anti-rostre et le rostre qui seraient plutôt la conséquence des effets environnementaux et génétiques.
- L'approche par degrés-jours de croissance est plus pertinente que celle utilisant le nombre de jours calendaires et la température de l'eau pour suivre la trajectoire de morphogenèse de l'otolithe.
- Le facteur température influence à la fois la vitesse et la trajectoire de la morphogenèse de l'otolithe.
- L'enrichissement alimentaire en n-3 AGPI ne montre pas d'effet sur la morphogenèse de l'otolithe.

Discussion générale et perspectives

La forme de l'otolithe est de plus en plus utilisée pour identifier les unités de gestion ou stocks halieutiques. Par conséquent, cette thèse s'est intéressée à différentes questions concernant son utilisation et ses limites et à mieux comprendre l'influence de certains facteurs environnementaux (température et composition du bol alimentaire). Cette partie de la thèse reprend et discute les principaux résultats acquis ainsi que les limites méthodologiques rencontrées pour répondre aux 4 objectifs de la thèse.

5.1 Limites méthodologiques liées à l'extraction de l'information contenue dans la forme de l'otolithe pour identifier les stocks ?

5.1.1 Différence entre approches univariées et multivariées pour décrire et analyser la forme de l'otolithe

Si l'analyse de la forme externe de l'otolithe est de nos jours très utilisée, différentes méthodes d'extraction de l'information peuvent être appliquées. Dans les 5 études réalisées lors de cette thèse, nous avons décidé de coupler l'utilisation de données univariées simples (mesures linéaires et indices de forme) et des données multivariées qui décrivent l'intégralité de la forme. Cette approche couplée permet d'obtenir d'une part, une classification optimale des groupes d'individus à partir des données multivariées et d'autre part, permet de facilement comprendre les différences entre groupes à partir des données univariées (exemple étude 5). Nous avons montré que l'utilisation des données univariées seules (études 1 et 3) est moins précise que lorsque l'on intègre des données multivariées. Dans le cas de l'étude sur le merlan bleu, le périmètre de l'otolithe ne permet d'obtenir qu'une simple tendance latitudinale et non

pas des groupes d'individus (étude 1). De même, les études 4 et 5 ont mis en évidence que l'utilisation des données univariées pouvait être limitée pour démontrer l'effet de certaines variables environnementales comme la composition du régime alimentaire ou la température. Parmi les données univariées, il y a les mesures morphométriques de l'otolithe (longueur, largeur, périmètre, aire...) qui dépendent de la taille de l'otolithe et les indices de forme (ratio ou formules utilisant au moins 2 mesures morphométriques permettant de se rapprocher de formes géométriques simples de référence : le rond, le carré, le rectangle, l'ellipse...). Ainsi que suggéré par leurs formules, il existe une très grande colinéarité entre certains indices de forme (exemple entre Facteur de forme et Rondeur) comme illustré dans le tableau S3 de l'étude 4, de sorte qu'il est redondant de les utiliser tous ensemble. Pour suivre la morphogenèse de l'otolithe et les effets potentiels de la température et de la disponibilité alimentaire des acides gras polyinsaturés oméga-3 (n-3AGPI), toutes les données univariées ont été utilisées. Les résultats montrent que certains indices de forme (dans notre cas : rondeur, ellipticité et facteur de forme) ne sont pas assez précis pour décrire la totalité du contour. Ainsi, il faut rester prudent sur l'utilisation des données univariées comme descripteurs pertinents dans les études de la forme de l'otolithe.

5.1.2 Quels sont les descripteurs elliptiques de Fourier normalisés à utiliser ?

Lors des études réalisées au cours de cette thèse, nous avons utilisé l'analyse des ellipses de Fourier avec les descripteurs associés (EFDs) qui est la méthode multivariée la plus employée dans la littérature pour décrire la forme de l'otolithe (voir Introduction section 1.7). En utilisant cette approche, il est possible de reconstruire et de superposer les formes moyennes après les avoir standardisées. Cette technique permet d'observer précisément où se trouvent les différences moyennes entre des groupes d'individus. Lors de l'extraction des EFDs, la puissance de Fourier cumulée ciblée est généralement PF=99.99% de la variance expliquée

des coordonnées des points du contour (Lestrel, 2008). Cependant, tout dépend de l'échelle considérée : la forme individuelle ou la forme moyenne de l'échantillon. Pour calculer le nombre d'EFDs nécessaires pour atteindre cette cible, il est possible d'utiliser des logiciels libres comme Shape (Iwata et Ukai, 2002) ou des packages sous R comme Momocs (Bonhomme *et al.*, 2014) et plus récemment ShapeR (Libungan et Pålsson, 2015). Le logiciel Shape identifie la moyenne individuelle sur l'ensemble des individus testés (Hiroyoshi Iwata, pers. comm.). De même, le package ShapeR utilise là encore une valeur moyenne de la puissance de Fourier cumulée (Libungan, pers. comm.). Dans ces 2 cas, il n'est pas possible de modifier cette étape dans l'extraction des données de forme. A l'inverse, dans cette thèse, nous avons pris le parti de travailler à l'échelle individuelle de sorte à pouvoir étudier les sources de variations de la forme intra-populationnelle (ou interindividuelle), voire intra-individuelle (ex. asymétrie). Pour ce faire, nous avons extrait pour chaque individu k , les 99 premières harmoniques, puis calculé la puissance de Fourier cumulée individuelle en fonction du nombre d'harmoniques afin de déterminer pour cet individu le nombre nécessaire pour atteindre 99.99% (n_k). A la suite de cela, nous avons fixé le nombre d'harmoniques de Fourier utilisées dans l'étude comme étant le maximum du nombre d'harmoniques nécessaires pour une PF=99.99% tous individus confondus $n = \max(n_k)$. En conséquence, les nombres d'harmoniques utilisés (n) dans les études de cette thèse sont relativement élevés par rapport aux études qui travaillent à l'échelle populationnelle (forme moyenne), que ce soit pour le merlan bleu (étude 1 ; $n= 34$), l'espadon (étude 2, $n=39$), la bogue (étude 3 ; $n= 26$) ou le bar (étude 4 ; $n=31$ et étude 5 ; $n=32$). Pour le bar, les 2 études réalisées avec des jeux de données différents ont donné des valeurs individuelles n très comparables. De même, lorsqu'on compare l'étude 3 ($n= 26$) concernant la bogue couvrant toute la mer Méditerranée avec celle menée sur les côtes algériennes pour cette même espèce (Ider *et al.*, 2017 ; $n=23$), les nombres d'harmoniques utilisées sont très proches. A l'inverse, le nombre d'harmoniques

nécessaires pour le merlan bleu dans l'étude 1 ($n = 34$) est très supérieur à celui obtenu par Keating *et al.* (2014 ; $n = 10$) qui pourtant a aussi travaillé à l'échelle individuelle. En analysant en détail l'article de Keating *et al.* (2014), ce nombre de 10 est la valeur individuelle minimale pour obtenir une PF individuelle de 99.99% (et non maximale comme dans cette thèse). Ceci implique donc que pour les autres individus, les EFDs de ces 10 harmoniques permettent de décrire moins de 99.99% de la variance des coordonnées des points du contour. Cette différence de sélection des EFDs peut impacter les résultats de classification des individus. En toute rigueur, il serait important que chaque forme d'otolithe soit décrite par le même niveau de variance expliquée.

5.2 Peut-on utiliser la forme des otolithes comme outil d'identification de stocks pour un ensemble d'espèces dans différents environnements biogéographiques ? (Objectif 1)

5.2.1 Identification d'un gradient géographique de structuration des stocks des espèces de grands pélagiques aux espèces démersales

L'étude de la structuration des stocks à partir des otolithes a été réalisée chez l'espadon (*Xiphias gladius*, grand pélagique), le merlan bleu (*Micromesistius poutassou*, petit pélagique) et la bogue (*Boops boops*, espèce démersale). Les résultats obtenus lors de ces 3 études (études 1, 2 et 3), réalisées à grande échelle spatiale, montrent une séparation des individus observés pour le merlan bleu et la bogue en plusieurs stocks alors que pour l'espadon, la zone d'étude ne semble former qu'une seule unité (Fig. 36).

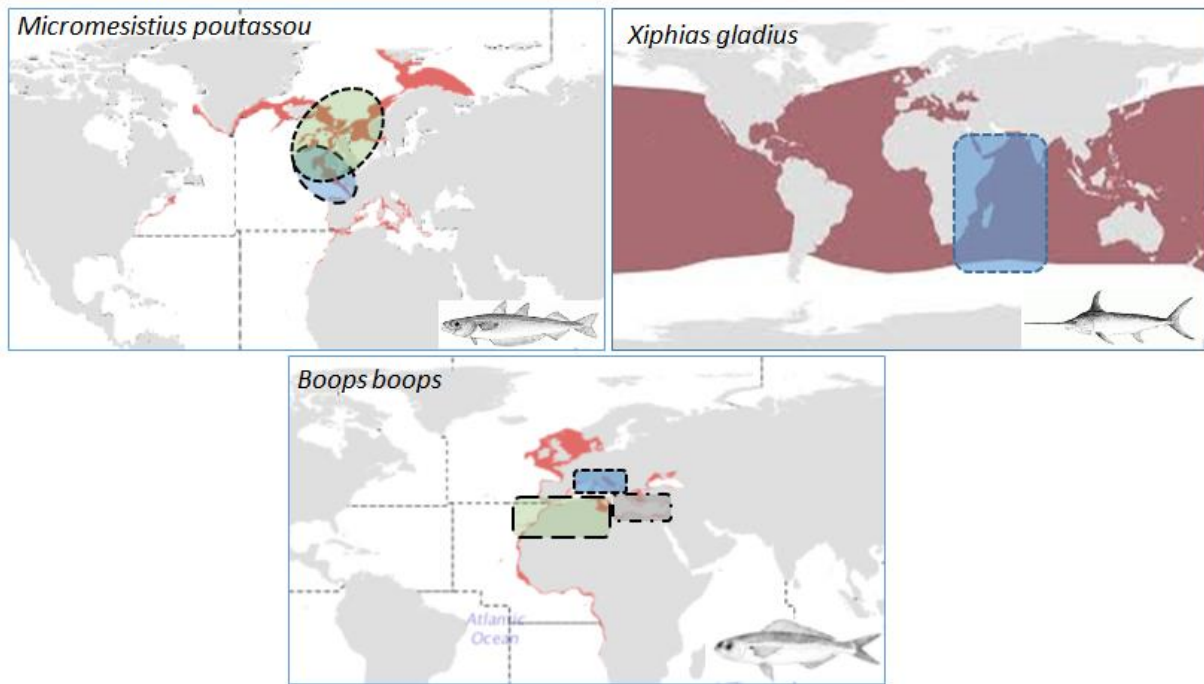


Figure 36: Résultats de la discrimination géographique des stocks observés chez 3 espèces étudiées lors de cette thèse (zone colorée en rouge représente l'aire de répartition mondiale de chaque espèce définie par la FAO).

L'étude concernant l'espadon dans la partie ouest de l'océan Indien (étude 2) indique que cette zone géographique n'abrite qu'un seul stock. Les schémas de migration géographique de l'espadon sont parmi les plus complexes des espèces pélagiques et sont connus pour être très variables. Des études de marquage ont montré qu'il est très difficile d'établir des schémas migratoires pour cette espèce (Palko *et al.*, 1981 ; Sedberry et Loefer, 2001). La température et l'oxygène sont connus pour être les principaux facteurs environnementaux qui contrôlent la migration et la distribution des grands poissons pélagiques (Carey, 1990; Brill, 1994; Prince et Goodyear, 2006; Sund *et al.*, 2006). L'ouest de l'océan Indien est réparti sur les 2 hémisphères nord et sud, et présente ainsi des conditions environnementales très différentes avec une grande diversité d'écosystèmes répartis le long du gradient latitudinal (Sherman et Hempel, 2008). Les principaux phénomènes océanographiques que sont les courants équatoriaux du sud et du nord forment un front hydrochimique tropical qui sépare l'océan Indien principalement au niveau de l'équateur puis en plusieurs zones oligotrophes selon un

gradient latitudinal (Longhurst, 1998; Schott *et al.*, 2009). Cependant, une étude a montré qu'un individu marqué au nord de l'équateur avait été recapturé à 6 670 km au sud-est de sa position initiale, signe d'un possible passage à travers ces fronts hydrographiques (Kadagi *et al.*, 2011). Ceci est corroboré par les résultats obtenus à partir de l'étude 2 qui semblent indiquer que l'ouest de l'océan Indien ne formerait qu'un seul stock pour l'espadon. Des résultats similaires ont été obtenus lors d'une étude génétique d'identification des stocks menée à partir du même échantillon d'individus (Muths *et al.*, 2013). Ainsi, en accord avec l'analyse génétique, l'analyse de la forme des otolithes indique que la structuration des stocks chez l'espadon, grand pélagique, n'est pas contrainte ou limitée par des potentielles barrières ou fronts hydroclimatiques dans l'ouest de l'océan Indien.

Une autre étude a été menée sur une espèce de poisson pélagique mais cette fois-ci de petite taille (étude 1). Les connaissances sur la structuration spatiale du merlan bleu, l'espèce la plus pêchée en Atlantique Nord-Est (avec une capture internationale annuelle supérieure au million de tonnes ; Trenkel *et al.*, 2014), sont issues de plusieurs études parcellaires à échelles spatiales restreintes. Ces études se sont basées sur différentes techniques comme la génétique, des modèles de dérive larvaire, la parasitologie, des techniques conventionnelles de marquage/recapture et enfin plus récemment la forme des otolithes (Karasev 1990; Isaev et Selivestof, 1991; Skogen *et al.*, 1999; Ryan *et al.*, 2005; Brophy *et al.*, 2007; Brophy et King, 2007; Was *et al.*, 2008; ICES, 2012; Keating *et al.*, 2014). La synthèse de ces travaux suggère qu'il existerait plusieurs stocks sans pour autant définir les limites précises de ceux-ci. Notre étude s'appuyant, sur 1693 individus provenant de 10 zones géographiques, permet de corroborer et de préciser la structuration spatiale de cette espèce en identifiant 2 stocks selon un gradient latitudinal avec une zone de mélange située le long des côtes ouest de l'Ecosse. Cette zone correspond à la principale aire de reproduction du merlan bleu (Hátún *et al.*, 2009). Les individus composant le stock sud présenteraient une croissance supérieure à ceux du

stock nord traduisant des conditions environnementales (disponibilité en nourriture et température principalement) plus favorables au sud (Brophy et King, 2007). D'un point de vue génétique, les études semblent montrer une différence entre les individus d'une part, présents dans le golfe de Gascogne et en mer Celtique au sud et d'autre part, pêchés au nord de l'Irlande (entre Porcupine et Rockall ; Was *et al.*, 2006 et 2008). Ainsi, l'étude 1 préciserait bien que les stocks de merlans bleus dans l'océan Atlantique Nord-Est présentent une structuration Nord-Sud avec une zone de reproduction mixte mais ne permettant pas d'échanges importants entre les 2 stocks.

Le troisième cas d'étude présenté dans cette thèse est la bogue vivant principalement en mer Méditerranée (étude 3). Cette espèce grégaire démersale de petite taille pourrait avoir plus de difficultés à franchir des barrières ou fronts hydrogéographiques par rapport aux espèces pélagiques. Dans la zone d'étude allant des îles Canaries à la mer Egée, il existe plusieurs de ces barrières avec la première située aux abords du détroit de Gibraltar entre l'océan Atlantique et l'ouest de la mer Méditerranée caractérisée par le front hydrologique d'Almería-Oran présentant une circulation cyclonique. Juste après, le long de la côte algérienne, il y a de nombreux tourbillons cycloniques et anticycloniques (Millot, 1989). Le deuxième front est le détroit de Sicile qui est une barrière physique caractérisée par une faible profondeur et une courantologie très complexe limitant les échanges entre les parties est et ouest de la mer Méditerranée (Skirris, 2014). Les résultats de l'analyse de forme d'otolithes de la bogue divisent la mer Méditerranée en 3 stocks dont un stock sud-ouest caractéristique des eaux méditerranéennes impactées par le courant océanique et les deux autres stocks séparés par le détroit (ou canal) de Sicile. Cette répartition de stocks en mer Méditerranée est la même que celle préalablement observée pour la sardine (marqueur otolithe utilisé ; Jemaa *et al.*, 2015) et pour des céphalopodes (modèle des relations entre captures et paramètres environnementaux ; Keller *et al.*, 2017). Ce type de répartition montre ainsi que la séparation des individus est essentiellement

définie par les barrières hydrologiques présentes au niveau de la mer Méditerranée. Au niveau du détroit de Gibraltar, les courants peuvent faciliter les échanges et donc limiter les effets de barrière. Il n'existe pas d'études génétiques actuellement sur cette espèce qui pourraient compléter les résultats obtenus.

Ces 3 études (Chapitres I et II) montrent que la limite des stocks des espèces démersales semble être dirigée en particulier par des barrières ou fronts physiques alors que celle des espèces pélagiques semble être liée uniquement à sa structure génétique.

5.2.2 La variabilité inter-espèces de la forme des otolithes est liée à leur adaptation fonctionnelle

La taille et la complexité de la forme des otolithes et le niveau de discrimination des stocks qu'ils permettent, peuvent être très différents d'une espèce à l'autre. La bogue, petite espèce démersale, mesure 18.38 cm de longueur totale (L_t) en moyenne et présente des otolithes de 8.92 mm de longueur moyenne (L_o). Les 2 autres espèces pélagiques sont plus grandes mais avec des otolithes plus petits (merlan bleu : $L_t=26.94$ cm, $L_o=5.41$ mm ; espadon : $L_t=154.97$ cm, $L_o=4.61$ mm). Lors des études sur ces 3 espèces, nous avons utilisé le nombre d'harmoniques (n) individuel maximum pour obtenir une puissance de Fourier égale à 99.99% pour tous les individus. Ce nombre exprime la complexité de forme des otolithes. Il a été estimé à 26 pour la bogue, ce qui est très inférieur aux valeurs observées pour l'espadon ($n=39$) et le merlan bleu ($n=34$). Les téléostéens ont des oreilles internes composées de canaux semi-circulaires qui perçoivent les ondes angulaires, les otolithes quant à eux détectent les stimulations auditives et vestibulaires (Wright *et al.*, 2002). La science appelée écomorphologie est basée sur le fait que la forme est le résultat d'une adaptation fonctionnelle à l'environnement (Feilich et López-Fernández, 2019). Les espèces démersales du fait du faible niveau de visibilité par rapport à la surface, ont développé beaucoup plus leur audition que les espèces pélagiques (Lychakov et Rebane, 2000 ; Wright *et al.*, 2010). Une étude d'écomorphologie basée sur des espèces de poissons observés entre 200 et 750 m de fond

montrent qu'il existe une corrélation positive entre profondeur et taille des otolithes (Cruz et Lombarte, 2004; Lombarte et Cruz, 2007). La relation entre forme et taille de l'otolithe et les fonctions de mécano-réception et de transduction du son a également été abordée dans plusieurs études (Gauldie et Nelson, 1990; Popper et Lu, 2000; Schulz-Mirbach *et al.*, 2011; Inoue *et al.*, 2013). Les conclusions laissent à penser que les poissons vivants au fond présentent des otolithes plus grands que ceux des espèces pélagiques ce qui est une conséquence du développement de leur capacité d'écoute et de communication plus que celle de la vision. Ces caractéristiques de forme et de taille des otolithes seraient aussi la conséquence de leur rôle dans la nage au travers de la fonction vestibulaire car les poissons ayant des capacités de nage très rapide avec de fortes accélérations présentent des otolithes très petits (Lychakov et Rebane 2005). Les données de taille et de complexité de la forme de l'otolithe obtenues lors des trois études de stock (études 1, 2 et 3) supportent bien l'hypothèse que les fonctions d'audition et vestibulaire seraient à l'origine de ces différences. Ceci expliquerait pourquoi les merlans bleus (étude 1) et les espadons (étude 2) présentent des otolithes plus petits mais de forme plus complexe que ceux de la bogue (étude 3). Volpedo et Echeverría (2003) ont observé que la variabilité de forme des otolithes entre individus était très importante chez les espèces de poissons pélagiques à petits otolithes. Ces espèces pourraient donc présenter une plus grande variabilité intra-stock limitant le pouvoir de discrimination inter-stocks de la forme des otolithes. De plus, selon la taille des individus et le milieu (pélagique, démersal ou benthique) dans lequel ils vivent, leur adaptation fonctionnelle en particulier influence la forme de leur otolithe. De ce fait, il y a un gradient du niveau de discrimination de stocks (ou d'identification des limites entre les stocks) lorsqu'on utilise la forme de l'otolithe allant du plus faible chez les grands pélagiques au plus important chez les espèces démersales voir benthiques.

5.3 Y a-t-il des facteurs confondants à prendre en compte dans l'utilisation de l'analyse de forme des otolithes pour l'identification des stocks halieutiques ? (Objectif 2)

L'identification de stocks halieutiques repose sur la classification des individus en groupes qui maximise la variabilité intergroupes par rapport à la variabilité intra-groupe. De ce fait, pour mesurer la variabilité intergroupes (ou inter-stocks), il est nécessaire d'utiliser des échelles spatiales suffisamment grandes qui dépassent les limites de ces groupes mais aussi de pouvoir à l'intérieur de chaque groupe, mesurer les variabilités intra-groupe et intra-individu (Fig. 37). L'évolution de la forme de l'otolithe, au niveau intra-individu est liée d'une part à l'effet des facteurs environnementaux et d'autre part à l'évolution ontogénique et à leurs interactions. Au niveau intra-stock, à ces sources de variabilité, on peut associer la composante génétique qui elle-même présente des interactions avec les deux sources définies au niveau intra-individu. Ainsi au niveau inter-stock, la variabilité de forme est directement liée aux effets intervenant aux niveaux intra-individu et intra-stock (Fig. 37).

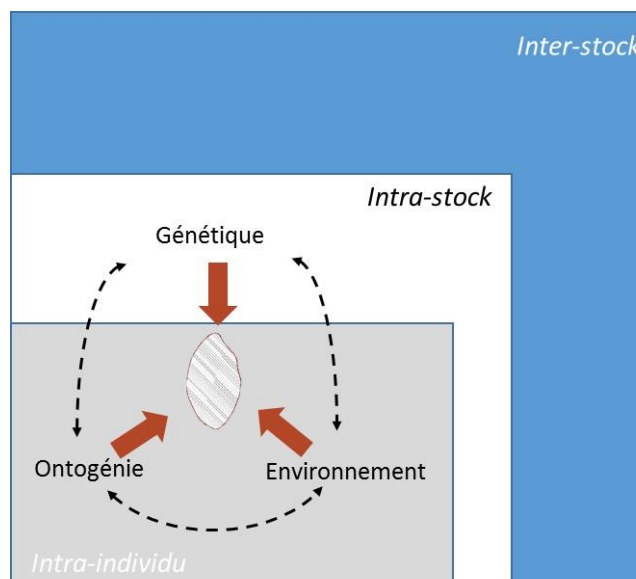


Figure 37 : Niveaux de variabilités à prendre en compte lors d'une étude de discrimination des stocks.

5.3.1 Quelles sont les échelles spatiales et/ou temporelles à utiliser?

Lorsqu'on veut réaliser une étude d'identification de stocks, il est nécessaire de prendre en compte deux échelles. La première est l'échelle spatiale. Si la zone d'étude est trop petite, il y a un risque de ne couvrir qu'une seule partie du stock, auquel cas, la variabilité mesurée ne serait pas celle inter-stock mais celle intra-stock se traduisant soit par un continuum soit par une différence entre des sous-populations. L'étude 2 concernant l'espadon dans l'ouest de l'océan Indien indique que cette zone forme un continuum mais ne permet pas d'indiquer les limites de ce stock halieutique pourtant géré comme tel. L'échelle spatiale nécessaire pour identifier les stocks dépend bien entendu des caractéristiques biologiques et écologiques de l'espèce, notamment de sa capacité de nage, de son comportement migratoire et de la taille de son domaine vital. Ainsi, l'échelle géographique sera plus grande lorsqu'on étudie des grands pélagiques que lorsqu'on s'intéresse à des espèces benthiques. Cependant, on peut utiliser des informations pour définir l'échelle géographique. Par exemple, sachant que la répartition génétique chez la sole commune (*Solea solea*) montre des unités distantes d'au moins 100 km (Kotoulas *et al.*, 1995), il serait important d'utiliser une échelle géographique plus importante pour identifier les stocks de cette espèce. Lors de cette thèse, nous avons utilisés pour le merlan bleu (étude 1) et pour la bogue (étude 3), des données déjà utilisées pour des études à échelle géographique plus restreinte. De ce fait, il est possible de comparer les résultats des études menées à différentes échelles géographiques pour le merlan bleu entre l'étude 1 dans tout le nord-est de l'océan Atlantique et celle de Keating *et al* (2014) dans l'ouest de l'Ecosse et pour la bogue entre l'étude 3 dans l'ensemble de la mer Méditerranée et celle de Ider *et al* (2017) sur les côtes algériennes. Les études menées à échelles géographiques limitées identifient le même nombre de composantes de stocks pour cette zone géographique donnée que celles à grande échelle. Ceci montre bien que l'échelle géographique choisie n'influence pas le nombre de stocks identifiés au final.

La deuxième échelle à prendre en compte est l'échelle temporelle utilisée pour évaluer la variabilité intra-stock. Cette variabilité intra-stock intègre des effets comme celui de la cohorte ou de la période de reproduction qui pourront être particulièrement marqués pour des espèces à durée de vie courte ou lors de conditions environnementales très changeantes (Tuset *et al.*, 2019). L'effet « année de prélèvement » a été testé lors des 3 premières études et seul le merlan bleu a montré une différence significative entre les années de prélèvement qu'il a fallu intégrer par la suite lors de l'analyse de la variabilité inter-stocks. Ainsi pour réaliser une analyse de discrimination des stocks, il est nécessaire d'évaluer préalablement les potentiels de déplacements de l'espèce considérée pour définir l'emprise spatiale des données à utiliser puis d'effectuer un échantillonnage qui prendra en compte la variabilité intra-stock et potentiellement l'effet cohorte.

5.3.2 Variabilité intra-individu mesurable par l'asymétrie directionnelle

Au niveau intra-individu, il peut y avoir asymétrie entre les otolithes droit et gauche. Cette asymétrie peut être de trois formes : a) asymétrie fluctuante représentée par la déviation non-directionnelle de la symétrie parfaite limitée par les processus de canalisation et de stabilité développementale; b) asymétrie directionnelle (AD) ou processus de latéralisation sur un côté; c) antisymétrie ou processus de latéralisation sur un côté qui varie de façon aléatoire entre les individus (voir introduction). L'asymétrie peut avoir plusieurs sources : soit stochastique (effet aléatoire), soit déterminée génétiquement, soit due à un ou plusieurs stress environnementaux (Palmer, 2016). L'AD ne dépasserait pas 18% quelle que soit l'espèce, du fait des processus de régulation développementale de canalisation (Mille, 2015). Chez les poissons plats, l'asymétrie de la tête avec la migration de l'œil et du système nerveux intervenant lors de la métamorphose est déterminée génétiquement (Graf et Baker, 1983 ; Friedman, 2008; Bao *et al.*, 2011; Compagnucci *et al.*, 2014). Ils présentent des otolithes plus

larges et plus longs pour la face aveugle quel que soit le type d'espèces (dextre ou senestre ; Sogard, 1991; Fischer et Thompson, 2004; Helling *et al.*, 2005, Mériqot *et al.*, 2012 ; Mille *et al.*, 2015). De ce fait, cette AD observée pour les otolithes des poissons plats est la conséquence principalement d'un déterminisme génétique qui a comme finalité une adaptation fonctionnelle au mode de vie benthique adopté après la métamorphose. De plus, étant donné que les oreilles droite et gauche sont positionnées l'une au-dessus de l'autre après latéralisation, le phénomène de gravité peut aussi jouer un rôle dans cette AD en agissant sur la croissance accréionnelle (Schreiber, 2006; Mille *et al.*, 2015). Chez les poissons ronds, l'asymétrie due à la métamorphose doit être négligeable par rapport aux poissons plats. Cependant, l'étude 3 montre que chez la bogue, il y a une asymétrie directionnelle significative comme ce qui a été préalablement observé chez d'autres poissons ronds comme le mullet porc (*Liza ramada* ; Rebaya *et al.*, 2017), le sparailon (*Diplodus annularis* ; Trojette *et al.*, 2015), le sar à museau pointu (*Diplodus puntazzo* ; Bostanci *et al.*, 2016), le thazard oriental (*Scomberomorus niphonius* ; Zhang *et al.*, 2016) et le merlan (*Merlangius merlangus* ; Mille *et al.*, 2015). Cette étude 3 montre pour la première fois que la direction de cette AD peut changer au sein d'une espèce en fonction des zones géographiques étudiées. En l'absence d'études sur la structuration génétique de la bogue en mer Méditerranée, ce résultat peut être une conséquence soit d'un isolement génétique soit d'une adaptation génétique locale soit de la plasticité phénotypique, les deux dernières en réponse à des stress ou pressions environnementales différentes entre les zones géographiques concernées. Des études sur des conditions d'hyper-gravité allant jusqu'à 3G ont déjà montré ce type d'asymétrie directionnelle (Anken *et al.*, 2009 ; Hilbig *et al.*, 2011). Cependant, l'étude 3 *in situ* montre que l'AD chez les poissons ronds est observable ou non et dans une direction ou l'autre selon la zone géographique analysée. Chez la bogue, il n'y a pas de différence de forme de l'otolithe entre toutes les zones géographiques lorsqu'on analyse l'otolithe gauche

où la canalisation pourrait contrôler cela. A l'inverse, c'est la forme de l'otolithe droit qui change en fonction des sites d'étude et qui entraîne donc cette AD avec des niveaux et des orientations qui ne sont pas constants. Cette différence de canalisation entre les 2 oreilles est très surprenante. Chez les poissons, seulement une étude au niveau interspécifique a montré qu'au sein de la famille des cichlides, les espèces présentaient des sensibilités auditives différentes et que cela pourrait être dû à leur adaptation fonctionnelle différente de l'oreille interne en fonction de l'habitat rencontré (Schulz-Mirbach *et al.*, 2012). Ainsi, cette hypothèse pourrait être reprise en intra-spécifique dans le cas de la bogue pour expliquer cette différence de canalisation selon la zone géographique étudiée, différence qui correspondrait à une adaptation fonctionnelle. Chez les humains, une latéralisation des fonctions auditives avec une perception des fréquences et des intensités sonores différente entre les oreilles droite et gauche a été observée (Sininger et Cone-Wesson, 2004 ; Critchley et Henson, 2014). L'équipe de Kimura a montré que l'oreille droite humaine servait à la perception de la parole alors que celle de gauche intervenait plus pour les stimuli de son liés à des bruits (Kimura, 1963 ; 1964 ; King et Kimura, 1972). Le type de structure d'oreille étant très proche entre l'homme et le poisson, on pourrait donc penser que les oreilles internes droite et gauche des poissons participeraient toutes les 2 à l'audition mais n'auraient pas le même rôle. Il se pourrait que chez les poissons, de même, il y ait aussi une latéralisation des fonctions auditives et que selon la fonction auditive, le degré de canalisation soit plus ou moins important. La perception des sons par les poissons est très difficile à analyser. Cependant, une revue sur le sujet suggère que cela fait appel à un procédé très complexe (Popper et Fay, 1993). Ainsi, prenant en compte cette hypothèse, les changements de forme pourraient être la conséquence d'une différence de degré de canalisation entre les deux oreilles, liée à une différence de fonction. Ces résultats montrent aussi que, si pour une espèce donnée, l'AD a été mesurée lors d'une étude, les résultats ne peuvent pas être extrapolés à toutes les autres

études. Il est donc nécessaire de la mesurer préalablement pour ne pas biaiser l'analyse de la variabilité inter-stocks qui pourrait être faite par la suite.

5.4 Quels sont les effets de la température et du taux d'acides gras polyinsaturés oméga-3 sur la forme de l'otolithe ? (Objectifs 3 et 4)

5.4.1 Connaître et évaluer les effets environnementaux

Quand on s'intéresse à la mesure de la variabilité de forme externe des otolithes des individus de façon à les classer en groupes, on doit finalement évaluer les différences résultant de la combinaison et des interactions entre les effets environnementaux et génétiques durant la vie du poisson et dépendant aussi de l'évolution ontogénique et de ses processus sous-jacents. La discrimination génétique ne suffit pas à évaluer les stocks halieutiques (ou unités de gestion) car une différence phénotypique non observable au niveau génétique peut être suffisante pour avoir 2 stocks séparés qui présentent des caractéristiques d'exploitation en particulier de recrutement et de mortalité (naturelle et par pêche) différentes (Begg *et al.*, 1999). Si Campana et Casselman (1993) ont suggéré que les facteurs environnementaux influençaient davantage la forme des otolithes que la composante génétique, depuis il a été suggéré que l'otolithe est façonné à la fois de façon synergique ou antagoniste par les facteurs génétiques et environnementaux (Cardinale *et al.*, 2004). Les effets de l'environnement agissent au niveau général sur la forme de l'otolithe alors les effets génétiques ont une influence beaucoup plus localisée (Vignon et Morat 2010). Parmi les facteurs environnementaux décrits en introduction et qui peuvent potentiellement influencer la forme de l'otolithe, nous avons décidé de nous focaliser sur 2 effets. Bien que l'effet de la température de l'eau sur le métabolisme des poissons ait été documenté à maintes reprises et qu'il soit généralement considéré comme le déterminant le plus puissant de l'environnement sur le métabolisme des poissons (Berghahn et Karakiri, 1990 ; Bergstedt *et al.*, 1990 ; Volk *et al.*, 1990 ; Person-Le

Ruyet *et al.*, 2004 ; Pauly, 2010), il n'a été que peu étudié chez l'otolithe. Un autre facteur environnemental influençant l'otolithe est l'alimentation. Des études ont montré l'effet significatif de la quantité (Gagliano et McCormick, 2004 ; Hüsey, 2008) et de la composition spécifique (Mille *et al.*, 2016) de la nourriture disponible pour les poissons sur la forme de l'otolithe. De plus, des études ont montré des effets de l'interaction entre la température et l'alimentation (Cardinale *et al.*, 2004 ; Mille, 2015). De ce fait, nous nous sommes focalisés sur l'effet de la température et de la composition alimentaire, et plus spécifiquement le taux d'acides gras polyinsaturés oméga-3 (n-3AGPI ou en anglais n-3 PUFA), sur la forme de l'otolithe lors des 2 études du chapitre III. Pour pouvoir étudier l'effet d'un et a fortiori de deux facteurs, il est nécessaire d'utiliser l'approche expérimentale car dans le milieu naturel, il est souvent impossible d'isoler et de comprendre l'effet d'un ou de plusieurs facteurs étant donné le nombre de facteurs confondants non contrôlés. Un deuxième problème se pose lors des études *in situ* qui est de connaître ou de sélectionner la valeur la plus pertinente des facteurs potentiels. Souvent cette question se pose pour décider quelle valeur de température utiliser pour tester les effets de la température sur la croissance du poisson par exemple. Lorsqu'on analyse la forme d'un otolithe, cela implique de prendre en compte les effets de covariables durant toute sa morphogénèse. De ce fait, pour étudier l'effet de l'alimentation ou de la température, il est quasi-impossible d'obtenir une valeur intégrant totalement l'effet de ce facteur sur toute la durée de vie du poisson étudié. Il est encore plus difficile d'obtenir des valeurs pour tester ces effets lorsque le poisson effectue des grandes migrations géographiques mais aussi verticales avec par exemple le cas du merlu (de Pontual *et al.*, 2012). Ainsi, l'approche expérimentale permet de pallier ces problèmes.

5.4.2 Utilisation des Degrés-Jour de Croissance pour suivre l'effet de la température

Dans le cas de l'évaluation de l'effet de la température sur un processus développemental (ex. croissance, morphogenèse), la méthode classique est d'utiliser dans les modèles statistiques la valeur brute de la température et le nombre de jours calendaires. Cependant, avec cette méthode, il est impossible de comparer par exemple les résultats des études 4 et 5 avec des niveaux de température non stables durant toute l'expérience. En conséquence, le concept de temps thermique ou unité thermique a été utilisé et comparé à la méthode classique. Il repose sur le nombre de degrés jours de croissance emmagasinés par l'individu (Neuheimer et Taggart, 2007). Cette approche d'analyse de la croissance en considérant les degrés-jours de croissance (GDD en anglais) est basée sur le principe que la croissance dépend de la somme des températures journalières auxquelles la température a un effet sur la croissance. La synthèse de Neuheimer et Taggart (2007) réalisée à partir de 41 jeux de données extraits d'études de terrain et expérimentales a montré qu'il y avait une relation linéaire significative entre la longueur des poissons mesurés à un instant t et leur niveau de GDD dans 92% des cas. Ce résultat montre bien que l'utilisation des GDD en halieutique, bien que peu fréquente, est très intéressante car elle permet de suivre et de prédire le développement en fonction des températures. D'autre part, elle permet aussi de comparer des résultats obtenus en interspécifiques ou en intra-spécifiques. L'étude 4 qui a testé différents modèles statistiques utilisant à la fois la méthode classique et l'approche par GDD montre bien que la modélisation de l'effet de la température sur la morphogenèse des otolithes est plus précise en utilisant l'indice GDD qu'en se basant sur la température et le nombre de jours calendaires. Cependant, il faut noter que si la forme de l'otolithe est directement liée à la valeur mesurée de GDD, pour une même valeur de GDD, la vitesse d'évolution de la forme sera plus grande pour des individus évoluant à des températures moyennes plus élevées. Ceci montre que

l'effet de la température n'est pas compris seulement dans la valeur de GDD mais aussi dans la valeur de la température moyenne d'exposition (étant comprise dans la limite des valeurs pertinentes de température). L'utilisation des GDD implique aussi de vérifier ses limites d'utilisation avec la notion de valeur seuil de température en-deçà de laquelle, la croissance n'a pas lieu (voir introduction Chapitre 3). Cette valeur seuil de température n'étant pas toujours connue avec certitude, il convient de tester les effets de son changement sur les résultats. Sur les otolithes analysés dans le cadre du chapitre 3, aucun effet de ce type n'a été détecté contrairement à ce qui avait été observé pour la croissance somatique du bar (Gourtay, 2018) et donc dès le 1^{er} degré emmagasiné, la température agirait sur l'otolithe ce qui n'est pas le cas de la croissance du poisson.

5.4.3 Effet du facteur température

En analysant les résultats des 2 études avec des températures constantes ou changeantes de 15°C, 16°C, 20°C et 21°C pendant l'expérience, on constate que la forme de l'otolithe est liée significativement à la température. Ceci corrobore les résultats obtenus chez la morue (Hüssy, 2008 ; Irgens, 2018). Cependant, l'évolution de la forme de l'otolithe de morue se traduit par un niveau général de complexité qui augmente avec le niveau de crénulation. Pour le bar, l'évolution constatée dans les deux études 4 et 5 se fait selon une évolution de la croissance du ratio entre les axes antéro-postérieur et dorso-ventral puis au niveau de la région située entre l'anti-rostre et le rostre. La première évolution de forme qui traduit une croissance moins rapide de l'axe dorso-ventral que celui de l'axe antéro-postérieur serait en particulier due au développement ontogénique (voir chapitre 5.1.3) alors que l'évolution au niveau de la zone comprise entre le rostre et l'antirostre serait d'ordre environnemental (Reichenbacher *et al.*, 2009 ; Vignon et Morat, 2010 ; Radhakrishnan *et al.*, 2012 ; Reichenbacher et Reichard, 2014). Les patrons de morphogénèse observés lors des études 4 et 5 sont similaires, seule la

vitesse d'évolution change alors que les souches génétiques diffèrent entre les 2 études : l'Atlantique pour l'étude 4 et la Méditerranée pour l'étude 5. Ceci suggère que la morphogenèse de l'otolithe est fortement canalisée. La forme est liée au nombre de degrés-jour de croissance (GDD) qu'a accumulé le poisson et la vitesse à laquelle la forme change est quant à elle positivement corrélée à la température moyenne de l'eau. L'étude réalisée par K. Hüseyin en 2008 montre qu'en comparant des morues évoluant dans des bassins à différentes températures, le niveau de crénulation est corrélé positivement à la température, ce qui a été vérifié avec une étude *in situ* (Irgens, 2018). Bien qu'il faille comparer des données en fonction de la valeur de GDD, il semblerait là aussi que la température ait un effet sur la vitesse de la morphogenèse de l'otolithe qui correspondrait au niveau de crénulation. Pour conclure, l'effet de la température sur la forme de l'otolithe pourrait être seulement d'accélérer la morphogenèse selon une trajectoire fixe si bien que pour une même valeur de GDD, on devrait avoir la même forme. Cependant, les résultats de l'étude 4 nous montrent que l'effet de la température est bien d'accélérer la morphogenèse mais aussi de changer la trajectoire d'évolution de la forme car à valeur de GDD fixe, pour 2 températures données, les formes sont différentes (Fig. 38).

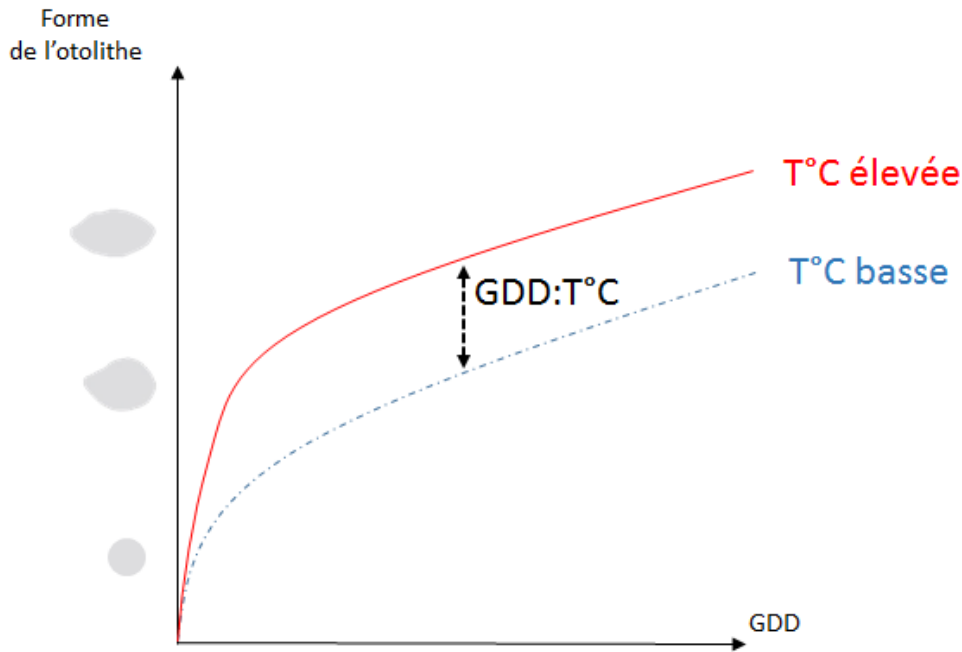


Figure 38 : Morphogenèse de l'otolithe en fonction de la valeur mesurée de GDD pour 2 températures moyennes de bassin. La différence entre ces 2 courbes est expliquée par l'interaction entre la valeur de GDD et la température moyenne du bassin (GDD : T°C).

5.4.4 Effet du taux d'acides gras polyinsaturés oméga-3 dans l'alimentation

Les acides gras polyinsaturés oméga-3 (n-3 AGPI) ont un rôle essentiel en tant que précurseurs des eicosanoïdes qui sont des médiateurs cellulaires agissant sur le système nerveux et donc le développement larvaire, l'excrétion rénale et branchiale et l'osmorégulation (Bell *et al.*, 1996, Tocher, 2003). La réduction des n-3 AGPI dans l'alimentation a plusieurs effets, à différents niveaux : elle entraîne par exemple une diminution de la fluidité des membranes cellulaires et une diminution des capacités de nage. L'étude 4 ne montre pas d'effet de cette composante alimentaire sur la morphogenèse de l'otolithe et il n'y a pas d'interaction entre la température et les niveaux de n-3 AGPI testés. La première explication est que les valeurs que nous avons testées (0,73% : niveau bas avec des farines de Colza et de poissons / 1,65% : niveau haut avec des farines de poissons uniquement) sont au-delà de la valeur seuil en deçà de laquelle la carence en n-3 AGPI pourrait avoir un effet sur la forme des otolithes. Cependant, bien que Skalli et Robin (2004) aient montré que le seuil inférieur en n-3 AGPI est de 0,70% pour

avoir un effet significatif sur la croissance pondérale du poisson, le travail spécifique sur la croissance somatique mené à partir de la même expérience que l'étude 4 a montré que la croissance du poisson mais aussi le développement des tissus musculaires et de certains organes (cœur, foie et système gastro-intestinal) étaient corrélés positivement aux taux de n-3 AGPI testés (Gourtay, 2018). Ainsi, cette différence de composition de l'alimentation en acides gras polyinsaturés oméga-3 serait suffisante pour impacter le développement du poisson et donc potentiellement l'otolithe. Dans une étude sur l'effet du taux alimentaire en n-3 AGPI mais avec des valeurs inférieures (0.3% et 1%) et à des âges différents (entre 7 et 29 jpf) et entre (225 et 295 jpf), Mille *et al.* (2015) n'ont pas détecté d'effet du taux de n-3 AGPI sur la forme finale de l'otolithe. Cependant, ces auteurs ont détecté un effet sur la morphogenèse de l'otolithe au stade juvénile lié à l'appauvrissement en n-3 AGPI au stade larvaire (effet « retard ») compensé par la suite de sorte à ne plus être détectable en fin d'expérience. Les n-3 AGPI sont des constituants essentiels des membranes cellulaires chez les organismes marins. De ce fait, les résultats observés sur la forme de l'otolithe pourraient s'expliquer par une action très faible, voire nulle, du niveau des n-3 AGPI sur l'incorporation de la matière organique au sein de l'otolithe alors que leur effet sur les membranes cellulaire est susceptible d'affecter la synthèse des précurseurs de la matrice organique de l'otolithe dans l'endolymphe (Nagasawa, 2013). Cependant, l'effet du taux de n-3 AGPI ingéré pourrait être limité par des processus physiologiques de régulation qui servent à maintenir les différentes constantes physiologiques (phénomène d'homéostasie), dont l'intégrité et la fluidité des membranes, à des niveaux nécessaires pour un bon fonctionnement de l'organisme (Simensky, 1974 ; Los et Murata, 2004 ; Maulucci *et al.*, 2016). Ainsi, les poissons régulent leur viscosité de membrane à l'aide du processus d'adaptation homéovisqueuse à travers plusieurs processus que sont la modification de l'insaturation des acides gras, la modification de la composition des phospholipides en groupes polaires et la

modification du rapport stérol/phospholipides (Wodtke, 1978 ; Hazel et Carpenter, 1985 ; Behan *et al.*, 1993 ; Farkas *et al.*, 1994, Ernst *et al.*, 2016). De ce fait, les poissons régulant l'effet des n-3 AGPI, le taux d'acides gras polyinsaturés oméga-3 dans l'alimentation ne semble pas avoir d'effet sur la forme des otolithes pour les niveaux testés.

5.5 Synthèse des effets cumulés sur la forme des otolithes

Cette thèse regroupe 5 études dont 3 *in situ* pour discriminer les stocks de merlans bleus, d'espadons et de bogues. Le schéma global ci-dessous identifie les domaines auxquels cette thèse a apporté de nouvelles connaissances (Fig. 39). Tout d'abord, les études 1, 2 et 3 se sont focalisées sur l'otolithe comme indicateur de structure de stock pour des espèces allant des grands pélagiques aux espèces démersales voir benthiques. L'étude 3 s'est aussi focalisée sur l'asymétrie directionnelle de forme des otolithes et ses conséquences importantes pour l'identification des stocks. Enfin, les 2 dernières études expérimentales (4 et 5) ont permis de progresser sur la compréhension des sources de variabilité de la forme de l'otolithe pendant sa morphogénèse et plus particulièrement sur les effets : 1) de la température à travers une approche originale utilisant les degrés-jours de croissance (GDD) et, 2) de la composition alimentaire en acides gras polyinsaturés oméga-3 (n-3 AGPI). De même, ces études expérimentales ont aussi permis d'observer l'évolution de forme de l'otolithe due au développement ontogénique.

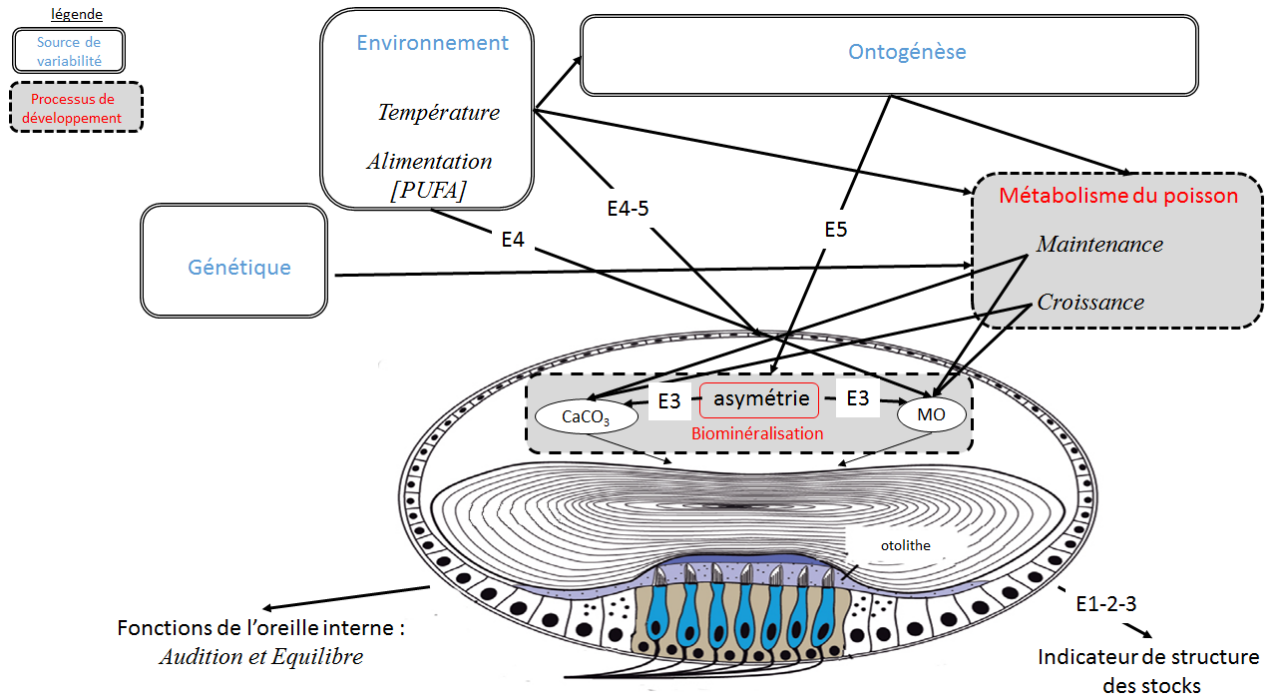


Figure 39 : Influence des facteurs endogènes et exogènes sur la morphogénèse de l'otolithe. Les 5 études de la thèse sont représentées de E1 à E5 (figure adaptée à partir de Fablet *et al.*, 2011 ; Irgens, 2018 ; Schulz-Mirbach *et al.*, 2019).

Lors de cette thèse, un effort a été produit pour tenter de clarifier quelles étaient les sources de variabilité de la forme de l'otolithe, leurs interactions, le rôle des processus de régulation développementale au niveau intra et inter-populations et enfin les conséquences en terme d'adaptations fonctionnelles ou à la niche écologique (Fig. 40).

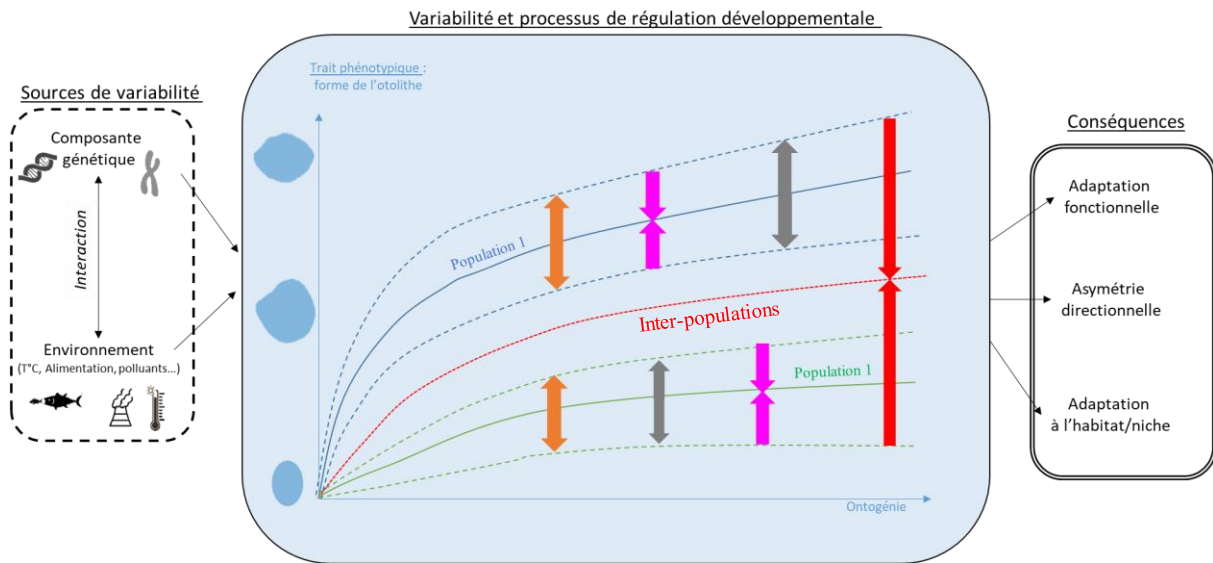


Figure 40 : Sources de variabilité et processus de régulation développementale agissant sur la morphogénèse de l'otolithe ayant pour conséquences différents types d'adaptations.

5.6 Perspectives

Cette thèse s'est intéressée aux sources de variation de la forme des otolithes et à leurs implications pour l'utilisation de celle-ci afin de discriminer de stocks de poissons. Elle a montré la nécessité de mieux comprendre les mécanismes de morphogénèse et de biomérialisation de l'otolithe pour pouvoir utiliser sa forme à bon escient. Les développements informatiques récents ont permis de simplifier l'accès aux méthodes d'extraction de l'information de la forme des otolithes comme celle des descripteurs des ellipses de Fourier. D'autres développements sont attendus dans les années futures comme l'analyse de la forme en 3 dimensions et l'utilisation de l'apprentissage automatisé (aussi appelé « Intelligence Artificielle ») sur des jeux de données massives (« big data ») d'images en 2 voire 3 dimensions. Enfin, cette thèse explore l'utilisation de la variabilité géographique de l'asymétrie bilatérale directionnelle des otolithes comme outil de discrimination des stocks.

5.6.1 Besoins en développement de la recherche sur les mécanismes de biomérialisation de l'otolithe et ses sources de variabilité

La compréhension de la morphogénèse de l'otolithe fait appel à la connaissance spatialisée des mécanismes d'accrétion des fractions minérale et organique et aux effets des facteurs endogènes et exogènes sur ces processus d'accrétion. Ces mécanismes, contrôlés notamment par le transfert des composés nécessaires entre différents fluides au travers de barrières membranaires, est aussi appelée biominéralisation. Pour démêler, et donc comprendre, les effets des facteurs exogènes (environnementaux) et des processus endogènes (physiologiques), il est nécessaire d'en tester certains tout en contrôlant les autres, potentiellement confondants, au sein d'études expérimentales. Cependant, le nombre d'études de ce type reste encore très limité à l'heure actuelle, certainement parce que, pour une espèce donnée, le processus est très complexe, de sorte qu'il n'existe pas de modèle de morphogénèse de l'otolithe généralisable à toutes les espèces. Au-delà des facteurs exogènes et physiologiques, il est nécessaire de comprendre l'influence de la structure spatiale de la matrice organique sur laquelle se réalisent la calcification et la spatialisation du processus de biominéralisation. Notamment, la forme de l'otolithe dépend de la précipitation de la matière minérale sur la matière organique à la fois du côté distal mais aussi du côté proximal de l'otolithe. Il a également été montré que les éléments (sodium, Na ; potassium, K ; rubidium, Rb ; strontium, Sr et baryum, Ba) composant la fraction minérale se fixaient différemment selon le polymorphe rencontré (aragonite, vaterite, calcite) du carbonate de calcium (CaCO_3) (Pracheil *et al.*, 2019). Enfin, une asymétrie de la composition chimique de l'otolithe selon un axe proximo-distal a été démontré, traduisant de ce fait une biominéralisation hétérogène entre les côtés distal et proximal de l'otolithe (de Pontual *et al.*, 2019).

La compréhension de la morphogénèse de l'otolithe pourrait aussi bénéficier de l'utilisation d'approches de modélisation. Par exemple, un modèle de reconstruction de la morphogénèse

2D de l'otolithe basé sur l'extraction des macrostructures internes à partir de technique analyse d'image a été développé par l'équipe Ifremer de Brest et appliqué à un certain nombre d'espèces (lieu noir, *Polliachus virens* ; merlu, *Merluccius merluccius* ; morue, *Gadhus morua* ; plie, *Pleuronectes platessa* ; Fablet *et al.*, 2009). Au-delà de la reconstruction de l'histoire morphologique de l'otolithe, un modèle mécaniste, basé sur la théorie des budgets d'énergie dynamique (DEB, Kooijman, 2000) qui décrit les flux de matières et d'énergie au cours de la vie d'un individu, a été développé pour simuler les dynamiques de la croissance et l'opacité des otolithes en fonction de la température et de la nourriture. Son application aux otolithes de morue permet d'expliquer les différences de pattern observées entre différents stocks (Fablet *et al.*, 2011). Ces approches, pour l'instant, rares, pourraient être élargies à d'autres espèces et/ou utilisées pour comprendre les dynamiques d'incorporation d'éléments biochimiques. En plus, il serait très important de pouvoir étudier la structure cristalline généralement composée d'aragonite mais qui peut être modifiée pour donner de la vaterite. Ainsi, les études sur les otolithes partiellement ou totalement vateritiques sont peu nombreuses (Reimer *et al.*, 2017, Mc Connell *et al.*, 2019; Vignon, 2019). Cependant, l'étude de la structure cristalline proprement-dite et ses conséquences sur la forme de l'otolithe reste une question très importante et centrale dans le processus de morphogenèse de l'otolithe. Prédire de manière totalement explicite ce mécanisme complexe qu'est la morphogenèse de l'otolithe reste pour l'instant un objectif difficilement atteignable.

Une partie de cette thèse a été dédiée à l'amélioration de la compréhension la part de chaque source dans la variabilité de la forme de l'otolithe. Cependant, pour progresser sur la question de la validité de l'utilisation de la forme des otolithes comme indicateur de stock et du type de stock (génétique, environnemental, halieutique) identifié, il est nécessaire de quantifier les composantes génétiques et environnementales de la variation de forme des otolithes. Ceci passe par des approches expérimentales de type « jardin commun » où des individus de

différentes origines « génétiques » (soit différents parents, soit différentes populations) sont élevés dans différentes conditions environnementales selon un plan factoriel, de sorte à estimer l'effet des facteurs croisés « origine » et « environnement » sur la forme des otolithes. De telles études expérimentales restent très rares dans le domaine.

5.6.2 Nouveaux développements pour analyser la forme des otolithes

En 2010, le nombre total de pièces calcifiées étudiées par les 22 pays européens était de 759 403 (ICES, 2011), ce qui donne un volume potentiel de données de forme très important. Certains pays comme la France et la Belgique réalisent des images calibrées de chaque pièce calcifiée. De ce fait, le développement de bases de données d'images pour bancariser ces informations, couplé à des applications d'Intelligence Artificielle, en particulier l'Apprentissage Profond (« Deep Learning »), telles que développées en ce moment pour les sciences marines (Working Group on Machine Learning in Marine Science, WGMLEARN ; ICES, 2019) devraient permettre dans un futur proche d'utiliser des approches de type données massives pour identifier les stocks. Récemment, 2 études basées sur l'Apprentissage Profond à partir d'images d'otolithes ont été réalisées dans le but d'estimer l'âge de poissons (Poisson Caillault *et al.*, 2018 ; Moen *et al.*, 2018). Ces méthodes pourraient tout à fait être appliquées à la forme des otolithes pour discriminer les stocks.

Si l'Intelligence Artificielle permet de traiter d'importants jeux de données, d'autres développements quant à eux, pourraient permettre de développer la précision des variables utilisées pour décrire la forme globale de l'otolithe. La modélisation de l'âge du poisson en fonction des descripteurs de forme de l'otolithe montre que le poids de l'otolithe peut être pertinent pour des individus âgés (Mahé *et al.*, 2017). Ceci permet de penser que, selon les espèces, les données en 2 dimensions ne seraient peut-être pas assez robustes pour représenter la morphogenèse qui est par nature un phénomène en 3 dimensions. L'étude de la relation

entre la croissance de l'otolithe et celle du poisson montre bien que le poids de l'otolithe est une variable très importante à prendre en compte dès que l'âge augmente, car si la croissance de l'otolithe est tout d'abord plus importante selon l'axe antéro-postérieur puis dorso-ventral, celle le long de l'axe proximo-distal (« en épaisseur ») augmente dès lors que l'âge est important (Mahé *et al.*, 2017). Cependant, jusqu'à présent le coût élevé des acquisitions d'images en 3D a freiné les études de la forme tridimensionnelle des otolithes. Ainsi, une perspective est le développement des méthodes d'acquisition d'images et des analyses de forme en 3D pour accéder à la totalité de l'information et comparer les résultats à ceux obtenus en 2D. Par exemple, une étude d'identification d'une famille d'espèces de scianidae (maigre : *Argyrosomus regius* ; corb commun : *Sciaena umbra* ; ombrine : *Umbrina cirrosa*) à partir de données 3D simples dans le cadre du développement de la base web AFORO a montré de très bons résultats (Marti-Puig *et al.*, 2015). Comme l'analyse 2D, l'analyse en 3D permettrait d'extraire des données univariées comme le volume mais aussi des données multivariées comme les descripteurs elliptiques de Fourier. Elle permettrait également d'analyser en détail la zone appelée *sulcus acusticus* qui est la partie striée de l'otolithe, en contact avec la macula et donc très importante dans les mécanismes fonctionnels.

5.6.3 Utilisation de l'asymétrie directionnelle comme outil potentiel de discrimination des stocks

Lors de l'étude concernant la bogue en mer Méditerranée (Chapitre 2), le niveau et l'orientation de l'asymétrie bilatérale directionnelle (AD) dépendait de la zone géographique échantillonnée. Si ces zones géographiques coïncident avec des sous-populations, l'AD pourrait alors être utilisée comme un indicateur pour la discrimination de stocks de poissons. Pour commencer à tester à cette hypothèse, 2431 soles communes (*Solea solea*) ont été échantillonnées de la Manche Ouest au sud de la mer du Nord dans 7 zones géographiques différentes en 2017 et leur niveau d'AD évalué. Les résultats ont montré que bien que l'AD

soit toujours significativement différente de 0 pour cette espèce, les variations géographiques de son amplitude permettraient de distinguer les individus des côtes anglaises de ceux des côtes françaises. Les résultats combinés obtenus pour la bogue et la sole ont fait l'objet d'un chapitre de livre à paraître fin 2019 (Annexe 3 ; Mahé *et al.*, 2019b). Cette première analyse sur 2 espèces suggère que l'AD pourrait être utilisée pour l'identification de stocks chez les espèces présentant une AD significative, même si cette hypothèse mérite d'être approfondie.

Liste des Figures et Tableaux

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1 : ÉVOLUTION DE L'ÉTAT DES STOCKS DE POISSONS MARINS MONDIAUX DE 1975 A 2015 (EXPLOITE AU NIVEAU DURABLE MAXIMAL CORRESPOND A UN STOCK AU NIVEAU DU RMD; FAO, 2018). 15
- FIGURE 2 : APPLICATION DES DIFFERENTS MARQUEURS POUR LES ETUDES D'ASSIGNATION EN FONCTION DE LA DEFINITION DE STOCK CONSIDEREE ET POUR LES ETUDES DE CONNECTIVITE. LES CERCLES REPRESENTENT LES GROUPE ET LES FLECHES LES ECHANGES ENTRE CES GROUPE. 19
- FIGURE 3 : POSITIONNEMENT DES OTOLITHES (VIOLET : *SAGITTA* (SACCULAR OTOLITH : SOT); ROUGE : *LAPILLUS* (UTRICULAR OTOLITH : UOT) ; JAUNE : *ASTERICUS* (LAGENAR OTOLITH : LOT)) DANS L'OREILLE GAUCHE D'UN BLACK MOLLY A DIFFERENTES ECHELLES PAR RECONSTRUCTION TOMOGRAPHIQUE 3D. ORANGE : CERVEAU ; C : CRETES DES CANAUX AUDITIFS ; CE : CEREBELLUM ; DM : DORSALE MEDULLAIRE, HY : HYPOPHYSE (HY), H : HYPOTHALAMUS ET TO : COLLICULUS SUPERIEUR OU TECTUM OPTIQUE. LA BARRE D'ECHELLE EST DE 1 MM (*IN SCHULZ-MIRBACH ET AL., 2013*). 24
- FIGURE 4 : ILLUSTRATION DE L'OTOLITHE DANS LA CAVITE OTIQUE RELIE A LA MACULA PAR LA MEMBRANE OTOLITHIQUE (MODIFIE DE SCHULZ-MIRBACH *ET AL., 2019*). 25
- FIGURE 5 : NOMBRE D'ARTICLES SCIENTIFIQUES PARUS CHAQUE ANNEE SELON DIFFERENTS MOTS-CLES APRES AVOIR PREALABLEMENT SELECTIONNE LE MOT-CLE « OTOLITH » (SOURCE WEB OF SCIENCE). 27
- FIGURE 6 : SCHEMA PROPOSE POUR EXPLIQUER LA REGULATION DU DEPOT DE LA MATIERE ORGANIQUE AU COURS D'UNE JOURNEE. ON SUPPOSE QUE LA PHASE ORGANIQUE SE DEPOSE AU CREPUSCULE ALORS QUE LA MINERALISATION (CALCIFICATION) SE PRODUIRAIT A L'AUBE. À LA TOMBEE DE LA NUIT, L'OTOLIN-1 S'EXPRIME EN FORMANT DES RESEAUX STRUCTURAUX D'INTERACTIONS AVEC D'AUTRES PROTEINES. LA MATRICE ORGANIQUE CONTINUE A SE DEPOSER JUSQU'A L'AUBE, OU L'ACTION DU MMP 2 (MATRIX METALLOPROTEINASE 2) COUPE LES RESEAUX FORMES PAR L'OTOLIN-1 CE QUI ARRETE LES DEPOTS ORGANIQUES, ET PERMET LE DEBUT DE LA PRECIPITATION MINERALE. L'ACTIVATION DE LA MMP 2 SE FAIT PAR L'INTERMEDIAIRE D'UNE PROTEOLYSE EN CASCADE. AU CREPUSCULE, CES REACTIONS SONT INHIBEES PAR UNE NEUROSERPINE ET LES MMP 2 ENCORE ACTIVES SONT INHIBEES PAR L'ACTION

DE LA TIMP 2 (TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE 2). LES NIVEAUX DE MMP2 ET TIMP 2 PEUVENT ETRE AFFECTES PAR LE GENE « CLOCK » (IN THOMAS <i>ET AL.</i> , 2019).	29
FIGURE 7 : HETEROGENEITE SPATIALE DES COMPOSES IONIQUES ET ORGANIQUES DE L'ENDOLYMPHE PRESENTANT DES DIFFERENCES SIGNIFICATIVES ENTRE LES ZONES PROXIMALE ET DISTALE. LES VALEURS LES PLUS IMPORTANTES SONT EN ROUGE (DONNEES ALLEMAND <i>ET AL.</i> , 2007 ; FIGURE MODIFIEE DE SCHULZ-MIRBACH <i>ET AL.</i> , 2019).	31
FIGURE 8 : FACTEURS POTENTIELS POUVANT AFFECTER LA FORME DES OTOLITHES AUX DIFFERENTES ECHELLES POSSIBLES. LES FLECHES NOIRES INDIQUENT LA DIRECTION DES INTERACTIONS ENTRE EFFETS ET LES FLECHES ROUGES L'EFFET DES FACTEURS SUR LA FORME DE L'OTOLITHE.	32
FIGURE 9 : SOURCES DE VARIABILITE DE LA FORME DES OTOLITHES AU NIVEAU INTRA- ET INTER-STOCKS EN PRENANT EN COMPTE LES PROCESSUS DE REGULATION DEVELOPPEMENTALE. CES PROCESSUS QUI INTERVIENNENT TOUT AU LONG DE LA VIE DU POISSON, ONT DES EFFETS CONVERGENTS OU DIVERGENTS SUR LES SOURCES DE VARIABILITE GENETIQUE OU ENVIRONNEMENTALE.	37
FIGURE 10 : CATEGORIES D'ASYMETRIES BILATERALES : A) ASYMETRIE FLUCTUANTE (FA) REPRESENTEE PAR LA DEVIATION NON-DIRECTIONNELLE DE LA SYMETRIE PARFAITE LIMITEE PAR LES PROCESSUS DE STABILITE DEVELOPPEMENTALE ET DE STABILITE DEVELOPPEMENTALE; B) L'ASYMETRIE DIRECTIONNELLE (AD) OU PROCESSUS DE LATERALISATION SUR UN COTE ; C) L'ANTISYMETRIE OU PROCESSUS DE LATERALISATION SUR UN COTE QUI VARIE DE FAÇON ALEATOIRE ENTRE LES INDIVIDUS.	38
FIGURE 11 : NOMBRE D'ARTICLES SCIENTIFIQUES PARUS CHAQUE ANNEE SELON LE TYPE DE DONNEES EXTRAITES POUR ANALYSER LA FORME DE L'OTOLITHE EN AYANT PREALABLEMENT SELECTIONNE LES MOTS-CLES « OTOLITH » ET « SHAPE » (SOURCE WEB OF SCIENCE).	40
FIGURE 12 : SCHEMA DES DIFFERENTS TYPES DE DONNEES UNI ET MULTIVARIEES EXTRAITES POUR ANALYSER LA FORME DE L'OTOLITHE (N ETANT LE NOMBRE DE PUBLICATIONS PARUES DE 1985 A 2018).	40
FIGURE 13: PRESENTATION DE LA FORME GENERALE DES OTOLITHES EN FONCTION DE L'ESPECE ETUDIEE (BARRE D'ECHELLE REPRESENTE 1 MM).	51
FIGURE 14: AIRE DE REPARTITION DE CHAQUE ESPECE ETUDIEE DANS LE CADRE DE CETTE THESE AVEC LA ZONE COUVERTE PAR L'ETUDE D'IDENTIFICATION DE STOCKS REALISEE (FORME BLEUE) (SOURCE : FAO).	52

FIGURE 15: MAP OF LOCATION OF BLUE WHITING SAMPLES COLLECTED BETWEEN 2006 AND 2011. BLUE WHITING FEEDING AREAS ARE LOCATED IN THE NORWEGIAN SEA (IIA & IIB), THE CELTIC SEA (VIIG-J) AND THE BAY OF BISCAY (VIII A & B).	59
FIGURE 16: PHOTOGRAPH OF A WHOLE BLUE WHITING OTOLITH.	62
FIGURE 17: A) SCATTERPLOT OF OTOLITH PERIMETER AS A FUNCTION OF BODY LENGTH AND B) PREDICTED PERIMETER WITH 95% CONFIDENCE INTERVALS FOR BEST FITTING LINEAR MODEL FOR MALE AND FEMALE FISH WITH 28 AND 38 CM TOTAL LENGTH. NORTHERN ICES DIVISIONS ARE IN GREY.	66
FIGURE 18: AVERAGE INDIVIDUALS FROM THE TWO CLUSTERS IDENTIFIED BY HIERARCHICAL CLUSTER ANALYSIS USING WARD'S HIERARCHICAL ALGORITHM BASED ON THE SQUARED EUCLIDEAN DISTANCES FOR ALL BLUE WHITING (N=1693) ON THE FIRST 2 DIMENSIONS. THE DOTS WITH SAMPLE NUMBERS REPRESENT INDIVIDUALS.	71
FIGURE 19. MEAN OTOLITH OUTLINE SHAPES FORMED WITH REVERSE FOURIER TRANSFORM OF THE OUTLINE USING THE FIRST 34 HARMONICS SHOWING THE OVERLAP AND VARIATIONS BETWEEN TWO CLUSTERS (ARROWS SHOW THE DIVERGENCE AREAS).	72
FIGURE 20: MAP OF LOCATION OF SWORDFISH SAMPLES COLLECTED BETWEEN 2009 AND 2014 IN THE INDIAN OCEAN. THE RECTANGLES INDICATE SAMPLING AREAS (1: LA RÉUNION, 2: MOZAMBIQUE CHANNEL, 3: RODRIGUES, 4: SOUTH AFRICA, 5: MADAGASCAR SOUTH AND 6: SRI LANKA).	80
FIGURE 21: PHOTOGRAPH OF A WHOLE SWORDFISH SAGITTAL OTOLITH SHOWING TERMINOLOGY AND MEASUREMENTS TAKEN DURING THE STUDY.	82
FIGURE 22: MEAN OTOLITH OUTLINE SHAPES FORMED WITH REVERSE FOURIER TRANSFORM OF THE OUTLINE USING THE FIRST 39 HARMONICS, SHOWING THE OVERLAP AND VARIATIONS BETWEEN RIGHT (DOTTED LINE) AND LEFT (SOLID LINE) OTOLITH SHAPE OF SWORDFISH FROM THE INDIAN OCEAN (N = 91)	85
FIGURE 23: AVERAGE INDIVIDUALS (I.E. AVERAGE OTOLITH SHAPE FOR EACH GROUP OF INDIVIDUALS) FROM THE THREE CLUSTERS IDENTIFIED BY HIERARCHICAL CLUSTER ANALYSIS USING WARD'S HIERARCHICAL ALGORITHM BASED ON THE SQUARED EUCLIDEAN DISTANCES FOR ALL SWORDFISH (N = 391) ON THE FIRST TWO DIMENSIONS. THE DOTS WITH SAMPLE NUMBERS REPRESENT INDIVIDUALS	87
FIGURE 24 : DIAGRAMME DES 91 PUBLICATIONS PARUES DE 1993 A 2017 UTILISANT LA FORME DE L'OTOLITHE POUR DISCRIMINER LES STOCKS A PARTIR DES DESCRIPTEURS ELLIPTIQUES DE FOURIER CLASSEES SELON	

LE NIVEAU D'ASYMETRIE DIRECTIONNELLE ENTRE LES OTOLITHES DROIT ET GAUCHE (DONNEES WEB OF SCIENCE).	94
FIGURE 25: MAP OF SAMPLING LOCATIONS OF BOGUES (1: TENERIFE ISLAND; 2: GULF OF ORAN, 3: GULF OF BEJAIA, 4: GULF OF ANNABA, 5: GULF OF TUNIS, 6: GULF OF LIONS, 7: CORSICA ISLAND, 8: LIGURIAN SEA, 9: TYRRHENIAN SEA, 10: IONIAN SEA, 11: AEGEAN SEA).	100
FIGURE 26: A) DIRECTIONAL ASYMMETRY BETWEEN LEFT AND RIGHT OTOLITH SHAPE AT EACH SAMPLING LOCATION AS ESTIMATED BY THE INTERACTION BETWEEN SIDE AND SAMPLING LOCATION IN THE MULTIVARIATE MIXED-EFFECTS MODEL. BLACK DOTS AND GREY TRIANGLES REPRESENT THE ESTIMATOR FOR THE LEFT AND RIGHT OTOLITH, RESPECTIVELY, AND VERTICAL BARS ARE THERE 95% CONFIDENCE INTERVALS. PERCENTAGE GIVEN IN EACH PANEL IS THE AVERAGE PERCENTAGE OF NON-OVERLAPPING SURFACE BETWEEN THE TWO RECONSTRUCTED OTOLITH SHAPES AT THE INDIVIDUAL LEVEL. B) DIFFERENCE BETWEEN RIGHT (BLACK LINE) AND LEFT (GREY DOTTED LINE) OTOLITH SHAPE FOR EACH GEOGRAPHICAL LOCATION AS SHOWN BY AVERAGE SHAPE RECONSTRUCTION FOR EACH SAMPLING LOCATION BASED ON EFD'S. PERCENTAGES ARE THE AVERAGE PERCENTAGES OF NON-OVERLAPPING SURFACE BETWEEN THE TWO RECONSTRUCTED OTOLITH SHAPES AT THE INDIVIDUAL LEVEL (*<0.05).	106
FIGURE 27: DIFFERENCE AMONG AVERAGE RECONSTRUCTED OTOLITH SHAPES BETWEEN THE 3 IDENTIFIED STOCK UNITS: NORTHWESTERN MEDITERRANEAN SEA (SOLID LINE; FROM THE GULF OF LIONS TO THE TYRRHENIAN SEA), EASTERN MEDITERRANEAN SEA (DASHED LINE; FROM THE IONIAN SEA TO THE AEGEAN SEA) AND SOUTHWESTERN MEDITERRANEAN SEA AND ATLANTIC OCEAN (DOTTED LINE; FROM THE CANARY ISLANDS TO THE GULF OF TUNIS).	110
SUPPLEMENTARY APPENDIX FIGURE S1: DIRECTIONAL ASYMMETRY BETWEEN LEFT AND RIGHT OTOLITH SHAPE AT THE GLOBAL SCALE AS ESTIMATED BY THE SIDE EFFECT SI IN THE MULTIVARIATE MIXED-EFFECTS MODEL.	117
SUPPLEMENTARY APPENDIX FIGURE S2: AVERAGE ANNUAL SEA SURFACE TEMPERATURE (SST) OVER THE STUDIED AREA FROM 2013 TO 2016 (SEAWIFS SATELLITE DATA).	117
SUPPLEMENTARY APPENDIX FIGURE S3: AVERAGE ANNUAL CONCENTRATION OF CHLOROPHYLL-A (CHL-A) OVER THE STUDIED AREA FROM 2013 TO 2016 (SEAWIFS SATELLITE DATA).	118

- FIGURE 28: ACCUMULATION DES DEGRES-JOUR SITUES ENTRE LES SEUILS THERMIQUES (MINIMUM ET MAXIMUM) DE CROISSANCE. LA TOTALITE DES ZONES COLOREES REPRESENTE L'INTEGRATION D'ENERGIE DEDIEE A LA CROISSANCE EN °C. 122
- FIGURE 29: MAIN STEPS OF THE EXPERIMENTAL DESIGN FOR SEABASS WITH 5 SAMPLINGS AT 93, 129, 141, 176 AND 204 DPH. EACH GROUP (G) WAS COMPOSED OF 3 REPLICATES. TO TEST THE TEMPERATURE EFFECT, 15 °C (BLUE) AND 20 °C (RED) WERE USED AND FOR CONCENTRATIONS OF PUFA, 1.65 (DOTTED) AND 0.73 (STRIATED) WERE USED. 129
- FIGURE 30: DIFFERENCE BETWEEN LEFT (BLACK DOTTED LINE) AND RIGHT (GREY LINE) AVERAGE OTOLITH SHAPE. 136
- FIGURE 31: EVOLUTION OF OTOLITH NORMALIZED SHAPE DURING THE EXPERIMENT: D-93 (1410°C DAY; BLACK LINE), D-129 (2155°C DAY; 20°C; RED DASHED LINE), D-146 (2155°C DAY; 15°C; BLUE DASHED LINE), D-176 (3055°C DAY; 20°C; RED LINE) AND D-204 (3055°C DAY; 15°C; BLUE LINE). 140
- FIGURE 32: MAIN STEPS OF THE EXPERIMENTAL DESIGN FOR SEABASS WITH 4 SAMPLINGS AT 43 DPH (GDD=688°C.DAY), 72 DPH (GDD=1152°C.DAY), 86 DPH (GDD=1376°C.DAY), 100 DPH (GDD=1600°C.DAY) DURING THE EXPERIMENT. AT THE END (232 DPH), THERE WERE 4 CONDITIONS WITH A GDD DIFFERENT ACCORDING THE TRANSFER DATE FROM 16°C (BLUE) TO 21°C (RED). FOR EACH SAMPLING DATE AND CONDITION, THERE WERE 2 REPLICATES (CURVED ARROW AND FISH INDICATED THE SAMPLING FISH; WIDE ARROW INDICATED TRANSFER OF FISH). 158
- FIGURE 33: PERCENTAGE OF NON-OVERLAPPING SURFACE BETWEEN LEFT (RED LINE) AND RIGHT (BLACK LINE) OTOLITH SHAPE ACCORDING TO THE SAMPLING DATE (DPH) AND THE GDD VALUE (°C.DAY) (ARROWS IDENTIFIED THE MAIN AREAS OF DIFFERENCE BETWEEN BOTH OTOLITHS). SIZE DIMENSION PARAMETERS AND SHAPE INDICES OF OTOLITH USED TO DESCRIBE SEABASS OTOLITH OUTLINE ARE IDENTIFIED ACCORDING TO THE SAMPLING DATE AND THE GDD VALUE WHEN THE DIFFERENCE BETWEEN SIDE WAS SIGNIFICANT ($P < 0.05$). 162
- FIGURE 34: MEAN VALUE OF FISH TOTAL LENGTH (TL; MM) AND OTOLITH MORPHOMETRIC VARIABLES AT GROWING DEGREE DAY (GDD, °C.DAY) OF LARVAE AND JUVENILES OF SEABASS REARED AT 16°C AND 21°C (COLOR OF BOXPLOT INDICATED THE SAMPLING DATE). DIFFERENT UPPERCASE LETTERS INDICATE SIGNIFICANT DIFFERENCES ($P < 0.05$) BETWEEN VALUES OF GDD. 163

- FIGURE 35: COMPARISON OF OTOLITH NORMALIZED SHAPE AT THE END OF EXPERIMENT (232 DPH) FOR 4 CONDITIONS OF TEMPERATURE: C1 (3712°C.DAY, DARK BLUE LINE), C2 (3817°C.DAY, LIGHT BLUE LINE), C3 (3962°C.DAY, ORANGE LINE) AND C4 (4107°C.DAY, RED LINE). 165
- FIGURE 36: RESULTATS DE LA DISCRIMINATION GEOGRAPHIQUE DES STOCKS OBSERVES CHEZ 3 ESPECES ETUDIEES LORS DE CETTE THESE (ZONE COLOREE EN ROUGE REPRESENTA L'AIRE DE REPARTITION MONDIALE DE CHAQUE ESPECE DEFINIE PAR LA FAO). 178
- FIGURE 37 : NIVEAUX DE VARIABILITES A PRENDRE EN COMPTE LORS D'UNE ETUDE DE DISCRIMINATION DES STOCKS. 183
- FIGURE 38 : MORPHOGENESE DE L'OTOLITHE EN FONCTION DE LA VALEUR MESUREE DE GDD POUR 2 TEMPERATURES MOYENNES DE BASSIN. LA DIFFERENCE ENTRE CES 2 COURBES EST EXPLIQUEE PAR L'INTERACTION ENTRE LA VALEUR DE GDD ET LA TEMPERATURE MOYENNE DU BASSIN (GDD : °C). 193
- FIGURE 39 : INFLUENCE DES FACTEURS ENDOGENES ET EXOGENES SUR LA MORPHOGENESE DE L'OTOLITHE. LES 5 ETUDES DE LA THESE SONT REPRESENTEES DE E1 A E5 (FIGURE ADAPTEE A PARTIR DE FABLET *ET AL.*, 2011 ; IRGENS, 2018 ; SCHULZ-MIRBACH *ET AL.*, 2019). 196
- FIGURE 40 : SOURCES DE VARIABILITE ET PROCESSUS DE REGULATION DEVELOPPEMENTALE AGISSANT SUR LA MORPHOGENESE DE L'OTOLITHE AYANT POUR CONSEQUENCES DIFFERENTES TYPES D'ADAPTATIONS. 197
- FIGURE 41 : CATEGORIES OF ASYMMETRY : A) FLUCTUATING ASYMMETRY REPRESENTED BY MINOR NON-DIRECTIONAL DEVIATIONS FROM PERFECT SYMMETRY LIMITED BY CANALIZATION PROCESS ET THE RESULT OF DEVELOPMENTAL NOISE, B) DIRECTIONAL ASYMMETRY OR LATERALIZATION PROCESS FIXED ON THE SAME SIDE ET DEPENDS ON ITS GENOTYPE, ON THE INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL (BIOTIC ET ABIOTIC) FACTORS DURING ITS LIFE, C) ANTISYMMETRY OR LATERALIZATION PROCESS FIXED ON THE SIDE WHICH VARIES RETOMLY AMONG INDIVIDUALS 260
- FIGURE 42: MAP OF SAMPLING LOCATIONS BY SPECIES THE BOOPS BOOPS SAMPLINGS ARE B1: TENERIFE ISLET; B2: GULF OF ORAN, B3: GULF OF BEJAIA, B4: GULF OF ANNABA, B5: GULF OF TUNIS, B6: CORSICA ISLET, B7: GULF OF LION, B8: LIGURIAN SEA, B9: TYRRHENIAN SEA, B10: IONIAN SEA, B11: AEGEAN SEA. THE SOLEA SOLEA SAMPLINGS ARE S1: MONT SAINT MICHEL BAY, S2: BAY OF SEINE, S3: BAY OF SOMME, S4: FRENCH COAST OF THE NORTH SEA, S5: THAMES ESTUARY, S6: CENTRAL AREA OF THE EASTERN CHANNEL, S7: ENGLISH COAST OF THE EASTERN CHANNEL. 262

FIGURE 43: DIFFERENCE AMONG OTOLITH MEAN SHAPES FROM THE LEFT (GREY DOTTED LINE) AND THE RIGHT (BLACK LINE) OTOLITH (A: *S. SOLEA*; B: *B. BOOPS*). 267

FIGURE 44 : DIFFERENCE BETWEEN RIGHT (BLACK LINE) ET LEFT (GREY DOTTED LINE) OTOLITH SHAPE OF BOOPS BOOPS BY EACH GEOGRAPHICAL LOCATION WITH THE PERCENTAGE OF DIRECTIONAL ASYMMETRY (*: SIGNIFICANT ASYMMETRY). B1: TENERIFE ISLET; B2: GULF OF ORAN, B3: GULF OF BEJAIA, B4: GULF OF ANNABA, B5: GULF OF TUNIS, B6: CORSICA ISLET, B7: GULF OF LION, B8: LIGURIAN SEA, B9: TYRRHENIAN SEA, B10: IONIAN SEA, B11: AEGEAN SEA. 268

FIGURE 45: DIFFERENCE BETWEEN RIGHT (BLACK LINE) AND LEFT (GREY DOTTED LINE) OTOLITH SHAPE OF SOLEA SOLEA BY EACH GEOGRAPHICAL LOCATION WITH THE PERCENTAGE OF DIRECTIONAL ASYMMETRY (*: SIGNIFICANT ASYMMETRY). S1: MONT SAINT MICHEL BAY, S2: BAY OF SEINE, S3 : BAY OF SOMME, S4 : FRENCH COAST OF THE NORTH SEA, S5 : THAMES ESTUARY, S6: CENTRAL AREA OF THE EASTERN CHANNEL, S7: ENGLISH COAST OF THE EASTERN CHANNEL. 269

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : LISTE DES DIFFERENTS INDICES DE FORME AVEC LES FORMULES MATHEMATQUES CORRESPONDANTES BASEES SUR LES 4 PRINCIPALES MESURES MORPHOMETRIQUES DE L'OTOLITHE (OA : AIRE ; OP : PERIMETRE ; OW : LARGEUR DORSO-VENTRALE ET OL : LONGUEUR ANTERO-POSTERIEURE). 42

TABLE 2. NUMBER OF BLUE WHITING OTOLITH SAMPLES BY YEAR, SEX (M: MALES, F: FEMALES) AND ICES DIVISION. TOTAL LENGTH CHARACTERISTICS (MEAN±S.D.) ARE GIVEN IN PARENTHESES. 63

TABLE 3. ANALYSIS OF COVARIANCE FOR OTOLITH PERIMETER. INTERACTIONS BETWEEN FACTORS ARE NOTED BY A COLON (:) (DF -DEGREE OF FREEDOM; SS - SUM OF SQUARES; MS - MEAN SUM OF SQUARES). 67

TABLE 4. SUMMARY OF REDUNDANCY ANALYSIS (RDA) (N = 1693) OF BLUE WHITING OTOLITH SHAPES (DF - DEGREE OF FREEDOM). 68

TABLE 5. JACKKNIFED CORRECT CLASSIFICATION MATRIX OF THE LINEAR FUNCTION DISCRIMINANT ANALYSIS FOR MATURE BLUE WHITING (N=1693) BETWEEN SAMPLING ICES AREAS AND YEAR BASED ON THE FIRST NORMALIZED 34 HARMONICS. THE PERCENTAGES IN EACH ROW REPRESENT THE CLASSIFICATION INTO THE ICES SAMPLING DIVISIONS GIVEN IN COLUMNS (CORRECT CLASSIFICATION IN GREY SQUARE),

SAMPLE SIZES ARE GIVEN IN PARENTHESES. OVERALL CLASSIFICATION SUCCESS IS 28.41%, WILKS' $\Lambda =$ 0.354.	71
TABLE 6. JACKKNIFED CORRECT CLASSIFICATION MATRIX OF THE LINEAR FUNCTION DISCRIMINANT ANALYSIS FOR MATURE BLUE WHITING (N=1693) BANDWEEN SAMPLING ICES AREAS BASED ON THE FIRST NORMALIZED 34 HARMONICS. THE PERCENTAGES IN EACH ROW REPRESENT THE CLASSIFICATION INTO THE ICES SAMPLING DIVISIONS GIVEN IN COLUMNS (CORRECT CLASSIFICATION IN GREY SQUARE), SAMPLE SIZES ARE GIVEN IN PARENTHESES. OVERALL CLASSIFICATION SUCCESS IS 34.44%, WILKS' $\Lambda =$ 0.089.	70
TABLE 7: NUMBER OF SWORDFISH OTOLITH SAMPLES BY YEAR, SEX (NOT AVAILABLE FOR GUTTED FISH), SEASON (S1 = APRIL–JULY; S2 = SEPTEMBER–JANUARY) AND SAMPLING AREA. LJF = MEAN LOWER JAW FORK LENGTH	81
TABLE 8: JACKKNIFED CORRECT CLASSIFICATION MATRIX OF THE LDA FOR MATURE SWORDFISH (N = 391) BETWEEN SAMPLING AREAS BASED ON THE SELECTED PC MATRIX. THE PERCENTAGES IN EACH ROW REPRESENT THE CLASSIFICATION INTO THE SAMPLING AREA IN EACH COLUMN (THE CORRECT CLASSIFICATION IS IN THE SHADED SQUARES ON THE DIAGONAL). OVERALL CLASSIFICATION SUCCESS: 30%.	86
TABLE 9: CLASSIFICATION MATRIX OF THE HIERARCHICAL CLUSTERING ON PRINCIPAL COMPONENTS FOR MATURE SWORDFISH (N = 391) BETWEEN SAMPLING AREAS, BASED ON THE SELECTED PC MATRIX	87
TABLE 10: SAMPLING SCHEME. THE NUMBER OF SAMPLED INDIVIDUALS (NUMBER), THEIR TOTAL LENGTH (MEAN AND STANDARD DEVIATION) AND THE SAMPLING YEARS ARE GIVEN BY GEOGRAPHICAL AREA AND YEAR.	101
TABLE 11: RESULTS OF THE MULTIVARIATE MIXED-EFFECTS MODEL ON THE SHAPE MATRIX S. FOR EACH EXPLANATORY VARIABLE, THE X^2 STATISTIC, THE ASSOCIATED DEGREES OF FREEDOM (DF) AND THE RESULTING P-VALUE (P) FOR A TYPE II TEST ARE GIVEN. *<0.05; **<0.01, ***<0.001.	105
TABLE 12 : JACKKNIFED CORRECT CLASSIFICATION MATRIX OF THE LINEAR DISCRIMINANT ANALYSIS FOR LEFT OTOLITHS (N =560) BETWEEN THE 11 SAMPLING AREAS BASED ON THE RESIDUAL SHAPE MATRIX RSL. THE NUMBER IN EACH CELL REPRESENTS THE NUMBER OF INDIVIDUALS OF THE AREA OF ORIGIN	

CORRESPONDING TO THE CELL ROW CLASSIFIED INTO THE PREDICTED AREA CORRESPONDING TO THE CELL COLUMN.	107
TABLE 13 : JACKKNIFED CORRECT CLASSIFICATION MATRIX OF THE LINEAR DISCRIMINANT ANALYSIS FOR RIGHT OTOLITHS ($N = 560$) BETWEEN THE 11 SAMPLING AREAS BASED ON THE RESIDUAL SHAPE MATRIX RSR. THE NUMBER IN EACH CELL REPRESENTS THE NUMBER OF INDIVIDUALS OF THE AREA OF ORIGIN CORRESPONDING TO THE CELL ROW CLASSIFIED INTO THE PREDICTED AREA CORRESPONDING TO THE CELL COLUMN.	108
TABLE 14 : CLASSIFICATION MATRIX RESULTING FROM HIERARCHICAL CLUSTERING ON THE RESIDUAL SHAPE MATRIX FOR LEFT OTOLITHS RSL AND RIGHT OTOLITHS RSR ($N = 560$) BETWEEN THE 11 SAMPLING AREAS. FOR EACH AREA, THE CLUSTER GATHERING THE HIGHEST NUMBER OF INDIVIDUALS IS HIGHLIGHTED BY A SHADED CELL.	109
SUPPLEMENTARY APPENDIX TABLE S1: AVERAGE WIDTH/LENGTH RATIO FOR THE LEFT AND RIGHT OTOLITHS AT EACH SAMPLING LOCATION.	118
SUPPLEMENTARY APPENDIX TABLE S2 : JACKKNIFED CORRECT CLASSIFICATION MATRIX OF THE LDA FOR LEFT AND RIGHT OTOLITHS TOGETHER ($N = 560$) BETWEEN THE 11 SAMPLING LOCATIONS BASED ON THE RESIDUAL SHAPE MATRIX RS. THE NUMBER IN EACH CELL REPRESENTS THE NUMBER OF INDIVIDUALS OF THE AREA OF ORIGIN CORRESPONDING TO THE CELL ROW CLASSIFIED INTO THE PREDICTED AREA CORRESPONDING TO THE CELL COLUMN. THE CORRECT CLASSIFICATION CELLS ARE THUS ON THE MAIN DIAGONAL (SHADED). OVERALL CLASSIFICATION SUCCESS: 39.1% (WILKS' LAMBDA= 0.177, $P < 0.001$).	119
SUPPLEMENTARY APPENDIX TABLE S3: CLASSIFICATION MATRIX RESULTING FROM HIERARCHICAL CLUSTERING ON THE RESIDUAL SHAPE MATRIX FOR LEFT OTOLITHS RS ($N = 560$) BETWEEN THE 11 SAMPLING AREAS. FOR EACH AREA, THE CLUSTER GATHERING THE HIGHEST NUMBER OF INDIVIDUALS IS HIGHLIGHTED BY A SHADED CELL.	119
TABLE 15 : STATISTICAL TESTING OF DIRECTIONAL BILATERAL ASYMMETRY IN OTOLITH SIZE AND SHAPE. P-VALUES OBTAINED IN THE MIXED-EFFECTS MODELS (1) FOR THE EFFECTS OF INNER HEAD SIDE EFFECT (SI) AND THEIR INTERACTIONS WITH GROWING DEGREE DAYS (GDD) AND FOOD COMPOSITION (PUFA) (BONFERRONI CORRECTED P-VALUES FOR MULTIPLE COMPARISONS: P-VALUES < 0.0045 : GREY CASES).	135

TABLE 16: AKAIKE'S INFORMATION CRITERION VALUES FOR THE 4 ALTERNATIVE MIXED-EFFECTS MODELS (COLUMNS) FITTED TO THE DIFFERENT RESPONSE VARIABLES (LINES) DESCRIBING FISH TOTAL LENGTH (TL) AND OTOLITH MORPHOLOGY (SIZE PARAMETERS, SHAPE INDICES AND MATRIX S).	137
TABLE 17: RESULTS OF MIXED-EFFECTS MODELS TESTING FOR THE EFFECTS OF FOOD COMPOSITION (PUFA, 0.73%/1.65%), EXPERIMENTAL TEMPERATURE (T, 15°C/20°C), GROWING DEGREE DAY (GDD), AND THEIR INTERACTION FOR EACH RESPONSE VARIABLE (ADJUSTED P-VALUES FOR MULTIPLE COMPARISONS: P-VALUES < 0.0045: **).	138
TABLE 18: AVERAGE PERCENTAGE OF NON-OVERLAPPING SURFACE BETWEEN RECONSTRUCTED AVERAGE OTOLITH SHAPES FOR PAIRS OF REARING CONDITIONS (**: P-VALUE<0.05).	141
TABLE S1: SIZE DIMENSION PARAMETERS AND SHAPE INDICES OF OTOLITH USED TO DESCRIBE SEABASS OTOLITH OUTLINE.	148
TABLE S2: RESULTS OF MIXED-EFFECTS MODELS TESTING FOR THE EFFECTS OF FOOD COMPOSITION (PUFA, 0.73%/1.65%), EXPERIMENTAL TEMPERATURE (T, 15°C/20°C), GROWING DEGREE DAY (GDD), AND THEIR INTERACTION FOR EACH SIGNIFICANT PRINCIPAL COMPONENTS FROM EFDS (P-VALUE<0.05: GREY CASE).	149
TABLE S3: RESULTS OF MIXED-EFFECTS MODELS TESTING FOR THE EFFECTS OF FOOD COMPOSITION (PUFA, 0.73%/1.65%), EXPERIMENTAL TEMPERATURE (T, 15°C/20°C), GROWING DEGREE DAY (GDD), AND THEIR INTERACTION FOR PCS ACCORDING TO VALUE OF TTH (°C) (ADJUSTED P-VALUES FOR MULTIPLE COMPARISONS: P-VALUES < 0.0045: **).	150
TABLE S4 : SCATTER MATRIX OF MAIN OTOLITH SIZE DESCRIPTORS.	151
TABLE 19: AVERAGE PERCENTAGE OF NON-OVERLAPPING SURFACE BETWEEN THE TWO RECONSTRUCTED OTOLITH SHAPES AT THE GDD LEVEL.	164
TABLE 20: SELECTED MODEL AND EFFECT OF GDD IN EACH MODEL BY FISH TOTAL LENGTH (TL) AND USED OTOLITH MORPHOMETRIC VARIABLES.	166
TABLE S1: FISH NUMBER SAMPLED BY GDD VALUE AND DAYS NUMBER AT 16°C AND 21°C. TOTAL LENGTH CHARACTERISTICS (MEAN ± SD) ARE GIVEN FOR EACH SAMPLE.	171
TABLE S2: SIZE DIMENSION PARAMETERS AND SHAPE INDICES OF OTOLITH USED TO DESCRIBE SEABASS OTOLITH OUTLINE.	172

TABLE S3: RATIO BETWEEN AVERAGE PERCENTAGES OF NON-OVERLAPPING SURFACE BETWEEN THE TWO RECONSTRUCTED OTOLITH SHAPES AT THE DIFFERENT LEVELS OF GDD AND THE DIFFERENCE OF DEGREE.DAYS. 172

TABLE 21: FISH NUMBER SAMPLED BY SPECIES AND GEOGRAPHICAL AREA. TOTAL LENGTH CHARACTERISTICS (MEAN \pm SD) ARE GIVEN FOR EACH SAMPLE. 263

Liste des Acronymes et abréviations

A	Antisymétrie
AD/ DA	Asymétrie Directionnelle/Directional Asymmetry
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AF/FA	Asymétrie Fluctuante/Fluctuating Asymmetry
AR	Ratio d'Aspect
C	Circularité
CEA	Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
CFD	Complex Fourier Descriptors
CIEM/ICES	Conseil International pour l'Exploration de la Mer/International Council For the Exploration of the Sea
DHA	DocosaHexaenoic Acid
E	Ellipticité
EFA	Analyse des Ellipses de Fourier
EFDs	Descripteurs des Ellipses de Fourier
EPA	EicosaPentaenoic Acid
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations

Liste des Acronymes et abréviations

FF	Facteur de Forme
FFT	Fast Fourier Transform
GDD	Growing Degree Days
GIEC/IPCC	Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat/Intergovernmental Panel on Climate Change
H	Elliptical Fourier Harmonics
IOTC	Indian Ocean Tuna Commission
JPF/DPH	Jours Post-Fertilisation/Days Post Hatching
LDA	Linear Discriminant Analysis
LJF	Lower Jaw Fork Length
n-3AGPI/n-3 PUFA	Acides Gras PolyInsaturés oméga-3/ omega-3 PolyUnsaturated Fatty Acids
OA	Aire de l'otolithe
OL	Longueur antéro-postérieure de l'otolithe
OP	Périmètre de l'otolithe
OW	Largeur dorso-ventrale de l'otolithe
PC	significant Principal Components
PCA	Principal Components Analysis

Liste des Acronymes et abréviations

PF	Power of Fourier
pRDA	Partial Redundancy analyses
R	Rectangularité
RD	Rondeur
RMD/MSY	Maximum Sustainable Yield/Rendement Maximum durable
RDA	Redundancy analyses
SIMWG	Stock Identification Methods Working Group
SNPs	Single Nucleotide Polymorphism
SST	Sea Surface Temperature
SWIO	South-West Indian Ocean
TNPC	Traitement Numérique des Pièces Calcifiées

References

- Ackman, R.G., Tocher, C.S. 1968. Marine phytoplankter fatty acids. *J. Fish. Res. Board. Can.* 25, 1603-1620.
- Adams, D.C., Rohlf, F.J., Slice, D.E. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution.' *Ital J Zool* 71: 5-16.
- Adams, G.D., Leaf, R.T., Ballenger, J.C., Arnott, S.A., McDonough, C.J. 2018. Spatial variability in the growth of Sheepshead (*Archosargus probatocephalus*) in the Southeast US: Implications for assessment and management. *Fisheries Research* 206: 35-43.
- Agüera, A., Brophy, D. 2011. Use of sagittal otolith shape analysis to discriminate Northeast Atlantic and Western Mediterranean stocks of Atlantic saury, *Scorpaenopsis scorpaenoides* (Walbaum). *Fisheries Research* 110: 465-471.
- Alami-Durante, H., Rouel, M., Kentouri, M. 2006. New insights into temperature-induced white muscle growth plasticity during *Dicentrarchus labrax* early life: a developmental and allometric study. *Mar. Biol.*, 149: 1551-1565.
- Alhossaini, M., Liu, Q., Pitcher, T.J. 1989. Otolith microstructures indicating growth and mortality among plaice, *Pleuronectes platessa* L., post-larval sub-cohorts. *Journal of Fish Biology*, 35(supplement A) : 81-90.
- Allemand, D., Mayer-Gostan, N., de Pontual, H., Boeuf, G., Payan, P. 2007. Fish otolith calcification in relation to endolymph chemistry. *In* *Hetbook of Biomineralization*. Vol. 1: Biological aspects and structure formation. Baeuerlein, E. (Eds.) Wiley-VCH, Weinheim. pp. 291-308.
- Allen, M. R. Shine, K. P. Fuglestedt, J. S. Millar, R. J. Cain, M. Frame, D. J. Macey, A. H. 2018. A solution to the misrepresentations of CO₂-equivalent emissions of short-lived climate pollutants under ambitious mitigation, *npj Clim. Atmos. Sci.* 1 (1). doi:10.1038/s41612-018-0026-8.
- Ambrose, J.Jr., Sass, S.L., Davis, M.F. 1993. Early growth, behaviour and otolith development of the winter flounder *Pleuronectes americanus*. *U.S. Fishery Bulletin*, 91: 65-75.
- Ambrose, S.H. 2001. Paleolithic technology and human evolution. *Science*, 291: 1748-1753.
- Anken, R., Kappel, T., Rahmann, H. 1998. Morphometry of fish inner ear otoliths after Development at 3g hypergravity. *Acta Oto-Laryngologica*, 118: 534-539.
- Archambault, B., Rivot, E., Savina, M., Le Pape, O. 2018. Using a spatially structured life cycle model to assess the influence of multiple stressors on an exploited coastal-nursery-dependent population. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 201: 95-104.
- Arrizabalaga, H., Arregui, I., Medina, A., Rodríguez-Ezpeleta, N., Fromentin, J.M., Fraile, I. 2018. Life history and migrations of Mediterranean bluefin tuna. *The Future of Bluefin*

- Tunas. Ecology, Fisheries Management, and Conservation Publisher: Johns Hopkins University Press.
- Auerbach, B.M., Ruff, C.B. 2006. Limb bone bilateral asymmetry: variability and commonality among modern humans. *J Hum Evol*, 50: 203-218.
- Auguie, B., Antonov, A. 2017. Package 'gridExtra' Available at <https://cran.r-project.org/web/packages/gridExtra/gridExtra.pdf> (2017)
- Bailey, R.S. 1982. The population biology of blue whiting in the North Atlantic. *Mar. Biol.* 19: 257-355.
- Bao, B., Ke, Z., Xing, J., Peatman, E., Liu, Z., Xie, C., Xu, B., Gai, J., Gong, X., Yang, G., Jiang, Y., Tang, W., et Ren, D. 2011. Proliferating cells in suborbital tissue drive eye migration in flatfish. *Developmental Biology*, 351: 200-207.
- Barnabé, G. 1991. Grossissement des poissons en élevage intensif, *In*: Barnabé, G., (Eds.), Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture. Lavoisier-Tec & Doc, Paris, pp. 422-451.
- Barrios, A., Ernande, B., Mahe, K., Trenkel, V., Rochet, M.-J. 2017. Utility of mixed effects models to inform the stock structure of whiting in the Northeast Atlantic Ocean. *Fisheries Research*, 190: 132-139.
- Barrow, J., Ford, J., Day, R., Morrongiello, J., 2017. Environmental drivers of growth and predicted effects of climate change on a commercially important fish, *Platycephalus laevigatus*. *Marine Ecology Progress Series*, 598: 201-212.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. 2011 lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999375-42. See <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Beamish, R.J. 1979. New information on the longevity of Pacific ocean perch (*Sebastes alutus*). *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, 36: 1395-1400.
- Begg, G., Overholtz, W., Munroe, N. 2001. The use of internal otolith morphometrics for identification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) stocks on George Bank. *Fish. Bull.*, 99: 1-14.
- Begg, G.A., Brown, R.W. 2000. Stock identification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) on Georges Bank based on otolith shape analysis. *Trans. Am. Fish. Soc.* 129: 935-945.
- Begg, G.A., Keenan, C.P., Sellin, M.J., 1998. Genetic variation and stock structure of school mackerel and spotted mackerel in northern Australian waters. *J. Fish. Biol.*, 52: 543-559.
- Behan-Martin, M.K., Jones, G.R., Bowler, K., Cossins, A.R. 1993. A near perfect temperature adaptation of bilayer order in vertebrate brain membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1151: 216-222.
- Beier, M., Anken, R., Rahmann, H. 2002. Susceptibility to abnormal (kinetotic) swimming in fish correlates with inner ear carbonic anhydrase-reactivity. *Neuroscience Letter*, 335: 17-20.

- Bell, J.G., Ashton, I., Secombes, C.J., Weitzel, B.R., Dick, J.R., Sargent, J.R. 1996. Dietary lipid affects phospholipid fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Prostaglandin Leukot. Essent. Fat. Acids, 54: 173-182.
- Bell, M.V., Dick, J.R., 1991. Molecular species composition of the major diacyl glycerophospholipids from muscle, liver, retina and brain of cod (*Gadus morhua*). Lipids. 26: 565-573.
- Benítez-Santana, T., Masuda, R., Juárez Carrillo, E., Ganuza, E., Valencia, A., Hernández-Cruz, C.M., Izquierdo Dietary, M.S. 2007. n-3 HUFA deficiency induces a reduced visual response in gilthead sea bream *Sparus aurata* larvae Aquaculture, 264: 408-417.
- Benzinou, A., Carbini, S., Nasreddine, K., Elleboode, R., Mahé, K. 2013. Discriminating stocks of striped red mullet (*Mullus surmuletus*) in the Northwest European seas using three automatic shape classification methods. Fisheries Research, 143: 153-160.
- Berghahn, R., Karakiri, M. 1990. Experimental induction of biological tags in otoliths of 0-group plaice *Pleuronectes platessa* by starvation, temperature, and UV-B radiation. Marine Ecology Progress Series, 67: 227-233.
- Bergstedt, R.A., Eshenroder, R.L., Bowen, C.I., Seelye, J.G., Locke, J.C. 1990. Mass-marking of otoliths of lake trout sac fry by temperature manipulation. American Fisheries Society Symposium, 7: 216-223.
- Beveridge, M.C.M., Thilsted, S.H., Phillips, M.J., Metian, M., Troell, M., Hall, S.J. 2013. Meeting the food and nutrition needs of the poor: the role of fish and the opportunities and challenges emerging from the rise of aquaculture. Journal of Fish Biology, 83: 1067-1084. doi:10.1111/jfb.12187.
- Bird, J.L., Eppler, D.T., Checkley, D.M. 1986. Comparisons of herring otoliths using Fourier series shape analysis. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 43: 1228-1234.
- Bivet, R.S., Pebesma, E., Gomez-Rubio, V. 2013. Applied spatial data analysis with R, Second edition. Springer, New York. 405 p.
- Boehlert, G.W. 1985. Using objective criteria and multiple regression models for age determination in fishes. Fishery Bulletin, 83: 103-117.
- Bolles, K.L., Begg, G.A. 2000. Distinction between silver hake (*Merluccius bilinearis*) stocks in U.S. waters of the northwest Atlantic using whole otolith morphometric. Fishery Bulletin, 98: 451-462.
- Bonhomme, R. 2000. Bases and limits to using 'degree.day' units. Eur. J. Agron. 13(1): 1-10.
- Bonhomme, V., Picq, S., Gaucherel, C., Claude, J. 2014. Momocs: Outline Analysis Using R. Journal of Statistical Software. 56 (13).
- Booke, H.E. 1981. The conundrum of the stock concept - are nature and nurture definable in fishery science? Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 38: 1479-80.
- Bookstein, F.L. 1991. Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. Cambridge University Press, 435 p.

- Bookstein, F.L. 1997. Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Medical Image Analysis*, 1: 97-118.
- Borcard, D., Gillet, F., Legendre, P. 2011. *Numerical Ecology with R*. Springer, New York,
- Borelli, G., Guibbolini, M.E., Mayer-Gostan, N., Priouzeau, F., de Pontual, H., Alletmet, D., Puverel, S., Tambutte, E., Payan, P. 2003a. Daily variations of endolymph composition: relationship with the otolith calcification process in trout. *J Exp Biol*, 206: 2685-2692.
- Borelli, G., Mayer-Gostan, N., de Pontual, H., Boeuf, G., Payan, P. 2001. Biochemical Relationships between Endolymph and Otolith Matrix in the Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Turbot (*Psetta maxima*). *Calcif Tissue Int*, 69: 356-364.
- Borelli, G., Mayer-Gostan, N., Merle, P.L., de Pontual, H., Boeuf, G., Alletmet, D., Payan, P. 2003b. Composition of Biomineral Organic Matrices with Special Emphasis on Turbot (*Psetta maxima*) Otolith et Endolymph. *Calcif. Tissue. Int.*, 72: 717-725.
- Bostanci, D., Yilmaz, M., Yedier, S., Kurucu, G., Kontas, S., Darçin, M., Polat, N. 2016. Sagittal otolith morphology of sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* (Walbaum, 1792) in the Aegean sea. *Int. J. Morphol.*, 34(2): 484-488.
- Bradman, H.M., Grewe, P.M., Appleton, B. 2011. Direct comparison of mitochondrial markers for the analysis of swordfish stock structure. *Fisheries Research*, 10: 95-99.
- Brett, J.R. 1979. Environmental factors and growth. *In: Hoar WS, Retal DJ, Brett JR (Eds.), Fish physiology, Vol. 8*. London: Academic Press. pp. 599-675.
- Brett, J.R., Groves, T.D.D. 1979. Physiological energetics. *In: Hoar, W.S., Retail, D.J., Brett, J.R. (Eds.), Fish Physiology. Bioenergetics and Growth, volume 8*. Academic Press, New York, pp. 279-352.
- Brett, M.T., Muller-Navarra, D.C. 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic food web processes. *Freshwater Biol.*, 38: 483-499.
- Bretts, T.F. 1967. Heat effects on protein and enzymes, *In: A.E. Rose (Eds.) Thermobiology*. Academic Press, London and New York. pp 25-72.
- Brewster, B. 1987. Eye migration and cranial development during flatfish metamorphosis: a reappraisal (Teleostei: Pleuronectiformes). *J. Fish Biol.*, 31: 805-833.
- Brill RW. 1994. A review of temperature and oxygen tolerance studies of tunas pertinent to fisheries oceanography, movement models and stock assessments. *Fisheries Oceanography*, 3: 204-216.
- Brophy, D., Haynes, P., Arrizabalaga, H., Fraile, I., Fromentin, J. Marc, Garibaldi, F., Katavic, I., Tinti, F., Karakulak, F. Saadet, Macías, D., Busawon, D., Hanke, A., Kimoto, A., Sakai, O., Deguara, S., Abid, N., Santos, M.N. 2016. Otolith shape variation provides a marker of stock origin for north Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Marine & freshwater research*, 67: 1023-1036.

- Brophy, D., King, P.A. 2007. Larval otolith growth histories show evidence of stock structure in Northeast Atlantic blue whiting (*Micromesistius poutassou*). ICES Journal of Marine Science, 64: 1136-1144.
- Brown, A.L., Busby, M.S., Mier, K.L., 2001. Walleye pollock *Theragra chalcogramma* during transformation from the larval to juvenile stage: otolith and osteological development. Mar. Biol., 139: 845-851.
- Buonaccorsi, V.P., Reece, K.S., Morgan, L.W., Graves, J.E. 1999. Geographic distribution of molecular variance within the blue marlin (*Makaira nigricans*): A hierarchical analysis of allozyme, single-copy nuclear DNA, and mitochondrial DNA markers. Evolution, 53: 568-579.
- Cadrin, S.X. 2020. Defining spatial structure for fishery stock assessment, Fisheries Research, 221. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2019.105397>
- Cadrin, S.X., Dickey-Collas, M. 2015. Stock assessment methods for sustainable fisheries, ICES Journal of Marine Science, 72(1): 1-6.
- Cadrin, S.X., Friedland, K.D. 1999. The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification. Fisheries Research, 43: 129-139.
- Cadrin, S.X., Friedland, K.D., Waldman, J.R. 2005. Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Cadrin, S.X., Kerr, L.A., Mariani, S. 2014. Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science, second edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Caldeira, K., Wickett, M.E. 2003. Anthropogenic carbon and ocean pH. Nature. 425, 365.
- Campana, S.E. 1999. Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. Marine Ecology Progress Series, 188: 263-297.
- Campana, S.E., Casselman, J.M. 1993. Stock discrimination using otolith shape analysis. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 50: 1062-1083.
- Campana, S.E., Thorrold, S.R. 2001. Otoliths, increments, and elements: keys to a comprehensive understating of fish populations? Can. J. Fish. Aquat. Sci., 58: 30-38.
- Cañas, L., Stransky, C., Schlickeisen, J., Sampedro, M.P., Fariña, A.C. 2012. Use of the otolith shape analysis in stock identification of anglerfish (*Lophius piscatorius*) in the Northeast Atlantic. ICES J Mar Sci J Cons, 69: 250-256
- Capoccioni, F., Costa, C., Aguzzi, J., Menesatti, P., Lombarte, A., Ciccotti, E. 2011. Ontogenetic and environmental effects on otolith shape variability in three Mediterranean European eel (*Anguilla anguilla*, L.) populations. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 397: 1-7.
- Capuzzo, E., Lynam, C.P., Barry, J., Stephens, D., Forster, R.M., Greenwood, N., McQuatters-Gollop, A., Silva, T., van Leeuwen, S.M., Engelhard, G.H. 2018. A decline in primary production in the North Sea over 25 years, associated with reductions in zooplankton abundance and fish stock recruitment. Glob. Change Biol., 24: 352-364.

- Cardinale, M., Doerin-Arjes, P., Kastowsky, M., Mosegaard, H. 2004. Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61: 158-167.
- Carey, F.G. 1990. Further acoustic telemetry observations of swordfish. *In*: Stroud RH (Eds.), *Planning the future of billfishes, research and management in the 90s and beyond. Proceedings of the Second International Billfish Symposium (Part 2), 1–5 August 1988, Kailua-Kona, Hawaii*. Savannah, Georgia: National Coalition for Marine Conservation. pp 103-122.
- Carlström, D. 1963. A Crystallographic Study of Vertebrate Otoliths. *Biol Bull*, 125: 441-463.
- Carpentier, A., Coppin, F., Curet, L., Dauvin, J.-C., Delavenne, J., Dewarumez, J.-M., Dupuis, L., Foveau, A., Garcia, C., Gardel, L., Harrop, S., Just, R., Koubbi, P., Lauria, V., Martin, C., Meaden, G., Morin, J., Ota, Y., Rostiaux, E., Smith, B., Spilmont, N., Vaz, S., Villanueva, C.-M., Verin, Y., Walton, J., Warembourg, C. 2009. Atlas des Habitats des Ressources Marines de la Manche Orientale - CHARM II / Channel Habitat Atlas for marine Resource Management - CHARM II. Programme Interreg 3A.
- Carvalho, G.R., Bembo, D.G., Carone, A., Giesbrecht, G., Cingolani, N., Pitcher, T.J. 1994. Stock discrimination in relation to the assessment of Adriatic anchovy and sardine fisheries, Final Project Report to the Commission of the European Communities, EC XIV-1/MED/91001/A.
- Carvalho, G.R., Hauser, L., 1995. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *In* : *Molecular genetics in fisheries*. G.R. Cavalho, T.J. Pitcher (Eds.). Chapman and Hall: Melbourne. pp 55-80.
- Casselman, J.M. 1987. Determination of age and growth, *In*: Weatherley, A.H., Gill, H.S. (Eds.), *The Biology of Fish Growth*. Academic Press, New York, pp. 209-242.
- Castonguay, M., Simard, P., Gagnon, P. 1991. Usefulness of Fourier analysis of otolith shape for Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) stock discrimination. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48: 296-302.
- Catalan, I.A., Macias, D., Sole, J., Ospina-Alvarez, A., Ruiz, J. 2013. Stay off the motorway: resolving the pre-recruitment life history dynamics of the European anchovy in the SW Mediterranean through a spatially explicit individual-based model (SEIBM). *Progress in Oceanography*, 111: 140-153.
- Chang, M.Y., Geffen, A.J. 2013. Taxonomic et geographic influences on fish otolith microchemistry. *Fish Fish*, 14: 458-492.
- Charnov, E.L., Gillooly, J.F. 2003. Thermal time: body size, food quality and the 10°C rule. *Evol. Ecol. Res.*, 5(1) : 43-51.
- Chatain, B. 1994. Estimation et amélioration des performances zootechniques de l'élevage larvaire de *Dicentrarchus labrax* et de *Sparus auratus*, PhD Thesis, Université d'Aix-Marseille II, pp. 199.
- Claridge, P.N., Potter, I.C. 1983. Movements, abundance, age composition and growth of

- bass, *Dicentrarchus labrax*, in the Severn Estuary and inner Bristol Channel. *J Mar Biol Assoc UK*, 63(4): 871-879.
- Clarke, A., Johnston, N.M. 1999. Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *J. Anim. Ecol.*, 68: 893-905.
- Clarke, L.M., Friedland, K.D. 2004. Influence of growth et temperature on strontium deposition in the otoliths of Atlantic salmon. *J Fish Biol*, 65: 744-759.
- Compagnucci, C., Fish, J., Depew, M.J. 2014. Left-right asymmetry of the gnathostome skull: its evolutionary, developmental, and functional aspects. *Genesis*; 52(6): 515-527.
- Cousin, X., Daouk, T., Péan, S., Lyphout, L., Schwartz, M.-E., Bégout, M.-L. 2012. Electronic individual identification of zebrafish using radio frequency identification (RFID) microtags. *J. Exp. Biol.*, 215: 2729-2734.
- Critchley, M., Henson, R.A. 2014, *Music and the Brain: Studies in the Neurology of Music*, 2014, Butterworth-Heinemann Medical Books, 476p.
- Cruz, A., Lombarte, A. 2004. Otolith size and their relationship with colour pattern and sound production. *Journal of Fish Biology*, 65: 1512-1525.
- Curtis, T.H., Metzger, G., Fischer, C., McBride, B., McCallister, M., Winn, L.J., Quinlan, J., Ajemian, M.J. 2018. First insights into the movements of young-of-the-year white sharks (*Carcharodon carcharias*) in the western North Atlantic Ocean. *Sci. Rep.*, 8(1): 10794.
- Cushing, D.H. 1990. Plankton production and year-class strength in fish populations: an update of the match/mismatch hypothesis. *In: Advances in Marine Biology*, J.H.S. Blaxter, A.J. Southward (Eds.). Academic Press. pp. 249-293.
- Daget, J., Le Guen, J.C. 1975. Dynamique des populations exploitées de poisson et Problèmes d'écologie : La démographie des populations de vertébrés. La motte et Bourlière, Masson, Paris, 395-443.
- De Martini, E., Uchiyama, J., Humphreys, R.J., Sampaga, J., Williams, H. 2007. Age and growth of swordfish (*Xiphias gladius*), caught by the Hawaii-based pelagic longline fishery. *Fishery Bulletin*, 105: 356-367.
- de Pontual, H., Jolivet, A., Bertignac, M., Fablet, R. 2012. Diel vertical migration of European hake *Merluccius merluccius* et associated temperature histories: insights from a pilot data-storage tagging (DST) experiment. *J. Fish Biol.*, 81: 728-734.
- de Pontual, H., Prouzet, P. 1987. Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) stock discrimination by scale shape analysis. *Aquaculture and Fisheries Management*, 18: 227-289.
- de Pontual, H., Tabouret, H., Mahé, K., Le Luherne, E., Daverat, F., Pecheyran, C. 2019. Asymmetry of otolith chemical composition from 2D mapping: relationship with biomineralisation mechanisms and implications for microchemistry analyses, 5th International Sclerochronology Conference, 16-20th June 2019 Split, Croatia

- De Vries, D.A., Churchill, B.G., Prager, M.H. 2002. Using otolith shape analysis to distinguish eastern Gulf of Mexico and Atlantic ocean stocks of king mackerel. *Fish. Res.*, 57: 51-62.
- Dean, J.M. 1992. Proceedings of the first international symposium on flatfish ecology. Part 2. Summary report workshop: 'ageing'. *Netherlands Journal of Sea Research*, 29: 279-280.
- Debat, V., David, P. 2001. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends Ecol. Evol.*, 16: 555-561.
- Debat, V., Debelle, A., Dworkin, I. 2009. Plasticity, canalization, and developmental stability of the *Drosophila* wing: joint effects of mutations and developmental temperature. *Evolution* 63: 2864-2876.
- Debat, V., Milton, C.C., Rutherford, S., Klingenberg, C.P., Hoffmann, A.A. 2006. HSP90 and the quantitative variation of wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 60: 2529-2538.
- Degens, E.T., Deuser, W.G., Haedrich, R.L. 1969. Molecular structure and composition of fish otoliths. *Mar. Biol.*, 2: 105-113.
- Delerue-Ricard, S., Stynen, H., Barbut, L., Morat, F., Mahé, K., Hablützel, P.I., Hostens, K., Volckaert, F.A.M. 2018. Size-effect, asymmetry, and small-scale spatial variation in otolith shape of juvenile sole in the Southern North Sea. *Hydrobiologia First Online*: 1-14.
- Deng, X., Wagner, H.-J., Popper, A.N. 2011. The Inner Ear and its Coupling to the Swim Bladder in the Deep-Sea Fish *Antimora rostrata* (Teleostei: Moridae). *Deep Sea Research, part I*, 158: 27-37.
- Dewar, H., Prince, E.D., Musyl, M.K., Brill, R.W., Sepulveda, C., Luo, J. 2011. Movements and behaviors of swordfish in the Atlantic and Pacific Oceans examined using pop-up satellite archival tags. *Fisheries Oceanography*, 20: 219-241.
- Diaz, R.J. 2001 Overview of Hypoxia around the World. *J. Environ. Qual.*, 30: 275-281.
- Díaz-Gil, C., Palmer, M., Catalán, I.A., Alós, J., Fuiman, L.A., García, E., del Mar Gil, M. Grau, A., Kang, A., Maneja, R.H., Mohan, J.A., Morro, B., Schaffler, J.J., Buttay, L., Inmaculada, R.B. Borja, T., Morales-Nin, B. 2015. Otolith fluctuating asymmetry: a misconception of its biological relevance? *ICES Journal of Marine Science*, 72(7): 2079-2089.
- Dimarchopoulou, D., Stergiou, K. I., Tsikliras, A.C. 2017. Gap analysis on the biology of Mediterranean marine fishes. *PLoS ONE*, 12(4): e0175949.
- Dowhower, J.F., Blumer, L.S., Lejeune, P., Gaudin, P., Marconato, A., Bisazza, A. 1990. Otolith asymmetry in *Cottus bairdi* and *Cottus gobio*. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 37(1-2): 209-220.
- Dryden, I.L., Mardia, K.V. 1998. *Statistical Shape Analysis*. John Wiley and Sons, Chichester, England, 347 p.

- Du Pontavice, H., Reton, M., Lehuta, S., Vermard, Y., Savina-Rollet, M. 2018. Investigating spatial heterogeneity of von Bertalanffy growth parameters to inform the stock structuration of common sole, *Solea solea*, in the Eastern English Channel. *Fisheries Research*, 207: 28-36.
- Duarte-Neto, P., Lessa, R., Stosic, B., Morize, E. 2008. The use of sagittal otoliths in discriminating stocks of common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) off northeastern Brazil using multishape descriptors. *ICES Journal of Marine Science*, 65(7): 1144-1152.
- Duret, J.D., Collet, A., Chow, S., Guinet, B., Borsa, P. 2005. Nuclear and mitochondrial DNA markers indicate unidirectional gene flow of Indo-Pacific to Atlantic bigeye tuna (*Thunnus obesus*) populations, and their admixture off southern Africa. *Marine Biology* 147: 313-322.
- Edeyer, A., de Pontual, H., Payan, P., Troadec, H., Sévère, A., Mayer-Gostan, N. 2000. Daily variations of the saccular endolymph and plasma compositions in the turbot *Psetta maxima*: relationship with the diurnal rhythm in otolith formation. *Mar Ecol Prog Ser*, 192: 287-294.
- Ernst, R., Ejsing, C.S., Antonny, B. 2016. Homeoviscous Adaptation and the Regulation of Membrane Lipids. *J Mol Biol.*, 428: 4776-4791.
- Fablet, R., Chessel, A., Carbini, S., Benzinou, A., de Pontual, H. 2009. Reconstructing individual shape histories of fish otoliths: A new image-based tool for otolith growth analysis and modeling. *Fisheries Research*, 96 (2–3): 148-159.
- Fablet, R., Pecquerie, L., de Pontual, H., Høie, H., Millner, R., Mosegaard, H., Kooijman, S.A.L.M. 2011. Shedding Light on Fish Otolith Biomineralization Using a Bioenergetic Approach. *PLoS ONE* 6(11): e27055.
- Falini, G., Fermani, S., Vanzo, S., Miletic, M., Zaffino, G. 2005. Influence on the formation of aragonite or vaterite by otolith macromolecules. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2005(1): 162-167.
- FAO, 1990. FAO species catalogue. Vol.10. Gadiform Fishes of the world (Order Gadiformes). An Annotated and Illustrated Catalogue of Cods, Hakes, Grenadiers and other Gadiform Fishes Known to Date. Daniel M. Cohen Tadashi Inada Tomio Iwamoto Nadia Scialabba 1990. FAO Fisheries Synopsis. No. 125, Vol.10. Rome, FAO. 1990. 442 p.
- FAO, 1995. Code de conduite pour une pêche responsable. Rome.
- FAO, 2016. The State of Mediterranean and Black Sea Fisheries 2016 (SoMFi 2016), Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 152 p.
- FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Farias, I., Vieira, A.R., Gordo, L.S., Figueiredo, I. 2009. Otolith shape analysis as a tool for stock discrimination of the black scabbardfish, *Aphanopus carbo* Lowe, 1839 (Pisces: Trichiuridae), in Portuguese waters. *Sci. Mar.*, 73: 47-53.
- Farkas, T., Csegri, I., Majors, F., Olah, J. 1980. Metabolism of fatty acids in fish. III. Combined effect of environmental temperature and diet on formation and deposition of fatty acids in the carp, *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. *Aquaculture*. 20: 29-40.

- Farkas, T., Dey, I., Buda, C.S., Halver, J.E. 1994. Role of phospholipid molecular species in maintaining lipid membrane structure in response to temperature. *Biophysical Chemistry*, 50: 147-155.
- Fay, R.R. 1984. The goldfish ear codes the axis of acoustic particle motion in three dimensions. *Science*, 225: 951-954.
- Feely, R.A., Sabine, C.L., Hernetez-Ayon, J.M., Ianson, D., Hales, B. 2008. Evidence for upwelling of corrosive “acidified” water onto the Continental Shelf. *Science*, 320(5882): 1490-1492.
- Feilich, K.L., López-Fernández, H. 2019. When Does Form Reflect Function? Acknowledging and Supporting Ecomorphological Assumptions, *Integrative and Comparative Biology*, 59(2): 358-370.
- Felix-Uraga, R., Gomez-Munoz, V.M., Quinonez-Velazquez, C., Melo-Barrera, F.N., Garcia-Franco, W. 2004: On the existence of Pacific sardine groups off Baja California and southern California. *CalCOFI Rep.*, 45: 146-151.
- Ferguson, G.J., Ward, T.M., Gilleters, B.M. 2011. Otolith shape and elemental composition: complementary tools for stock discrimination of mullet (*Argyrosomus japonicus*) in southern Australia. *Fisheries Research*, 110: 75-83.
- Ferrari, S., Chatain, B., Cousin, X., Leguay, D., Vergnand, A., Vidal, M.-O., Vandeputte, M., Begout, M.-L. 2014. Early individual electronic identification of sea bass using RFID microtags: A first example of early phenotyping of sex-related growth. *Aquaculture*, 426-427: 165-171.
- Fischer, A.J., Thompson, B.A. 2004. The age and growth of southern flounder, *Paralichthys lethostigma*, from Louisiana estuarine and offshore waters. *Bulletin of Marine Science*, 75: 63-77.
- Flock, A. 1964. Structure of the macula utriculi with special reference to directional interplay of sensory responses as revealed by morphological polarization. *Journal of Cell Biology* 22, 413-431.
- Folkvord, A., Blom, G., Johannessen, A., Moksness, E. 2000. Growth dependent age estimation in herring (*Clupea harengus* L.) larvae. *Fisheries Research*, 46: 91-103.
- Folkvord, A., Johannessen, A., Moksness, E. 2004. Temperature-dependent otolith growth in Norwegian spring-spawning herring (*Clupea harengus* L.) larvae. *Sarsia*, 89: 297-310.
- Fossen, I., Albert, O.T., Nilssen, E.M. 2003. Improving the precision of ageing assessments for long rough dab by using digitised pictures and otolith measurements. *Fish. Res.*, 60, 53-64.
- Fox, J., Weisberg, S. 2011. *An R companion to applied regression*, second edition. SAGE Publications, Los Angeles.

- Friedland, K.D., Reddin, D.G. 1994. The use of otolith morphology in stock discriminations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51: 91-98.
- Friedman, M. 2008. The evolutionary origin of flatfish asymmetry. *Nature*, 454: 209-212.
- Fulton, T.W. 1904. The rate of growth of fishes. 22nd Annual Report of the Fishery Board of Scotland 1904, (3): 141-241.
- Furuita, H., Takeuchi, T., Uematsu, K. 1998. Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on growth, survival and brain development of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 161, 269-279.
- Fusco, G., Minelli A. 2010. Phenotypic plasticity in development and evolution: facts et concepts. Introduction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 365: 547–556.
- Gagliano, M., McCormick, M.I. 2004. Feeding history influences otolith shape in tropical fish. *Marine Ecology Progress Series*, 278: 291-296.
- Galley, E.A., Wright, P.J., Gibb, F.M. 2006. Combined methods of otolith shape analysis improve identification of spawning areas of Atlantic cod. *ICES J. Mar. Sci.*, 63: 1710-1717.
- Garcia, A., Mattiucci, S., Damiano, S., Santos, M.N., Nascetti, G. 2011. Metazoan parasites of swordfish, *Xiphias gladius* (Pisces: Xiphiidae) from the Atlantic Ocean: implications for host stock identification. *ICES Journal of Marine Science*, 68: 175-182.
- García-Lafuente, J., Vargas, J.M., Cano, N., Sarhan, T., Plaza, F., Vargas, M. 1998. Observaciones de corriente en la estacion 'N' en el Estrecho de Gibraltar desde Octubre de 1995 a Mayo de 1996, Report on the Informes Tecnicos, Instituto Espanol de Oceanografia, pp. 46.
- Gauldie, R., Nelson, D.G. 1990. Otolith growth in fishes. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.*, 97: 119-135.
- Gauldie, R.W. 1988. Tagging and genetically isolated stocks of fish: a test of one stock hypothesis and the development of another. *Journal of Applied Ichthyology*, 4: 168-73.
- Gauldie, R.W., Jones, J.B. 2000. Stocks, or geographically separated populations of the New Zealand orange roughy, *Hoplostethus atlanticus*, in relation to parasite infestation, growth rate, and otolith shape. *Bull. Mar. Sci.*, 67: 949-971.
- Geffen, A.J. 1987. Methods of validating daily increment deposition in otoliths of larval fish. *In: Age and growth of fish*, Summerfelt R. C. and G. E. Hall (Eds.). Iowa State University Press, Ames. pp. 223–240.
- Gladyshev, M.I., Semenchenko, V.P., Dubovskaya, O.P., Fefilova, E.B., Makhutova, O.N., Buseva, Z.F., Sushchik, N.N., Razlutskiy, V.I., Lepskaya, E.V., Baturina, M.A., Kalachova, G.S., Kononova, O.N. 2011. Effect of temperature on contents of essential highly unsaturated fatty acids in freshwater zooplankton *Limnologica*, 41: 339-347.

- Gonzalez-Salas, C., Lenfant, P. 2007. Interannual variability and intraannual stability of the otolith shape in European anchovy *Engraulis encrasicolus* (L.) in the Bay of Biscay. *Journal of Fish Biology*, 70: 35-49.
- Gourtay, C. 2018. Aspects évolutifs et environnementaux de la plasticité phénotypique chez deux Moronidés, le bar Européen (*Dicentrarchus labrax*) et le bar rayé (*Morone saxatilis*). PhD Thesis, Université de Bretagne Occidentale- Université du Québec.
- Gourtay, C., Chabot, D., Audet, C., Delliou, H.L., Quazuguel, P., Claireaux, G., Zambonino-Infante, J.-L., 2018. Will global warming affect the functional need for essential fatty acids in juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*) ? A first overview of the consequences of lower availability of nutritional fatty acids on growth performance. *Mar. Biol.* 165, 143.
- Gowerer, J.C. 1975. Generalized Procrustes analysis. *Psychometrika*, 40: 33-50.
- Graf, W., Baker, R. 1983. Adaptive changes of the vestibulo-ocular reflex in flatfish are achieved by reorganization of central nervous pathways. *Science*, 221: 777-779.
- Granlund, G.H. 1972. Fourier Preprocessing for Het Print Character Recognition. *IEEE Transactions on Computers*, C-21(2): 195-201.
- Grasse, P.P. 1958. L'oreille et ses annexes. Dans : *Traité de zoologie : anatomie, systématique, biologie. Agnathes et Poissons : anatomie, éthologie, systématique.* Grasse P. P. (Eds.). Tome Xm (2), Masson, Pans, 1061-1098.
- Green, A.A., Mosaliganti, K.R., Swinburne, I.A., Obholzer, N.D., Megason, S.G. 2017. Recovery of shape and size in a developing organ pair. *Developmental Dynamics*, 246: 451-465.
- Gronkjaer, P. 2016. Otoliths as individual indicators: a reappraisal of the link between fish physiology et otolith characteristics. *Mar Freshw Res*, 67: 881-888.
- Gullet, J.A. 1969. Manual of methods of fish stock assessment. Part 1. Fish population analysis. FAO Manuals in Fisheries Science 4, 154 p.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L. 2006. Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms. *FEBS Lett.* 580: 5477-5483.
- Hare, J.A., Cowen, R.K. 1997. Size, growth, development, and survival of the planktonic larvae of *Pomatomus saltatrix* (pisces: Pomatomidae). *Ecology*, 78: 2415-2431.
- Harkonen, T. 1986. Guide to the Otoliths of the Bony Fishes of the Northeast Atlantic. Hellerup, Denmark: DanbiuApS, 256 p.
- Hata, H., Yasugi, M., Takeuchi, Y., Takahashi, S., Hori, M. 2013. Measuring and evaluating morphological asymmetry in fish: distinct lateral dimorphism in the jaws of scale-eating cichlids. *Ecology and Evolution*; 3(14): 4641-4647.
- Hátún, H., Payne M.R., Jacobsen, J.A. 2009. The North Atlantic subpolar gyre regulates the spawning distribution of blue whiting (*Micromesistius poutassou*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 66: 759-777.

- Hawkins, S.J., Bohna, K., Sims, D.W., Ribeiro, P., Faria, J., Presa, P., Pita, A., Martins, G.M., Neto, A.I., Burrows, M.T., Genner, M.J. 2016. Ocean fisheries stocks from an ecological perspective: disentangling ecological connectivity from genetic interchange. *Fish. Res.* 179: 333–341.
- Hay, G., Richardson, A.J., Robinson, C. 2005. Climate change et marine plankton. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 338-344.
- Hazel, J.R., Carpenter, R. 1985. Rapid changes in the phospholipid composition of gill membranes during thermal acclimation of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Journal of Comparative Physiology and Biochemistry*, 155: 597-602.
- Heiberger, R.M., Hollet, B. 2004. *Statistical analysis and data display: an intermediate course with examples in S-Plus, R, and SAS*. New York: Springer.
- Heinke, F. 1898. *Naturgeschichte des herings*. Deutscher Seefischerei Verein. Band III.
- Heino, M., Godø, O.R. 2002. Blue whiting- a key species in the mid-water ecosystems of the northeastern Atlantic. *ICES C.M.* 2002/L:28.
- Helling, K., Scherer, H., Hausmann, S., Clarke, A.H. 2005. Otolith mass asymmetries in the utricle and saccule of flatfish. *Journal of Vestibular Research*, 15: 59-64.
- Henderson, R.J., Tocher, D.R. 1987. The lipid composition and biochemistry of fresh water fish. *Prog. Lipid Res.*, 26: 281-347.
- Hermida, M., Cavaleiro, B., Gouvea, L., Saraiva, A. 2018. Parasites of skipjack, *Katsuwonus pelamis*, from Madeira, Eastern Atlantic. *Parasitology Research*, 117: 1025-1033.
- Higley, L.G., Pedigo, L.P., Ostlie, K.R., 1986. DEGDAY: a program for calculating degree-days and assumptions behind the degree-day approach. *Environ. Entomol.* 15: 999-1016.
- Hilbig, R., Anken, R., Rahmann, H. 2003. On the origin of susceptibility to kinetotic swimming behaviour in fish: A parabolic aircraft flight study. *Journal of Vestibular Research*, 12: 185-189.
- Hilbig, R., Knie, M., Shcherbakov, D., Anken, R.H. 2011. Analysis of Behaviour and Habituation of Fish Exposed to Diminished Gravity in Correlation to Inner Ear Stone Formation -A Sounding Rocket Experiment (TEXUS 45). *Proceedings of the 20th ESA Symposium on European Rocket and Balloon Programmes and Related Research*, 22–26 May 2011, Hyere, France.
- Hilborn, R., Walters, C.J. 2001. *Quantitative Fisheries Stock Assessment, Choice, Dynamics & Uncertainty*, Kluwer Academic Publishers Group, 570 p.
- Hoff, G.R., Fuiman, L.A. 1995. Environmentally induced variation in elemental composition of red drum (*Sciaenops ocellatus*) otoliths. *Bull Mar Sci*, 56: 578-591.
- Hofmann, G.E., Todgham, A.E. 2010. Living room in the Now: Physiological Mechanisms to Tolerate has Rapidly Changing Environment. *Annu. Rev. Physiol.*, 72: 127-145.

- Holmberg, R.J., Wilcox-Freeburg, E., Rhyne, A.L., Tlusty, M.F., Stebbins, A., Nye, Jr.S.W., Honig, A., Johnston, A.E., San Antonio, C.M., Bourque, B., Hannigan, R.E. 2019. Ocean acidification alters morphology of all otolith types in Clark's anemonefish (*Amphiprion clarkii*). PeerJ, 7.
- Hurst, T., Fernetz, E., Mathis, J. 2013. Effects of ocean acidification on hatch size and larval growth of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*), ICES J. Mar. Sci., 70: 812-822.
- Hüssy, K. 2008. Otolith shape in juvenile cod (*Gadus morhua*): ontogenetic and environmental effects. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 364: 35-41.
- ICES, 2011. Report of the Workshop of National Age Readings Coordinators (WKNARC), 5-9 September 2011, Boulogne-sur-Mer, France. ICES CM 2011/ACOM:45. 175 p.
- ICES, 2012. Report of the Benchmark Workshop on Pelagic Stocks (CM2012/ACOM:47). Copenhagen, Denmark.
- ICES, 2013. Report of the Working Group on Widely Distributed Stocks (WGWIDE). 27 August - 2 September 2013, Copenhagen, Denmark.
- ICES, 2018. Interim Report of the Stock Identification Methods Working Group (SIMWG), 7-8 August 2018, Portlet, USA. ICES CM 2018/HAPISG:14, Copenhagen, Denmark.
- ICES, 2019. Working Group on Machine Learning in Marine Science (WGMLEARN). ICES Scientific Reports. 1: 45. 13 p.
- Ider, D., Ramdane, Z., Mahé, K., Dufour, J. L., Bacha, M., Amara, R. 2017. Use of otolith shape analysis to discriminate stocks of *Boops boops* (L.) from the Algerian coast (southwestern part of the Mediterranean Sea). African Journal of Marine Science, 39(3): 251-258.
- Ihssen, P.E., Booke, H.E., Casselman, J.M., McGlade, J.M., Payne, N.R., Utter, E.M. 1981. Stock identification: materials and methods. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 38: 1838-55.
- Inoue, M., Tanimoto, M., Oda, Y. 2013. The role of ear stone size in hair cell acoustic sensory transduction. Scientific Reports, 3: 2114.
- IOTC, 2013. Rapport de la Seizième session du Comité scientifique de la CTOI, 2-6 December 2013, Busan, South Korea. Report No. IOTC-2013-SC16. Victoria, Seychelles: Indian Ocean Tuna Commission.
- IOTC, 2015. Report of the 18th Session of the IOTC Scientific Committee, 23-27 November 2015, Bali, Indonesia. Report No. IOTC-2015-SC18-R. Victoria, Seychelles: Indian Ocean Tuna Commission.
- IPCC, 2014. Climate change 2014: Synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland.
- Irgens, C. 2018. Otolith structure as indicator of key life history events in Atlantic cod (*Gadus morhua*), PhD Thesis, University of Bergen, Norway, 54 p.

- Irgens, C., Kjesbu, O.S., Folkvord, A. 2017. Ontogenetic development of otolith shape during settlement of juvenile Barents Sea cod (*Gadus morhua*). ICES Journal of Marine Science 74: 2389-2397.
- Isaev, N.A., Seliverstov, A.S. 1991. Population structure of the Hebridean–Norwegian school of blue whiting, *Micromesistius poutassou*. J. Ichthyol., 31: 45-58.
- Ishimatsu, A., Hayashi, M., Kikkawa, T. 2008. Fishes in high-CO₂, acidified oceans, Mar. Ecol.-Prog. Ser., 373: 295-302.
- Iwata, H., Ukai, Y. 2002. SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. Journal of Heredity, 93: 384-385.
- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L., Hernández Cruz, C.M. 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. Fish Physiol. Biochem., 22(2): 97-107.
- Izzo, C., Reis-Santos, P., Gillanders, B.M. 2018. Otolith chemistry does not just reflect environmental conditions: A meta-analytic evaluation. Fish and Fisheries, 19(3): 441-454.
- Izzo, C., Ward, T.M., Ivey, A.R., Suthers, I.M., Stewart, J., Sexton, S.C., Gillanders B.M. 2017. Inte-grated approach to determining stock structure: implications for fisheries management of sardine, *Sardinops sagax*, in Australian waters. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 27: 267-284.
- Jamieson, A. 1973. Genetic "tags" for marine fish stocks. In: Sea Fisheries Research. J.F.R. Hardin (Eds.). Elek Science: London. pp. 91-99.
- Jean, C., Bourjea, J., Jouen, E., Taquet, M. 2006. Stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) in the Southwest Indian Ocean: a preliminary study. Bulletin of Marine Science 79: 521-526.
- Jearld, Jr.A., Sass, S.L., Davis, M.F. 1993. Early growth, behaviour, and otolith development of the winter flounder *Pleuronectes americanus*. Fish. Bull., 91: 65-75.
- Jennings, S., Pawson M.G., 1992. The origin and recruitment of bass, *Dicentrarchus labrax*, larvae to nursery areas. J. Mar. Biol. Assoc. UK, 72: 199-212.
- Jobling, M. 1994. Fish bioenergetics, first ed. Chapman and Hall, New York.
- Jobling, M. 1996. Temperature and growth: modulation of growth rate via temperature, In: Global Warning: Implication for Freshwater and Marine Fish. Society for Experimental Biology, Seminar Series, volume 61. Wood, C.M., McDonald, D.G. (Eds.), Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 225-253.
- Johnston, T.A., Mathias, J.A. 1994. The effects of temperature on feeding in zooplanktivorous walleye, *Stizostedion vitreum*, larvae. Environ. Biol. Fish., 40: 189-198.
- Jolivet, A., Bardeau, J.-F., Fablet, R., Paulet, Y.-M., de Pontual, H. 2008. Understating otolith biomineralization processes: new insights into microscale spatial distribution of organic and mineral fractions from Raman microspectrometry. Anal. Bioanal. Chem., 392: 551-560.

- Jolivet, A., Bardeau, J.-F., Fablet, R., Paulet, Y.-M., de Pontual, H. 2013. How do the organic and mineral fractions drive the opacity of fish otoliths? Insights using Raman microspectrometry. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 70: 711-719.
- Kadagi, N.I., Harris, T., Conway, N. 2011. East Africa billfish conservation and research: marlin, sailfish and swordfish mark-recapture field studies. Report No. IOTC-2011-WPB09-10. Victoria, Seychelles: Indian Ocean Tuna Commission.
- Kalish, J.M. 1989. Otolith microchemistry: validation of the effects of physiology, age and environment on otolith composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 132: 151-178.
- Kalish, J.M. 1991. Determinants of otolith chemistry: seasonal variation in the composition of blood plasma, endolymph et otoliths of bearded rock cod *Pseudophycis barbatus*. *Mar Ecol Prog Ser*, 74: 137-159.
- Karakiri, M., Berghahn, R., von Westernhagen, H. 1989. Growth differences in 0-group plaice *Pleuronectes platessa* as revealed by otolith microstructure analysis. *Marine Ecology, Progress Series*, 55: 15-22.
- Karasev, A.B. 1990. Ecological and geographical analysis of the Northeast Atlantic blue whiting parasite fauna. *In: Biology and Fisheries of the Norwegian Spawning Herring and Blue Whiting in the Northeast Atlantic*. T. Monstad (Eds.). pp. 307-319.
- Keating, J.P., Brophy, D., Officer, R.A., Mullins, E. 2014. Otolith shape analysis of blue whiting suggests a complex stock structure at their spawning grounds in the Northeast Atlantic. *Fish. Res.*, 157: 1-6.
- Keller, S., Quetglas, A., Puerta, P., Bitetto, I., Casciaro, L., Cuccu, D., Esteban, A., Garcia, C., Garofalo, G., Guijarro, B., Josephides, M., Jadaud, A., Lefkaditou, E., Maiorano, P., Manfredi, C., Marceta, B., Micallef, R., Peristeraki, P., Relini, G., Sartor, P., Spedicato, M. T., Tserpes, G., Hidalgo, M. 2017. Environmentally driven synchronies of Mediterranean cephalopod populations. *Progress In Oceanography*, 152: 1-14.
- Kelley, D.F. 1988. The importance of estuaries for sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.) *Journal of Fish Biology*, 33: 25-33.
- Kendall, D.G. 1977. The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability*, 9: 428-430.
- Kever, L., Colleye, O., Herrel, A., Romans, P., Parmentier, E. 2014. Hearing capacities and otolith size in two ophidiiform species (*Ophidion rochei* and *Carapus acus*). *Journal of Experimental Biology*, 217: 2517-2525.
- Kimura, D. 1963. Speech Lateralization in young children as determined by an auditory test. *J Comp Physiol Psychol.*, 56: 899-902.
- Kimura, D. 1964. Left-ear differences in the perception of melodies. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 16: 355-358.
- King, F.L., Kimura, D. 1972. Left-ear superiority in dichotic perception of vocal nonverbal sounds. *Canadian Journal of Psychology*, 26: 111-116.

- Klecka, W.R. 1980. Discriminant analysis. Sage Publications, Beverly Hills.
- Kloppmann, M., Mohn, C., Bartsch, J. 2001. The distribution of blue whiting eggs and larvae on Porcupine Bank in relation to hydrography and currents. *Fish. Res.*, 50: 89-109.
- Kooijman, S.A.L.M. 2000. *Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems*. Cambridge University Press.
- Kotoulas, G., Bonhomme F., Borsa, P. 1995. Genetic structure of the common sole *Solea vulgaris* at different geographic scales. *Marine Biology*, 122: 361-375.
- Kuhl, F., Giardina, C. 1982. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing* 18: 236-258.
- L'Abée-Lund, J.H., Jensen, A.J. 1993. Otoliths as natural tags in the systematics of salmonids. *Environ. Biol. Fish.*, 36: 389-393.
- Ladich, F., Schulz-Mirbach, T. 2016. Diversity in fish auditory systems: one of the riddles of sensory biology. *Frontiers in Ecology and Evolution* 4, 28.
- Lagardère, F., Troadec, H. 1997. Age estimation in common sole *Solea solea* larvae: validation of daily increments and evaluation of a pattern recognition technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 155: 223-237.
- Lê, S., Josse, J., Husson, F. 2008. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, 25: 1-18.
- Leamy, L.J., Klingenberg, C.P. 2005. The genetics and evolution of fluctuating asymmetry. *Annu Rev Ecol Evol Syst.*, 36: 1-21.
- Legendre, P., Legendre, L.F.J. 1998. *Numerical Ecology*. 2nd edition, Elsevier Science. 853 pp.
- Legendre, P., Legendre, L.F.J. 2012. *Numerical Ecology*. Third edition. *Developments in Environmental Modelling*, Report 24.
- Legg, D., Strutimann, J., van Vleet, S., Lloyd, J. 1998. Bias and variability in lower developmental thresholds estimated from field studies. *J. Econ. Entomol.*, 91(4): 891-898.
- Legua, J., Plaza, G., Pérez, D., Arkhipkin, A. 2013. Otolith shape analysis as a tool for stock identification of the southern blue whiting, *Micromesistius australis*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41: 479-489.
- Lemberget, T., McCormick, M.I. 2009. Replenishment success linked to fluctuating asymmetry in larval fish. *Oecologia*, 159: 83-93.
- Lestrel, P.E. 2008. *Fourier descriptors and their applications in biology*. Cambridge: University Press.
- Lestrel, P.E., 1997. *Fourier descriptors et their applications in biology*. Cambridge University Press.

- Leung, C., Duclos, K.K., Grünbaum, T., Cloutier, R., Angers, B. 2017. Asymmetry in dentition et shape of pharyngeal arches in the clonal fish *Chrosomus eos-neogaeus*: Phenotypic plasticity et developmental instability. PLoS ONE, 12(4): e0174235.
- Libungan, L.A., Pálsson, S. 2015. ShapeR: An R Package to Study Otolith Shape Variation among Fish Populations. PLOS ONE, 10(3): e0121102.
- Libungan, L.A., Slotte, A., Husebø, Å., Godiksen, J.A., Pálsson, S. 2015. Latitudinal gradient in otolith shape among local populations of Atlantic herring (*Clupea harengus* L.) in Norway. PLoS ONE, 10(6).
- Lleonart, J., Salat, J., Torres, G.J. 2000. Removing allometric effects of body size in morphological analysis. Journal of theoretical Biology, 205(1): 85-93.
- Lombarte, A., Cruz, A. 2007. Otolith size trends in marine fish communities from different depth strata. Journal of Fish Biology, 71: 53-76.
- Lombarte, A., Lleonart, J. 1993. Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. Environmental Biology of Fishes, 37: 297-306.
- Lombarte, A., Tuset, V. 2015. Morfometria de otólitos. Métodos de estudo com otólitos: princípios e aplicações. Buenos Aires: CAFP-BA-PIESCI, 269-302.
- Longhurst, A. 1998. Ecological Geography of the Sea. Academic Press, San Diego. 398 p.
- Lord, C., Morat, F., Lecomte-Finiger, R., Keith, P. 2012. Otolith shape analysis for three Sicyopterus (Teleostei: Gobioidae: Sicydiinae) species from New Caledonia et Vanuatu. Environmental Biology of Fishes, 93(2): 209-222.
- Los, D.A., Murata, N. 2004. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Biochim Biophys Acta, 1666: 142-157.
- Lowenstein, O., Roberts, T.D.M. 1949. The equilibrium function of the otolith organs of the thornback ray (*Raja clavata*). Journal of Physiology, 110: 392-415.
- Loy, A., Busilacchi, S., Costa, C., Ferlin, L., Cataudella, S. 2000. Comparing geometric morphometrics and outline fitting methods to monitor fish shape variability of *Diplodus puntazzo* (Teleostea: Sparidae). Aquac Eng, 21: 271-283.
- Lu, C.P., Chen, C.A., Hui, C.F., Tzeng, T.D., Yeh, S.Y. 2006. Population genetic structure of the swordfish, *Xiphias gladius* (Linnaeus, 1758), in the Indian Ocean and West Pacific inferred from the complete DNA sequence of the mitochondrial control region. Zoological Studies, 45: 269-279.
- Lundberg, Y.W., Xu, Y., Thiessen, K.D., Kramer, L. 2015. Mechanisms of Otoconia and Otolith Development. Developmental Dynamics, 244: 239-253.
- Lychakov, D. 2013. Behavioral lateralization and otolith asymmetry. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, 49: 441-456.
- Lychakov, D. V., Rebane, Y.T., Lombarte, A., Demestre, M., Fuiman, L.A. 2008. Saccular otolith mass asymmetry in adult flatfishes. Journal of Fish Biology, 72: 2579-2594.

- Lychakov, D.V., Rebane, Y.T. 2005. Fish otolith mass asymmetry: Morphometry and influence on acoustic functionality. *Hearing Research*, 201: 55-69.
- McConnell, C.J., Atkinson, S., Oxman, D., Westley, P.A.H. 2019. Is blood cortisol or vateritic otolith composition associated with natal dispersal or reproductive performance on the spawning grounds of straying and homing hatchery-produced chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Southeast Alaska?. *Biology Open* (2019) 8, bio042853. doi:10.1242/bio.042853
- MacKenzie, K., Abaunza, P. 2005. Parasites as biological tags. *In: Stock Identification Methods: Applications of Fisheries Science*. Cadrin S.X., Friedland K.D., Waldman J.R., (Eds.). Elsevier, NY: pp. 211-226.
- Mahé, K., Aumond, Y., Rabhi, K., Elleboode, R., Bellamy, E., Huet, J., Gault, M., Roos, D. 2017. Relationship between somatic growth and otolith growth: a case study of the ornate jobfish *Pristipomoides argyrogrammicus* from the coast of Réunion (SW Indian Ocean). *African Journal of Marine Science*, 39(2): 145-151.
- Mahé, K., Evano, H., Mille, T., Muths, D., Bourjea, J. 2016. Otolith shape as a valuable tool to evaluate the stock structure of swordfish *Xiphias gladius* in the Indian Ocean. *African Journal of Marine Science*, 38(4): 457-464.
- Mahé, K., Gourtay, C., Bled Defruit, G., Chantre, C., de Pontual, H., Amara, R., Claireaux, G., Audet, C., Zambonino-Infante, J.L., Ernande B. 2019a. Do environmental conditions (temperature and food composition) affect otolith shape during fish early-juvenile phase? An experimental approach applied to European Seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Accepted
- Mahé, K., Ider, D., Massaro, A., Hamed, O., Jurado-Ruzafa, A., Gonçalves, P., Anastasopoulou, A., Jadaud, A., Mytilineou, C., Reton, M., Elleboode, R., Morell, A., Ramdane, Z., Smith, J., Bekaert, K., Amara, R., de Pontual, H., Ernande, B. 2019b. Directional bilateral asymmetry in fish otolith: is it a potential tool to evaluate the stock boundaries? *In: Biological Shape Analysis: Proceedings of the 5th International Symposium of Biological Shape Analysis*. World Scientific, Lestrel P.E. (Eds.). Pub Singapore and New Jersey, USA 5: In press.
- Mahé, K., Oudard, C., Mille, T., Keating, J., Goncalves, P., Worsoe Clausen, L., Petursdottir, G., Rasmussen, H., Meland, E., Mullins, E., Pinnegar, J.K., Hoines, A., Trenkel, V. 2016. Identifying blue whiting (*Micromesistius poutassou*) stock structure in the Northeast Atlantic by otolith shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 73: 1-10.
- Mahé, K., Villanueva, C.-M., Vaz, S., Coppin, F., Koubbi, P., Carpentier, A. 2014. Morphological variability of the shape of striped red mullet *Mullus surmuletus* in relation to stock discrimination between the Bay of Biscay and the eastern English Channel. *Journal of Fish Biology*, 84(4): 1063-1073.
- Mapp, J., Hunter, E., Van Der Kooijc, J., Songer, S., Fisher, M. 2017. Otolith shape and size: The importance of age when determining indices for fish-stock separation. *Fisheries Research*, 190: 43-52.

- Marcelli, A., Bedouelle, J. Cara, M. Civatte, J. Delaveau, P. Frottier, J. Giudicelli, C.-P. Hureau, J. Gall, J.-R.L. Maquart, F. Michaux, J.-L. Nezelof, C. Polonovski, J. Rodhain, F. Rouesse, J. Delage M.V., Mériaux, M. 2016. Statoconie, Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine.
- Martino, J.C., Doubleday, Z.A., Gillanders, B.M. 2019. Metabolic effects on carbon isotope biomarkers in fish. *Ecol. Indic.*, 97: 10-16.
- Martino, J.C., Fowler, A.J. Doubleday, Z.A. Grammer, G.L., Gillanders, B.M. 2019. Using otolith chronologies to understet long-term trends and extrinsic drivers of growth in fisheries. *Ecosphere*, 10(1).
- Marti-Puig, P., Danes, J., Manjabacas, A., Lombarte, A. 2016. New parameterisation method for three-dimensional otolith surface images. *Marine and Freshwater Research*, 67: 1059-1071.
- Mattiucci, S., Giullietti, L., Paoletti, M., Cipriani, P., Gay, M., Levsen, A., Klapper, R., Karl, H., Bao, M., Pierce, G.J., Nascetti, G. 2018. Population genetic structure of the parasite *Anisakis simplex* collected in *Clupea harengus* L. from Northeast Atlantic fishing grounds. *Fisheries Research*, 202(S1): 122-133.
- Maulucci, G., Cohen, O., Daniel, B., Sansone, A., Petropoulou, P.I., Filou, S., Spyridonidis, A., Pani, G., De Spirito, M., Chatgialiloglu, C., Ferreri, C., Kypreos, K.E., Sasson, S. 2016. Fatty acid-related modulations of membrane fluidity in cells: detection and implications, *Free Radical Research*, 50(sup1): 40-50.
- Mayer-Gostan, N., Kossmann, H., Watrin, A., Payan, P., Boeuf, G. 1997. Distribution of ionocytes in the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Scophthalmus maximus*). *Cell Tissue Res*, 289: 53-61.
- McDonald, J.H. 2014. *Hetbook of biological statistics*, first edition. Sparky House Publishing, Baltimore.
- Megalofonou, P. 2006. Comparison of otolith growth and morphology with somatic growth and age in young-of-the-year bluefin tuna. *Journal of Fish Biology*, 68: 1867-1878.
- Mejuto, J., Garcia-Cortes, B., Ramos-Cortelle, A. 2006. An overview of research activities on swordfish (*Xiphias gladius*) and the by-catch species caught by the Spanish longline fleet in the Indian Ocean. Report No. IOTC-2006-WPB-11. Victoria, Seychelles: Indian Ocean Tuna Commission.
- Mérigot, B., Letourneur, Y., Lecomte-Finiger, R. 2007. Characterization of local populations of the common sole *Solea solea* (Pisces, Soleidae) in the NW Mediterranean through otolith morphometrics and shape analysis. *Marine Biology*, 151: 997-1008.
- Mieszkowska, N., Kendall, M.A., Hawkins, S.J., Leaper, R., Williamson, P., Hardman-Mountford, N.J., Southward, A.J. 2006. Changes in the range of some common rocky shore species in Britain - a response to climate change ? *Hydrobiologia*, 555: 241-251.

- Mille, T. 2015. Sources de variation intra-populationnelle de la morphologie des otolithes: asymétrie directionnelle et régime alimentaire. PhD Thesis, Université de Lille 1 - Sciences et Technologies.
- Mille, T., Mahé, K., Cachera, M., Villanueva, C. M., De Pontual, H., Ernande, B. 2016. Diet is correlated with otolith shape in marine fish. *Marine Ecology Progress Series*, 555: 167-184.
- Mille, T., Mahé, K., Villanueva, C.M., de Pontual, H., Ernande, B., 2015. Sagittal otolith morphogenesis asymmetry in marine fishes. *J. Fish Biol.*, 87: 646-663.
- Milton, D.A., Shaklee, J.B. 1987. Biochemical genetics and population structure of blue grenadier, *Macruronus novaezeletiae* (Hector) (Pisces: Merluccidae), from Australian waters. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 38: 727-42.
- Modin, J., Fagerholm, B., Gunnarsson, B., Pihl, L. 1996. Changes in otolith microstructure at metamorphosis of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *ICES Journal of Marine Science*, 53: 745-748.
- Moen, E., Handegard, N.O., Allken, V., Albert, O.T., Harbitz, A., Malde, K. 2018. Automatic interpretation of otoliths using deep learning. *PLOS ONE* 13(12): e0204713.
- Monstad, T. 2004. Blue whiting. *In: The Norwegian Sea Ecosystem*. H.R. Skjoldal (Eds.). Tapir Academic Press, Trondheim, pp. 263-288.
- Monteiro, L.R., Di Benedetto, A.P.M., Guillermo, L.H., Rivera, L.A. 2005. Allometric changes and shape differentiation of sagitta otoliths in sciaenid fishes. *Fishery Research*, 74: 288-299.
- Morales-Nin, B. 2000. Review of the growth regulation processes of otolith daily increment formation. *Fish Res*, 46: 53-67.
- Mork, J., Giaever, M. 1995. Genetic-variation at isozyme loci in blue whiting from the northeast Atlantic. *J. Fish Biol.*, 46: 462-468.
- Mork, J., Ryman, N., Stahl, G., Utter, F., Sundnes, G., 1985. Genetic variation in Atlantic cod (*Gadus morhua*) throughout its range. *Canetian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 42: 1580-1587.
- Morrongiello, J.R., Thresher, R.E. 2015. A statistical framework to explore ontogenetic growth variation among individuals and populations: a marine fish example. *Ecological Monographs*, 85: 93-115.
- Mosegaard, H., Steffner, N.G., Ragnarsson, B. 1987. Manipulation of otolith microstructures as a mean of mass-marking salmonid yolk sac fry. *In: Proceedings of the Fifth Congress of European Ichthyologists*. Kullander, S.O. Fernholm, B. (Eds.). Swedish Museum of Natural History, Stockholm. pp. 213-220.
- Mosegaard, H., Svedäng, H., Taberman, K. 1988. Uncoupling of Somatic et Otolith Growth Rates in Arctic Char (*Salvelinus alpinus*) as an Effect of Differences in Temperature Response. *Can J Fish Aquat Sci*, 45: 1514-1524.

- Mourente, G., Bell, J.G. 2006. Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed et palm oils) in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study: effects on muscle et liver fatty acid composition et effectiveness of a fish oil finishing diet. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.*, 145: 389-399.
- Mugiya, Y. 1974. Calcium-45 behavior at the level of otolithic organs of rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society of the Scientific Fisheries*, 40(5): 457-463.
- Munk, K.M. Smoker, W.W. 1993. A hatchery water-heating system and its application to 100% thermal marking of incubating salmon. *The Progressive Fish Culturist*, 55: 284-288.
- Murayama, E., Herbomel, P., Kawakami, A., Takeda, H., Nagasawa, H. 2005. Otolith matrix proteins OMP-1 and Otolin-1 are necessary for normal otolith growth and their correct anchoring onto the sensory maculae. *Mech Dev*, 122: 791-803.
- Murayama, E., Okuno, A., Ohira, T., Takagi, Y., Nagasawa, H. 2000. Molecular cloning and expression of an otolith matrix protein cDNA from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 126(4): 511-520.
- Murayama, E., Takagi, Y., Ohira, T., Davis, J.G., Greene, M.I., Nagasawa, H. 2002. Fish otolith contains a unique structural protein, otolin-1. *Eur. J. Biochem.*, 269(2): 688-696.
- Murdoch, D.J., Chow, E.D. 1996. A graphical display of large correlation matrices. *The American Statistician*, 50: 178-180.
- Murta, A.G. 2000. Morphological variation of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Iberianet North African Atlantic: implications for stock identification. *ICES Journal of Marine Science*, 57, 1240-1248.
- Muths, D., Grewe, P., Jean, C., Bourjea, J. 2009. Genetic population structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) in the southwest Indian Ocean: sex-biased differentiation, congruency between markers and its incidence in a way of stock assessment. *Fisheries Research*, 97: 263-269.
- Muths, D., Le Couls, S., Evano, H., Grewe, P., Bourjea, J. 2013. Multi-genetic marker approach and spatio-temporal analysis suggest there is a single panmictic population of swordfish *Xiphias gladius* in the Indian Ocean. *PLoS ONE*, 8: e63558.
- Nagasawa, H. 2013. The Molecular Mechanism of Calcification in Aquatic Organisms, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 77(10): 1991-1996.
- Nakamura, I. 1985. FAO species catalogue. Vol. 5. Billfishes of the world. An annotated and illustrated catalogue of marlins, sailfishes, spearfishes and swordfishes known to date. FAO Fisheries Synopsis 125. Rome: Food and Agriculture Organization.
- Nasreddine, K., Benzinou, A., Fablet, R., 2009. Shape geodesics for the classification of calcified structures: Beyond fourier shape descriptors. *Fisheries Research*, 98 (1-3): 8-15.
- Neuheimer, A.B., Taggart, C.T. 2007. The growing degree-day and fish size-at-age: the overlooked metric. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 64(2): 375-385.

- Neuheimer, A.B., Thresher, R.E., Lyle, J.M. Semmens, J.M. 2011. Tolerance limit for fish growth exceeded by warming waters. *Nature Climate Change*, 1: 110-113.
- Nijhout, H.F., Davidowitz, G. 2003. Developmental perspectives on phenotypic variation: canalization, and fluctuating asymmetry. *In: Developmental instability (DI): Causes and consequences*. M. Polak (Eds.), Oxford: Oxford University Press. pp. 3–13.
- Okada, N., Takagi, Y., Seikai, T., Tanaka, M., Tagawa, M. 2001. Asymmetrical development of bones and soft tissues during eye migration of metamorphosing Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Cell Tissue Res.*, 304: 59-66.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, H.M.H., Wagner, H. 2013. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0–10. 292 p.
- Oliva-Teles, A. 2000. Recent advances in European seabass and gilthead sea bream nutrition. *Aquacult. Int.*, 8: 477-492.
- Olsen, Y., Skjervold, H. 1995. Variation in content of omega 3 fatty acids in farmed Atlantic salmon, with special emphasis on effects of non dietary factors. *Aquac. Int.*, 3: 2-35.
- Otterlei, E., Folkvord, A., Nyhammer, G. 2002. Temperature dependent otolith growth of larval and early juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *ICES Journal of Marine Science*, 59: 401-410.
- Palko, B.J., Beardsley, G.L., Richards, W.J. 1981. Synopsis of the biology of the swordfish, *Xiphias gladius* Linnaeus. *FAO Fisheries Synopsis* 127. Rome: Food and Agriculture Organization.
- Palmer, A.R. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. *In: Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. Contemporary Issues in Genetics and Evolution. T. A. Markow (Eds.): Springer, Netherlands. pp. 335-364.
- Palmer, A.R. 2009. Animal asymmetry. *Current Biology*, 19: 473-477.
- Palmer, A.R. 2016. What determines direction of asymmetry: genes, environment or chance? *Philosophical Transactions B*, 371: 20150417.
- Paloheimo, J.E., Dickie, L.M. 1966. Food and growth of fishes. II. Effects of food and temperature on the relation between metabolism and body weight. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 23: 869-908.
- Panfili, J., de Pontual, H., Troadec, H., Wright, P.J. (Eds.) 2002. *Manual of fish sclerochronology*. Coédition Ifremer-IRD, 464 p.
- Pannella, G. 1971. Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science*, 173(4002): 1124-1127.
- Parisi-Baradad, V., Lombarte, A., García-Ladona, E., Cabestany, J., Piera, J., Chic, Ò. 2005. Otolith shape contour analysis using affine transformation invariant wavelet transforms et curvature scale space representation. *Mar. Freshwater Res.*, 56: 795-804.

- Parpoura, A.C.R., Alexis, M.N. 2001. Effects of different dietary oils in seabass (*Dicentrarchus labrax*) nutrition. *Aquacult. Int.*, 9: 463-476.
- Paul, K., Oeberst, R., Hammer, C. 2013. Evaluation of otolith shape analysis as a tool for discriminating adults of Baltic cod stocks. *J. Appl. Ichthyol.*, 29: 743-750.
- Pauly, D. 2010. Gasping Fish et Panting Squids: Oxygen, Temperature et the Growth of Water-Breathing Animals. International Ecology Institute. Excellence in Ecology: Book 22. ISSN 0932-2205. 216 p.
- Pawson, M.G., Jennings, S. 1996. A critique of methods for stock identification in marine capture fisheries. *Fish. Res.*, 25: 3-4.
- Payan, P., de Pontual, H., Bœuf, G., Mayer-Gostan, N. 2004. Endolymph chemistry and otolith growth in fish. *Comptes Rendus Palevol*, 3: 535-547.
- Payan, P., Edeyer, A., de Pontual, H., Borelli, G., Boeuf, G., Mayer-Gostan, N. 1999. Chemical composition of saccular endolymph and otolith in fish inner ear: lack of spatial uniformity. *The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Biology*, 277(1): 123-131.
- Payne, M.R., Egan, A., Fässler, S.M.M., Hátún, H., Holst, J.C., Jacobsen, J.A., Slotte, A., Loeng, H. 2012. The rise and fall of the NE Atlantic blue whiting (*Micromesistius poutassou*). *Mar. Biol. Res.*, 8: 475-487.
- Pecquerie, L., Fablet, R., de Pontual, H., Bonhommeau, S., Alunno-Bruscia, M., Petitgas, P., Kooijman, S. 2012. Reconstructing individual food and growth histories from biogenic carbonates. *Mar Ecol Prog Ser*, 447: 151-164.
- Person-Le Ruyet, J., Mahé, K., Le Bayon, N., Le Delliou, H., 2004a. Effects of temperature on growth et metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 237: 269-280.
- Person-Le Ruyet, J., Skalli, A., Dulau, B., Le Bayon, N., Le Delliou, H., Robin, J.H., 2004b. Does dietary n-3 highly unsaturated fatty acids level influence the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) capacity to adapt to a high temperature? *Aquaculture*, 242: 571-588.
- Petursdottir, G., Begg, G. A., Marteinsdottir, G. 2006. Discrimination between Icelandic cod (*Gadus morhua* L.) populations from adjacent spawning areas based on otolith growth and shape. *Fisheries Research*, 80: 182-189.
- Pickett, G.D., Pawson M.G. 1994. *Sea Bass. Biology, Exploitation and Conservation*, Chapman and Hall. (Eds.), London.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D. 2016. nlme: Linear et Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3,1-128.
- Pisam, M., Jammet, C., Laurent, D. 2002. First steps of otolith formation of the zebrafish: role of glycogen? *Cell. Tissue Res.*, 310(2): 163-168.

- Pisam, M., Payan, P., LeMoal, C., Edeyer, A., Boeuf, G., Mayer-Gostan, N. 1998. Ultrastructural study of the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts, *Oncorhynchus mykiss* and *Psetta maxima*. *Cell Tissue Res*, 294: 261-270.
- Poisson Caillault, E., Vanhelst, F., Charlet, B., Mahé, K. 2018. Otolith age estimation by Mojette Transform descriptors and machine learning. IOS2018 - 6th International Otolith Symposium 2018. 15 - 20 April Keelung, Taiwan.
- Poisson, F., Fauvel, C. 2009. Reproductive dynamics of swordfish (*Xiphias gladius*) in the southwestern Indian Ocean (Reunion Islet). Part 1: oocyte development, sexual maturity and spawning. *Aquatic Living Resources*, 22: 45-58.
- Polak M., 2003a, *Developmental Instability: Causes and Consequences*, Oxford, Oxford University Press.
- Polak M., 2003b, Introduction. *In Developmental Instability: Causes and Consequences*. 19-23. Oxford, Oxford University Press.
- Ponton, D. 2006. Is geometric morphometrics efficient for comparing otolith shape of different fish species? *Journal of Morphology*, 267: 750-757.
- Popper, A.N., Fay, R.R. 1993. Sound detection and processing by fish: critical review and major research questions. *Brain Behav Evol.*; 41(1): 14-38.
- Popper, A.N., Lu, Z. 2000. Structure-function relationships in fish otolith organs. *Fisheries Research*, 46: 15-25.
- Porch, C., Kleiber, P., Turner, S.C., Sibert, J., Bailey, R.B., Cort, J.L. 1998. The efficacy of VPA models in the presence of complicated movement patterns. *Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT 50*, 591–622.
- Pörtner, H.O., 2010. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.*, 213: 881-893.
- Pörtner, H.O., Knust, R., 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 315: 95-97.
- Powers, A.K., Davis, E.M., Kaplan, S.A., Gross, J.B. 2017. Cranial asymmetry arises later in the life history of the blind Mexican cavefish, *Astyanax mexicanus*. *PLoS ONE*, 12(5).
- Pracheil, B.M., George, R., Chakoumakos, B.C. 2019. Significance of otolith calcium carbonate crystal structure diversity to microchemistry studies. *Rev Fish Biol Fisheries*, 29(3): 569-588.
- Price, T.D., Qvarnström, A., Irwin, D.E. 2003. The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270: 1433-1440.
- Prince, E.D., Goodyear, C.P. 2006. Hypoxia based habitat compression of tropical pelagic fishes. *Fisheries Oceanography*, 15: 451-464.

- R Development Core Team 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Rabalais, N.N., Turner, R.E., Díaz, R.J., Justić, D. 2009. Global change and eutrophication of coastal waters. *ICES J. Mar. Sci.*, 66: 1528-1537.
- Radhakrishnan, K.V., Yuxuan, L., Jayalakshmy, K.V., Liu, M., Murphy, B.R., Xie, S.G. 2012. Application of otolith shape analysis in identifying different ecotypes of *Coilia ectenes* in the Yangtze Basin. *China. Fish. Res.*, 125: 156-160.
- Radtke, R.L. 1989. Larval fish age, growth, and body shrinkage: information available from otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 1884-1894.
- Radtke, R.L., Shafer, D.J. 1992. Environmental sensitivity of fish otolith microchemistry. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 43: 935-951.
- Ramirez-Pérez, J.S., Quiñónez-Velázquez, C., García-Rodríguez, F.J., Felix-Uraga, R., Melo-Barrera, F.N. 2010. Using the shape of sagitta otoliths in the discrimination of phenotypic stocks in *Scomberomorus sierra* (Jordan et Starks, 1895). *Canadian Journal of Fisheries et Aquatic Sciences*, 5: 82-93.
- Réaumur, R.A. 1735. Observations du thermomètre faites pendant l'année MDCCXXXV comparées à celles qui ont été faites sous la ligne à l'Isle-de-France, à Alger et en quelques-unes de nos Isles de l'Amérique. *Memoires de l'Academie Royal des Sciences*, 545-576.
- Rebaya, M., Ben Faleh, A. R., Allaya, H., Khedher, M., Trojette, M., Marsaoui, B., Fatnassi, M., Chalh, A., Quignard, J. P., Trabelsi, M. 2017. Otolith shape discrimination of *Liza ramada* (Actinopterygii: Mugiliformes: Mugilidae) from marine et estuarine populations in Tunisia. *Acta Ichthyol. Pisc.*, 47(1): 13-21.
- Reibisch, J. 1899. Ueber die Einzahl bei *Pleuronectes platessa* und die Altersbestimmung dieser Form aus den Otolithen. *Helgol Wiss Meeresunters*, 4: 233-248.
- Reichenbacher, B., Feulner, G.R., Schulz-Mirbach, T. 2009. Geographic variation in otolith morphology among freshwater populations of *Aphanius dispar* (Teleostei, Cyprinodontiformes) from the Southeastern Arabian Peninsula. *J. Morphol.*, 270: 469-484.
- Reichenbacher, B., Reichard, M. 2014. Otoliths of five extant species of the annual Killifish *Nothobranchius* from the East African Savannah. *PLoS One* 9, e112459.
- Reichenbacher, B., Sienknecht, U., Küchenhoff, H., Fenske, N. 2007. Combined otolith morphology and morphometry for assessing taxonomy and diversity in fossil and extant killifish (*Aphanius*, *Prolebias*). *J. Morphol.*, 268: 898-915.
- Reimer, T., Dempster, T., Wargelius, A., Gunnar Fjellidal, P., Hansen, T., Glover, K.A., Solberg, M.F., Swearer, S.E. 2017. Rapid growth causes abnormal vaterite formation in farmed fish otoliths. *Journal of Experimental Biology*, 220: 2965-2969
- Reiss, H., Hoarau, G., Dickey-Collas, M., Wolff, W. 2009. Genetic population structure of marine fish: mismatch between biological and fisheries management units. *Fish and Fisheries*, 10: 361-395.

- Renaud, S.M., Thinh, L.V., Lambrinidis, G., Parry, D.L. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211: 195-214.
- Rencher, A.C., Christensen, W.F. 2012. *Methods of multivariate analysis* (3rd edition). New York: Wiley.
- Rittner, D. 2009. *A to Z of scientists in weather and climate*. Facts On File, Incorporated.
- Rohlf, F.J., Archie, J.W. 1984. A Comparison of Fourier Methods for the Description of Wing Shape in Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Syst. Biol.*, 33: 302-317.
- Rohlf, F.J., Bookstein, F.L. 1987. A comment on shearing as a method for size correction. *Systematic Zoology*, 36: 356-367.
- Rohlf, F.J., Slice, D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39: 40-59.
- Rooker, J.R., Alvarado Bremer, J.R., Block, B.A., Dewar, H., De Metrio, G., Corriero, A., Kraus, R.T., Prince, E.D., Rodriguez-Marin, E., Secor, D.H. 2007. Life history and stock structure of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Reviews in Fisheries Science*, 15: 265-310.
- Roos, N. 2016. Freshwater fish in the food basket in developing countries: a key to alleviate undernutrition. *In* : *Freshwater, fish and the future: proceedings of the global crosssectoral conference*, W.W. Taylor, D.M. Bartley, C.I. Goddard, N.J. Leonard, R. Welcomme (Eds.). Rome, FAO, Michigan State University and American Fisheries Society. pp. 35-43.
- Rosenlund, G., Torstensen, B., Stubhaug, I., Usman, N., Sissener, N. 2016. Atlantic salmon require long-chain n-3 fatty acids for optimal growth throughout the seawater period. *J. Nutr. Sci.* 5, 19.
- Rumolo, P., Basilone, G., Fanelli, E., Barra, M., Calabrò, M., Genovese, S., Gherardi, S., Ferreri, R., Mazzola, S., Bonanno, A. 2017. Linking spatial distribution and feeding behavior of Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Strait of Sicily (Central Mediterranean sea). *Journal of Sea Research*, 121: 47–58.
- Russell, E.S., 1931. Some theoretical considerations on the “overfishing” problem, *Conseil Permanent International pour l’Exploitation de la Mer*, 6: 3-20.
- Ryan, A.W., Mattiangeli, V., Mork, J. 2005. Genetic differentiation of blue whiting (*Micromesistius poutassou* Risso) populations at the extremes of the species range and at the Hebrides-Porcupine Bank spawning grounds. *ICES J. Mar. Sci.*, 62: 948-955.
- Sadighzadeh, Z., Tuset, V.M., Valinassab, T., Dadpour, M.R., Lombarte, A. 2012. Comparison of different otolith shape descriptors and morphometrics for the identification of closely related species of *Lutjanus* spp. from the Persian Gulf, *Marine Biology Research*, 8-9: 802-814.
- Sadovy, Y., Severin, K.P. 1994. Elemental patterns in red hind (*Epinephelus guttatus*) otoliths from Bermuda et Puerto Rico reflect growth rate, not temperature. *Can J Fish Aquat Sci*, 51:

133-141.

Schott, F., Xi, S., McCreary, P. 2009. Indian Ocean circulation and climate variability. *Reviews of Geophysics* 47: RG1002: 46 p.

Schreiber, A.M. 2006. Asymmetric craniofacial remodeling and lateralized behavior in larval flatfish. *Journal of Experimental Biology*, 209: 610-621.

Schulz-Mirbach, T., Heß, M., Metscher, B.D., Ladich, F. 2013. A unique swim bladder-inner ear connection in a teleost fish revealed by a combined high-resolution microCT and 3D histological study. *BMC Biology*, 11, 75 p.

Schulz-Mirbach, T., Heß, M., Plath, M. 2011. Inner Ear Morphology in the Atlantic Molly *Poecilia mexicana* - First Detailed Microanatomical Study of the Inner Ear of a Cyprinodontiform Species. 6: e27734.

Schulz-Mirbach, T., Ladich, F., Plath, M., Heß, M. 2019. Enigmatic ear stones: What we know about the functional role and evolution of fish otoliths, *Biological Reviews*, 94(2): 457-482.

Schulz-Mirbach, T., Metscher, B., Ladich, F., 2012. Relationship between Swim Bladder Morphology and Hearing Abilities—A Case Study on Asian and African Cichlids, *PLoS One*, 7(8): e42292.

Sedberry, G., Loefer, J. 2001. Satellite telemetry tracking of swordfish *Xiphias gladius*, off the eastern United States. *Marine Biology*, 139: 355-360.

Shaklee, J.B., Salini, J.P. 1985. Genetic variation and population subdivision in Australian barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). *Australian journal of Marine and Freshwater Research* 36(2): 203-218.

Shaltout, M., Omstedt, A. 2014. Recent sea surface temperature trends and future scenarios for the Mediterranean Sea. *Oceanologia*, 56(3): 411–443.

Sherman, K., Hempel, G. (Eds). 2008. The UNEP large marine ecosystem report: a perspective on changing conditions in LMEs of the world's regional seas. UNEP Regional Seas Report and Studies 182. United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya.

Sherratt, E., Serb, J.M., Adams, D.C. 2017. Rates of morphological evolution, asymmetry and morphological integration of shell shape in scallops. *BMC Evolutionary Biology*, 17: 248.

Simoneau, M., Casselman, J.M., Fortin, R. 2000. Determining the effect of negative allometry (length/height relationship) on variation in otolith shape in lake trout (*Salvelinus namaycush*), using Fourier-series analysis. *Can J Zool*, 78: 1597-1603.

Sinclair, M. 1988. Marine populations: An Essay on Population Regulation and Speciation. Washington Sea Grant Program, Seattle, WA, 252 p.

Sinclair, M.M., Smith, T.D. 2002. The notion that fish species form stocks. ICES Marine Science Symposium, 215: 297-304.

- Sinensky, M. 1974. Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71: 522-525.
- Sininger, Y.S., Cone-Wesson, B. 2004. Asymmetric Cochlear Processing Mimics Hemispheric Specialization, *Science*, 305(5690): 1581.
- Skalli, A., Robin, J.H. 2004. Requirement of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: growth and fatty acid composition. *Aquaculture*, 240: 399-415.
- Skliris, N. 2014. Past, present and future patterns of the thermohaline circulation and characteristic water masses of the Mediterranean sea. *In: The Mediterranean Sea - its History and Present Challenges*, S. Goffredo, and Z. Dubinky.D (Eds.). Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York, London. pp. 29-48.
- Skogen, M.D., Monstad, T., Svenden, E. 1999. A possible separation between a northern and a southern stock of the northeast Atlantic blue whiting. *Fish. Res.*, 41: 119-131.
- Smith, M.K. 1992. Regional differences in otolith morphology of the deep slope red snappers *Etelis carbunculus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 795-804.
- Smoliński, S., Mirny, Z. 2017. Otolith biochronology as an indicator of marine fish responses to hydroclimatic conditions and ecosystem regime shifts. *Ecological Indicators* 79: 286-294.
- Sogard, S.M. 1991. Interpretation of otolith microstructure in juvenile winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): ontogenetic development, daily increment validation, and somatic growth relationships. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48: 1862-1871.
- Söllner, C., Burghammer, M., Busch-Nentwich, E., Berger, J., Schwarz, H., Riekel, C., Nicolson, T. 2003 Control of Crystal Size and Lattice Formation by Starmaker in Otolith Biomineralization. *Science*, 302: 282-286.
- Song, J., Zhao, B., Liu, J., Cao, L, Dou, S. 2019. Comparative study of otolith and sulcus morphology for stock discrimination of yellow drum along the Chinese coast *J. Ocean. Limnol., In press.* <https://doi.org/10.1007/s00343-019-8056-6>
- Stambler, N. 2014. The Mediterranean Sea - Primary Productivity In *The Mediterranean Sea - its History and Present Challenges*, pp. 113-121. Ed. By S. Goffredo, and Z. Dubinky.D Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York, London. 678 pp.
- Standal, D. 2006. The rise and decline of blue whiting fisheries-capacity expansion and future regulations. *Mar. Policy*, 30: 315-327.
- Stewart, T., Albertson, R.C. 2010. Evolution of a unique predatory feeding apparatus: functional anatomy, development and a genetic locus for jaw laterality in Lake Tanganyika scale-eating cichlids. *BMC Biol.*, 8: 8.
- Stormer, D.G., Juanes, F. 2016. Effects of temperature and ration on the otolith-to-somatic size relationship in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): a test of the direct proportionality assumption. *Marine and Freshwater Research*, 67: 913-924.

- Stransky, C., Baumann, H., Fevolden, S.E., Harbitz, H.H., Nedreeas, K.H., Salberg, A.B., Skartein, T.H. 2008. Separation of Norwegian coastal cod and Northeast Arctic cod by outer otolith shape analysis. *Fisheries Research*, 90: 26-35.
- Stransky, C., MacLellan, S.E. 2005. Species separation and zoogeography of redfish and rockfish (genus *Sebastes*) by otolith shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62: 2265-2276.
- Strauss, R.E., Bookstein, F.L. 1982. The TRUSS: body form reconstructions in morphometrics. *Systematic Zoology*, 31: 113-135.
- Sturrock, A.M., Hunter, E., Milton, J.A., Johnson, R.C., Waring, C.P., Trueman, C.N. 2015. Quantifying physiological influences on otolith microchemistry. *Methods Ecol Evol*, 6: 806-816.
- Sun, C.L., Wang, S.P., Yeh, S.Z. 2002. Age and growth of the swordfish (*Xiphias gladius* L.) in the waters around Taiwan determined from anal-fin rays. *Fishery Bulletin*, 100: 822-835.
- Sund, P.R., Blackburn, M., Williams, F. 1981. Tunas and their environment in the Pacific Ocean: a review. *Oceanography and Marine Biology - An Annual Review*, 19: 443-512.
- Sundby, S. 2000. Recruitment of Atlantic cod stocks in relation to temperature and advection of copepod populations. *Sarsia*, 85: 277-298.
- Swan, S.C., Geffen, A.J., Morales-Nin, B., Gordon, J.D.M., Shimmield, T., Sawyer, T., Massutí, E. 2006. Otolith chemistry: an aid to stock separation of *Helicolenus dactylopterus* (bluemouth) and *Merluccius merluccius* (European hake) in the Northeast Atlantic and Mediterranean. *ICES Journal of Marine Science*, 63: 504-513.
- Taillebois, L., Barton, D.P., Crook, D.A., Saunders, T., Taylor, J., Hearnden, M., Saunders, R.J., Newman, S.J., Travers, M.J., Welch, D.J., Greig, A., Dudgeon, C., Maher, S., Ovenden, J.R. 2017. Strong population structure deduced from genetics, otolith chemistry and parasite abundances explains vulnerability to localised fishery collapse in a large Sciaenid fish, *Protonibea diacanthus*. *Evolutionary Applications*, doi: 10.1111/eva.12499.
- Takagi, Y., Takahashi, T. 1999. Characterization of Otolith soluble matrix producing cells in the saccular epithelium of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Inner ear. *Anat Rec*, 254(3): 322-329.
- Takagi, Y., Tohse, H., Murayama, E., Ohira, T., Nagasawa, H. 2005. Diel changes in endolymph aragonite saturation rate and mRNA expression of otolith matrix proteins in the trout otolith organ. *Mar Ecol Prog Ser*, 294: 249-256.
- Tanner, S.E., Reis-Santos, P., Cabral, H.N. 2016. Otolith chemistry in stock delineation: A brief overview, current challenges and future prospects. *Fisheries Research* 173: 206-213.
- Thomas, C.D., Cameron, A., Green, R.E., Bakkenes, M., Beaumont, L.J., Collingham, Y.C., Erasmus, B.F.N., de Siqueira, M.F., Grainger, A., Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., van Jaarsveld, A.S., Midgley, G.F., Miles, L., Ortega-Huerta, M.A., Peterson, A.T., Phillips, O.L., Williams, S.E. 2004. Extinction risk from climate change. *Nature*. 427: 145-148.

- Thomas, O.R., Swearer, S.E. 2019. Otolith Biochemistry—A Review, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 27(4): 458-489.
- Thomas, O.R., Swearer, S.E., Kapp, E.A., Peng, P., Tonkin-Hill, G.Q., Papenfuss, A., Roberts, A., Bernard, P., Roberts, B.R. 2019. The inner ear proteome of fish. *FEBS*, J286: 66-81.
- Thompson, P.A., Guo, M.X., Harrison, P.J., Whyte, J.N.C. 1992. Effects of variation in temperature on the fatty-acid composition of 8 species of marine-phytoplankton. *J. Phycol.*, 28: 488-497.
- Tocher, D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.*, 11: 107-184.
- Tohse, H., Saruwatari, K., Kogure, T., Nagasawa, H., Takagi, Y. 2009. Control of polymorphism and morphology of calcium carbonate crystals by a matrix protein aggregate in fish otoliths. *Cryst Growth Des*, 9: 4897-4901.
- Tohse, H., Takagi, Y., Nagasawa, H. 2008. Identification of a novel matrix protein contained in a protein aggregate associated with collagen in fish otoliths. *FEBS Journal*, 275: 2512-2523.
- Toole, C.L., Markle, D.F., Harris, P.M. 1993. Relationships between otolith microstructure, microchemistry, and early life history events in Dover sole, *Microstomus pacificus*. *U.S. Fishery Bulletin*, 91: 732-753.
- Torrecillas, S., Mompel, D., Caballero, M.J., Montero, D., Merrifield, D., Rodiles, A., Robaina, L., Zamorano, M.J., Karalazos, V., Kaushik, S., Izquierdo, M., 2017. Effect of fishmeal and fish oil replacement by vegetable meals and oils on gut health of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 468: 386-398.
- Torres, G.J., Lombarte, A., Morales-Nin, B. 2000. Sagittal otolith size and shape variability to identify geographical intraspecific differences in three species of genus *Merluccius*. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 80: 333-342.
- Tracey, S.R., Lyle, J.M., Duhamel, G. 2006. Application of elliptical Fourier analysis of otolith form as a tool for stock identification. *Fisheries Research*, 77: 138-147.
- Trenkel, V.M., Huse, G., MacKenzie, B., Alvarez, P., Arrizabalaga, H., Castonguay, M., Goñi, N., Grégoire, F., Hátún, H., Jansen, T., Jacobsen, J.A., Lehodey, P., Lutcavage, M., Mariani, P., Melvin, G., Neilson, J.D., Nøttestad, L., Óskarsson, G.J., Payne, M., Richardson, D., Senina, I., Speirs, D.C. 2014. Comparative ecology of widely-distributed pelagic fish species in the North Atlantic: implications for modelling climate and fisheries impacts. *Prog. Oceanogr.*, 129: 219-243.
- Trenkel, V.M., Lorance, P., Fässler, S.M.M., Høines, Å.S. 2015. Effects of density-dependence, zooplankton and temperature on blue whiting *Micromesistius poutassou* growth. *Journal of Fish Biology*, 87(4): 1019-1030.
- Trojette, M., Ben Faleh, A., Fatnassi, M., Marsaoui, B., Mahouachi, N.H., Chalh, A., Quignard, J.-P., Trabelsi, M. 2015. Stock discrimination of two insular populations of

- Diplodus annularis* (Actinopterygii: Perciformes: Sparidae) along the coast of Tunisia by analysis of otolith shape. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 45: 363-372.
- Trudgill, D.L., Honek, A., Li, D., van Straalen, N.M. 2005. Thermal time – concepts and utility. *Ann. Appl. Biol.*, 146(1): 1-14.
- Tuset, V.M., Imondi, R., Aguado, G., Otero-Ferrer, J.L., Santschi, L., Lombarte, A., Love, M. 2015. Otolith patterns of rockfishes from the Northeastern Pacific. *Journal of Morphology*, 276: 458-469.
- Tuset, V.M., Jurada-Ruzafa, A., Otero-Ferrer, J.L., Santamara, M.T.G. 2019. Otolith phenotypic variability of the Blue Jack Mackerel, *Trachurus picturatus*, from the Canary Islands (NE Atlantic): implications in its population dynamic. *Fisheries Research*, 218: 48-58.
- Tuset, V.M., Lombarte, A., González, J.A., Pertusa, J.F., Lorente, M.J. 2003. Comparative morphology of the sagittal otolith in *Serranus* spp. *Journal of Fish Biology*, 63(6): 1491-1504.
- Tuset, V.M., Lozano, I.J., Gonzalez, J.A., Pertusa, J.F., Garcia-Diaz, M.M. 2003. Shape indices to identify regional differences in otolith morphology of comber, *Serranus cabrilla* (L., 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, 19: 88-93.
- Tuset, V.M., Otero-Ferrer, J. L., Gomez-Zurita, J., Venerus, L. A., Stransky, C., Imondi, R., Orlov, A. M., Ye, Z., Santschi, L., Afanasiev, P. K., Zhuang, L., Farre, M., Love, M., Lombarte, A. 2016. Otolith shape lends support to the sensory drive hypothesis in rockfishes. *Journal of Evolutionary Biology*, 29: 2083-2097.
- Ulrich, C., Hemmer-Hansen, J., Boje, J., Christensen, A., Hussy, K., Sun, H.L., Clausen, L.W. 2017. Variability and connectivity of plaice populations from the Eastern North Sea to the Baltic Sea, part II. Biological evidence of population mixing. *Journal of Sea Research*, 120: 13-23.
- Uphoff, C.S., Schoenebeck, C.W., Hoback, W.W., Koupal, Keith D., Pope, K.L. 2013. Degree-day accumulation influences annual variability in growth of age-0 walleye. *Fish. Res.*, 147: 394- 398.
- Valen, L.V. 1962. A Study of Fluctuating Asymmetry. *Evolution*. 16, 125.
- Vasconcelos, J., Vieira, A. R., Sequeira, V., González, J. A., Kaufmann, M., Serrano Gordo, L. 2018. Identifying populations of the blue jack mackerel (*Trachurus picturatus*) in the Northeast Atlantic by using geometric morphometrics et otolith shape analysis. *Fishery Bulletin*, 116(1): 81-92.
- Venables, W.N., Ripley, B.D. 2002. *Modern applied statistics with S* (4th edition). New York: Springer.
- Vergara-Solana, F.J., García-Rodríguez, F.J., De La Cruz-Agüero, J. 2013. Comparing body and otolith shape for stock discrimination of Pacific sardine, *Sardinops sagax* Jenyns, 1842. *Journal of Applied Ichthyology*, 29: 1241-1246.

- Vignon, M. 2012. Ontogenetic trajectories of otolith shape during shift in habitat use: Interaction between otolith growth and environment. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.*, 420-421: 26-32.
- Vignon, M. 2015. Disentangling and quantifying sources of otolith shape variation across multiple scales using a new hierarchical partitioning approach. *Marine Ecology Progress Series*, 534, 163-177.
- Vignon, M. 2018. Short-term stress for long-lasting otolith morphology – Brief embryological stress disturbance can reorient otolith ontogenetic trajectory. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 75(10): 1713-1722.
- Vignon, M. 2019. When the presence of a vateritic otolith has morphological effect on its aragonitic partner: trans-lateral compensation induces bias in microecological patterns in one-side-only vateritic otolith. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* *In press*. [dx.doi.org/10.1139/cjfas-2019-0066](https://doi.org/10.1139/cjfas-2019-0066)
- Vignon, M., Morat, F. 2010. Environmental and genetic determinant of otolith shape revealed by a non-indigenous tropical fish. *Marine Ecology Progress Series*, 411: 231-241.
- Volk, E.C., Schroder, S.L., Fresh, K.L. 1990. Inducement of unique otolith banding patterns as a practical means to massmark juvenile Pacific salmon. *Am Fish Soc Symp*, 7: 203-215.
- Volpedo, A., Echeverría, D.D. 2003. Ecomorphological patterns of the sagitta in fish on the continental shelf off Argentine. *Fisheries Research*, 60: 555-560.
- Volpedo, A.V., Tombari, A.D., Echeverría, D.D. 2008. Eco-morphological patterns of the sagitta of Antarctic fish. *Polar Biology*, 31: 635-640.
- Waddington, C.H. 1942. The canalisation of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, 150: 563.
- Waddington, C.H. 1957. *Strategy of the genes*. New York: MacMillan.
- Wagner, G.P., Booth, G., Bagheri-Chaichian, H. 1997. A population genetic theory of canalization. *Evolution*, 51: 329-347.
- Wang, J.Y. 1960. A critique of the heat unit approach to plant response studies. *Ecology*. 41(4): 785-790.
- Waples, R.S., Gaggiotti, O. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol. Ecol.* 15(6): 1419-1439.
- Ward, R.D. 2000. *Genetics in fisheries management*. *Hydrobiologia*, 420.
- Was, A., Gosling, E., McCrann, K., Mork, J. 2008. Evidence for population structuring of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) in the Northeast Atlantic. *ICES J. Mar. Sci.*, 65: 216-225.
- Was, A., McCrann, K., Gosling, E. 2006. Genetic structure of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) in the northeast Atlantic Ocean. *J. Fish Biol.*, 69: 239-240.

- Weatherley, A.H., Gill, H.S., 1987. The biology of fish growth. Academic Press, Orleto.
- Weisberg, S., G. Spangler, Richmond, L.S. 2010. Mixed effects models for fish growth. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 67: 269-277.
- West-Eberhard, M.J. 2003. Developmental Plasticity and Evolution. Oxford University Press
- Wickham, H. 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.
- Willmore, K.E., Young, N.M., Richtsmeier, J.T. 2007. Phenotypic Variability: Its Components, Measurement and Underlying Developmental Processes. *Evolinary Biology*, 34(3-4): 99-120.
- Willmore, K.E., Young, N.M., Richtsmeier, J.T. 2007. Phenotypic Variability: Its Components, Measurement and Underlying Developmental Processes, *Evol Biol*, 3-4: 99-120.
- Wodtke, E. 1978. Lipid adaptation in liver mitochondrial membranes of carp acclimated to different environ mental temperatures. Phospholipid composition, fatty acid pattern, and cholesterol content. *Biochemica Biophysica Acta*, 529: 280-291.
- Wright, K.J., Higgs, D.M., Cato, D.H., Leis, J.M. 2010. Auditory sensitivity in settlement-stage larvae of coral reef fishes. *Coral Reefs*, 29: 235-243.
- Wright, P.J., Panfili, J., Morales-Nin, B., Geffen, A.J. 2002. Types of calcified structures. A. Otoliths. *In: Manual of Fish Sclerochronology*. J. Panfili, H. de Pontual, H. Troadec, P.J. Wright (Eds). Ifremer-IRD Coédition, Brest, France. pp. 31-57.
- Yabe, H., Ueyanagi, S., Kikawa, S., Watanabe, H. 1959. Study on the life history of the swordfish *Xiphias gladius* Linnaeus. Report of the Nankai Regional Fisheries Research Laboratory, 10: 107-150.
- Yu, X., Cao, L., Liu, J., Zhao, B. B., Shan, X., Dou, S. 2014. Application of otolith shape analysis for stock discrimination et species identification of five goby species (Perciformes: Gobiidae) in the northern Chinese coastal waters. *Chinese Journal of Oceanology et Limnology*, 32(5): 1060-1073.
- Zahn, C.T., Roskies, R.Z. 1972. Fourier descriptors for plane closed curves. *IEEE Transactions on computers*, 100(3): 269-281.
- Zhang, C., Ye, Z., Li, Z., Wan, R., Ren, Y., Dou, S. 2016. Population structure of Japanese Spanish mackerel *Scomberomorus niphonius* in the Bohai Sea, the Yellow Sea and the East China Sea: evidence from retom forests based on otolith features. *Fisheries Science*, 82: 251-256.
- Zilanov, V.K. 1968. Some data on the biology of *Micromesistius poutassou* (Risso) in the North-east Atlantic. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. Int. Explor. Mer*, 158: 116-122.

ANNEXE I : liste des publications au cours de la thèse

1. **Mahé Kelig**, Ider D., Massaro A., Hamed O., Jurado-Ruzafa A., Gonçalves P., Anastasopoulou A., Jadaud A., Mytilineou C., Reton M., Elleboode R., Morell A., Ramdane Z., Smith J., Bekaert K., Amara R., de Pontual H., Ernande B., 2019. Directional bilateral asymmetry in fish otolith: is it a potential tool to evaluate the stock boundaries? *In* : Lestrel P.E. (Ed.) Biological Shape Analysis: Proceedings of the 5th International Symposium of Biological Shape Analysis. World Scientific, Pub Singapore and New Jersey, USA: In press
2. Mounicou S., Frelon S., Le Guernic A., Eb-Levadoux Y., Camilleri V., Fevrier L., Pierrisnard S., Carasco L., Gilbin R., **Mahé Kelig**, Tabouret H, Bareille G., Simon O. (2019). Use of fish otoliths as a temporal biomarker of field uranium exposure. *Science of The Total Environment*, 690, 511-521.
3. **Mahe Kelig**, Ider D., Massaro E., Hamed O., Jurado-Ruzafa A., Goncalves P., Anastasopoulou A., Jadaud A., Mytilineou C., Elleboode R., Ramdane Z., Bacha M., Amara R., de Pontual H., Ernande B. (2019). Directional bilateral asymmetry in otolith morphology may affect fish stock discrimination based on otolith shape analysis. *ICES Journal of Marine Science*, 76(1), 232-243. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsy163>
4. Hamed O., Dufour J.L., Chakroun-Marzouk N., **Mahe Kelig** (2019). Age, growth and mortality of the starry weever *Trachinus radiatus* Cuvier, 1829 in the Tunisian waters. *Cahiers De Biologie Marine*, 60(1), 87-94. <https://doi.org/10.21411/CBM.A.CEC1B791>

5. Delerue-Ricard S., Hanna S., Barbut L., Morat F., **Mahe Kelig**, Hablützel P.I., Hostens K., Volckaert F. (2019). Size-effect, asymmetry, and small-scale spatial variation in otolith shape of juvenile sole in the Southern North Sea. *Hydrobiologia In Press*. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3736-3>
6. **Mahe Kelig**, Bellamy E., Delpech J.P., Lazard C., Salaun M., Verin Y., Coppin F., Travers-Trolet M. (2018). Evidence of a relationship between weight and total length of marine fish in the North-eastern Atlantic Ocean: physiological, spatial and temporal variations. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98(3), 617-625.
7. Chater I., Romdhani-Dhahri A., Dufour J.L., **Mahe Kelig**, Chakroun-Marzouk N. (2018). Age, growth and mortality of *Sciaena umbra* (Sciaenidae) in the Gulf of Tunis. *Scientia Marina*, 82(1), 17-25.
8. Boufersaoui S., Kassar A., Mokrane Z., Elleboode R., **Mahe Kelig** (2018). Age and growth of the striped seabream, *Lithognathus mormyrus* (Actinopterygii: Perciformes: Sparidae), in the central coast of Algeria, Mediterranean Sea. *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*, 48(4), 319-328.
9. Simon V., Elleboode R., **Mahe Kelig**, Legendre L., Ornelas-Garcia P., Espinasa L., Retaux S. (2017). Comparing growth in surface and cave morphs of the species *Astyanax mexicanus*: insights from scales. *Evodevo*, 8, 23: 1-13.
10. Guillaud E., Elleboode R., **Mahe Kelig**, Bearez P. (2017). Estimation of Age, Growth and Fishing Season of a Palaeolithic Population of Grayling (*Thymallus thymallus*) Using Scale Analysis. *International Journal of Osteoarchaeology*, 27(4), 683-692.
11. Denis J., **Mahe Kelig**, Tavernier E., Monchy S., Vincent D., Vallet C., Marchal P., Antajan E., Caboche J., Lefebvre V., Cordier R., Loots C. (2017). Ontogenetic

- changes in the larval condition of Downs herring: use of a multi-index approach at an individual scale. *Marine Biology*, 164(7), 154: 1-14.
12. Barrios A., Ernande B., **Mahe Kelig**, Trenkel V., Rochet M.J. (2017). Utility of mixed effects models to inform the stock structure of whiting in the Northeast Atlantic Ocean. *Fisheries Research*, 190, 132-139.
13. Cresson P., Rouquette M., Marco-Miralles F., Dufour J.L., Causse R., Bouchoucha M., **Mahe Kelig** (2017). Lost in the North: The first record of *Diretmichthys parini* (Post et Quéro, 1981) in the northern North Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 115(1-2), 439-443.
14. **Mahe Kelig**, Aumond Y., Rabhi K., Elleboode R., Bellamy E., Huet J., Gault M., Roos D. (2017). Relationship between somatic growth and otolith growth: a case study of the ornate jobfish *Pristipomoides argyrogrammicus* from the coast of Réunion (SW Indian Ocean). *African Journal of Marine Science*, 39(2), 145-151.
15. Ider D., Ramdane Z., **Mahe Kelig**, Dufour J.L., Bacha M., Amara R. (2017). Use of otolith-shape analysis for stock discrimination of *Boops boops* along the Algerian coast (southwestern Mediterranean Sea). *African Journal of Marine Science*, 39(3), 251-258.
16. Hamed O., **Mahe Kelig**, Chakroun-Marzouk N. (2017). Somatic growth, condition and form factor of *Trachinus Draco* Linnaeus, 1758 in the Gulf of Tunis. *Bulletin de l'Institut national des sciences et technologies de la mer*, 44, 11p.
17. Gonçalves P., **Mahe Kelig**, Elleboode R., Chantre C., Murta A., Avila De Melo A., Cabral H. (2017). Blue whiting otoliths pair's symmetry side effect. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(3 Part A), 06-09.

18. Mille T., **Mahe Kelig**, Cachera M., Villanueva C.M., de Pontual H., Ernande B. (2016). Diet is correlated with otolith shape in marine fish. *Marine Ecology Progress Series*, 555, 167-184.
19. **Mahe Kelig**, Elleboode R., Loots C., Koubbi P. (2016). Growth of an Inshore Antarctic fish, *Trematomus newnesi* (Nototheniidae), off Adelie Let. *Polar Science*, 10(2), 167-172.
20. Cresson P., Fabri M.C., Miralles F.M., Dufour J.L., Elleboode R., Sevin K., **Mahe Kelig**, Bouchoucha M. (2016). Variability of PCB burden in 5 fish and sharks species of the French Mediterranean continental slope. *Environmental Pollution*, 212, 374-381.
21. **Mahe Kelig**, Oudard C., Mille T., Keating J.P., Gonçalves P., Clausen L.W., Petursdottir G., Rasmussen H., Meland E., Mullins E., Pinnegar J.K., Hoines A., Trenkel V. (2016). Identifying blue whiting (*Micromesistius poutassou*) stock structure in the Northeast Atlantic by otolith shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 73(9), 1363-1371.
22. **Mahe Kelig**, Rabhi K., Bellamy E., Elleboode R., Aumond Y., Huet J., Cresson P., Roos D. (2016). Growth of the oblique-beted grouper (*Epinephelus radiatus*) on the coasts of Reunion Islet (SW Indian Ocean). *Cybium*, 40(1), 61-65.
23. **Mahe Kelig**, Rabhi K., Bellamy E., Elleboode R., Aumond Y., Huet J., Roos D. (2016). Comparison between the opercular bones, the scales and the otoliths to investigate the growth of the brilliant pomfret (*Eumegistus illustris*) off the coast of Reunion Islet (SW Indian Ocean). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(1 Part C), 176-179.

24. **Mahe Kelig**, Evano H., Mille T., Muths D., Bourjea J. (2016). Otolith shape as a valuable tool to evaluate the stock structure of swordfish *Xiphias gladius* in the Indian Ocean. *African Journal of Marine Science*, 38(4), 457-464.

ANNEXE II : liste des présentations lors de colloques au cours de la thèse

1. Reton, M., Le Pape O., Ernande B., **Mahé K.**, Volckaert, F., Petit E., Lassalle Gilles, Le Berre T., Martin, N., Reveillac, E., 2019. Coupling individual natural tracers to assess the connectivity within a flatfish metapopulation, 5th International Sclerochronology Conference. 16-20th June 2019. Split
2. de Pontual, H., Tabouret, H., **Mahé, K.**, Le Luherne, E., Daverat, F., Pecheyran, C., 2019. Asymmetry of otolith chemical composition from 2D mapping: relationship with biomineralisation mechanisms and implications for microchemistry analyses. 5th International Sclerochronology Conference. 16-20th June 2019. Split
3. Poisson Caillault, E., Vanhelst, F., Charlet, B., **Mahé, K.**, 2018. Otolith age estimation by Mojette Transform descriptors and machine learning. 6th International Otolith Symposium, 15 - 20 April 2018, Taiwan
4. Akkuş, G., Jemaa, S., Gucu, A.C., Marchal, P., Carbonara, P., Bacha, M., Amara, R., Ernande, B., Saraux, C., **Mahé, K.**, 2018. Understating the Population Structure of the European Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Black Sea, Mediterranean Sea et Northeast Atlantic Ocean by Using Otolith Shape Analysis. 6th International Otolith Symposium, 15 - 20 April 2018, Taiwan
5. **Mahé, K.**, Gourtay, C., Bled Defruit, G., Chantre, C., de Pontual, H., Amara, R., Claireaux, G., Audet, C., Zambonino-Infante, J.L., Ernande, B., 2018. Do environmental conditions (temperature and food composition) affect otolith shape during fish earlylife stages? An experimental approach applied to European seabass (*Dicentrarchus labrax*). 6th International Otolith Symposium, 15 - 20 April 2018, Taiwan

6. Hamed, O, Chakroun-Marzouk N., **Mahé K.**, 2018. Structure démographique de deux Trachinidae des côtes tunisiennes. VIIème Rencontres de l'Ichtyologie en France, 27-30 mars 2018, Paris
7. Boufersaoui, S., Mokrane, Z., Elleboode, R., **Mahé, K.**, 2018. Age, growth et mortality of red porgy, *Pagrus pagrus*, from the central coasts of Algeria. Fish Forum 2018. 10-14 Décembre 2018, Rome
8. **Mahé K.**, Ider D., Massaro A., Hamed O., Jurado-Ruzafa A., Gonçalves P., Anastasopoulou A., Jadaud A., Mytilineou C., Elleboode R., Ramdane Z., Amara R., de Pontual H., Ernande B., Can otolith morphology asymmetry influence fish stock identification based on otolith shape analysis? 5e International Symposium of Biological shape Analysis, University of Tokyo, 23-26 2017, Tokyo
9. Hamed, O., **Mahé K.**, Elleboode, R., Chakroun-Marzouk, N., 2017. Age et Croissance de *Trachinus draco* Linnaeus, 1758 du Golfe de Tunis (Méditerranée centrale). 4^{ième} Rencontres Tuniso-Française d'Ichtyologie, Tunis, 18-20 mars 2017.
10. Dufour, E., Coudert, L., Lesur, J., Gosselin, M., **Mahé, K.**, Elleboode, R., Gutherz X., Cauliez, J., 2017. Timing of fishing of *Tilapia*... but which one?, 19th FRWG Meeting : Fish et Fishing Communities, Sardinia 2017.

ANNEXE III : Utilisation de l'asymétrie comme potentiel outil de discrimination des stocks

Mahé K., Ider D., Massaro A., Hamed O., Jurado-Ruzafa A., Gonçalves P., Anastasopoulou A., Jadaud A., Mytilineou C., Reton M., Elleboode R., Morell A., Ramdane Z., Smith J., Bekaert K., Amara R., de Pontual H., Ernande B., 2019. Directional bilateral asymmetry in fish otolith: is it a potential tool to evaluate the stock boundaries? *In* : Lestrel P.E. (Ed.) Biological Shape Analysis: Proceedings of the 5th International Symposium of Biological Shape Analysis. World Scientific, Pub Singapore and New Jersey, USA: *In press*

9.1 Introduction

Otoliths are calcified structures located in the inner ear cavity of all teleost fish. They are isolated within a semi-permeable membrane and bathed in an endolymphatic fluid. These structures serve as a balance organ and also aid in hearing (Campana, 1999; Campana and Thorrold, 2001). Inner ears (left and right), contain three different pairs of otic sacs (*sacculus*, *utricle* and *lagena*), each containing a different otolith (*sagitta*, *lapillus* and *asteriscus*) (Panfili *et al.*, 2010). Otoliths show incremental structures with periodicity over time as they grow throughout the life of the fish and, unlike scales and bones, are metabolically inert (i.e. once deposited, otolith material is unlikely to be resorbed or altered (Casselman, 1987). Consequently, otoliths have been primarily used as tool for age determination in many fish species thanks to the ability to track growth periodicity, from the daily to annual growth increments. Moreover, otolith shape remains unaffected by the short-term changes in fish condition (Campana and Casselman, 1993) or environmental variations (Campana, 1999). Accordingly, the shape of the otolith have been used as a tool to identify the species, to reconstruct the composition of the diet of predators (fish, seabird, seal etc.) and to discriminate fish stocks. Since Campana and Casselman (1993), many fishery scientists have developed this type of analysis for stock discrimination studies, as a base for understanding fish population dynamics and achieving reliable assessments for fishery management (Reiss

et al., 2009). As a result, 91 papers were published from 1993 to 2017 on the identification of marine fish populations or stock structure using otolith shape.

The shape of a fish otolith depends on its genotype, on the influence of environmental factors during its life (both biotic and abiotic) and on its stage of development (fish size, age, sex and sexual maturation) (Castonguay *et al.*, 1991, Lombarte and Leonart, 1993; Cadrin and Friedland, 1999; Begg and Brown, 2000; Cardinale *et al.*, 2004; Gagliano and McCormick, 2004; Monteiro *et al.*, 2005; Swan *et al.*, 2006; Mérigot *et al.*, 2007; Hüsey, 2008; Vignon and Morat, 2010; Capoccioni *et al.*, 2011; Mille *et al.*, 2016). Our review of the 91 published papers on marine fish stock identification based on the otolith shape showed that only 20 of them were estimating the asymmetry of both the right and the left otoliths. Among 18 tested species, only the 50% showed significant asymmetry between otoliths shape.

In general, patterns of asymmetry in fish otoliths are classified in three types of asymmetries (Fig. 41).

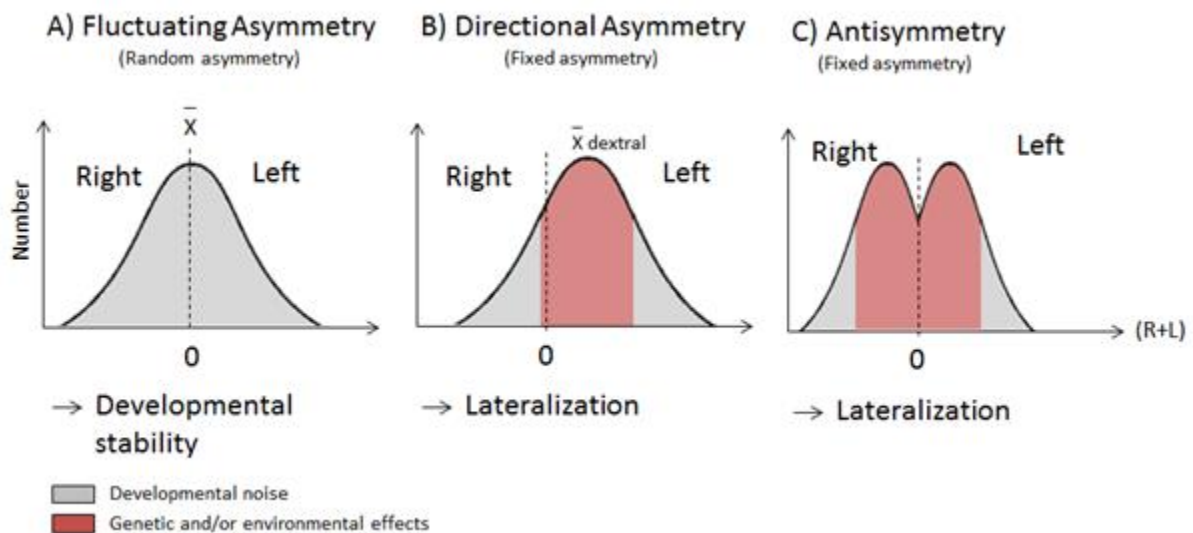


Figure 41 : Categories of asymmetry : A) Fluctuating Asymmetry represented by minor non-directional deviations from perfect symmetry limited by canalization process and the result of developmental noise, **B) Directional Asymmetry** or lateralization process fixed on the same side and depends on its genotype, on the influence of environmental (biotic et abiotic) factors during its life, **C) Antisymmetry** or lateralization process fixed on the side which varies randomly among individuals

Fluctuating asymmetry is the result of random deviations from perfect bilateral (Lemberget and McCormick, 2009; Diaz-Gil *et al.*, 2015) and it is usually associated with stress and/or environmental heterogeneity (Downhower *et al.*, 1990; Lemberget and McCormick, 2009, Diaz-Gil *et al.*, 2015, Green *et al.*, 2017). Lemberget and McCormick (2009) suggested that fluctuating asymmetry could be considered as a sensitive indicator of fish health and directly affect the fish performance because otoliths are essential to balance and hearing. Asymmetry, which consistently favours one side across an individual group, is referred to as directional asymmetry. Directional asymmetry characterizes the consistent greater development of one side of the inner ear among individuals in a population. In this context, the objectives of the present study were to explore (1) if the otolith directional asymmetry shape is observable within the species, (2) if the phenomenon could demonstrate spatial variation among the study area. Our study species were the common sole (*Solea solea*, Linnaeus, 1758) and the bogue (*Boops boops*, Linnaeus, 1758), important commercial species for Eastern part of Atlantic Ocean (Carpentier *et al.*, 2009) and Mediterranean Sea (FAO, 2016), respectively.

9.2 Materials and methods

9.2.1 Sample collection

A total of 2991 pairs of sagittal otoliths (left and right) were extracted from the bogue (n=560) with a size range of 13 to 26 cm total length (TL) (18.38 ± 2.63 cm - mean \pm SE) and the common sole (n= 2431) with a size range of 9 to 34 cm TL (27.43 ± 9.62 cm). Fish were collected from 17 different locations (Fig. 42 and Tab. 21).

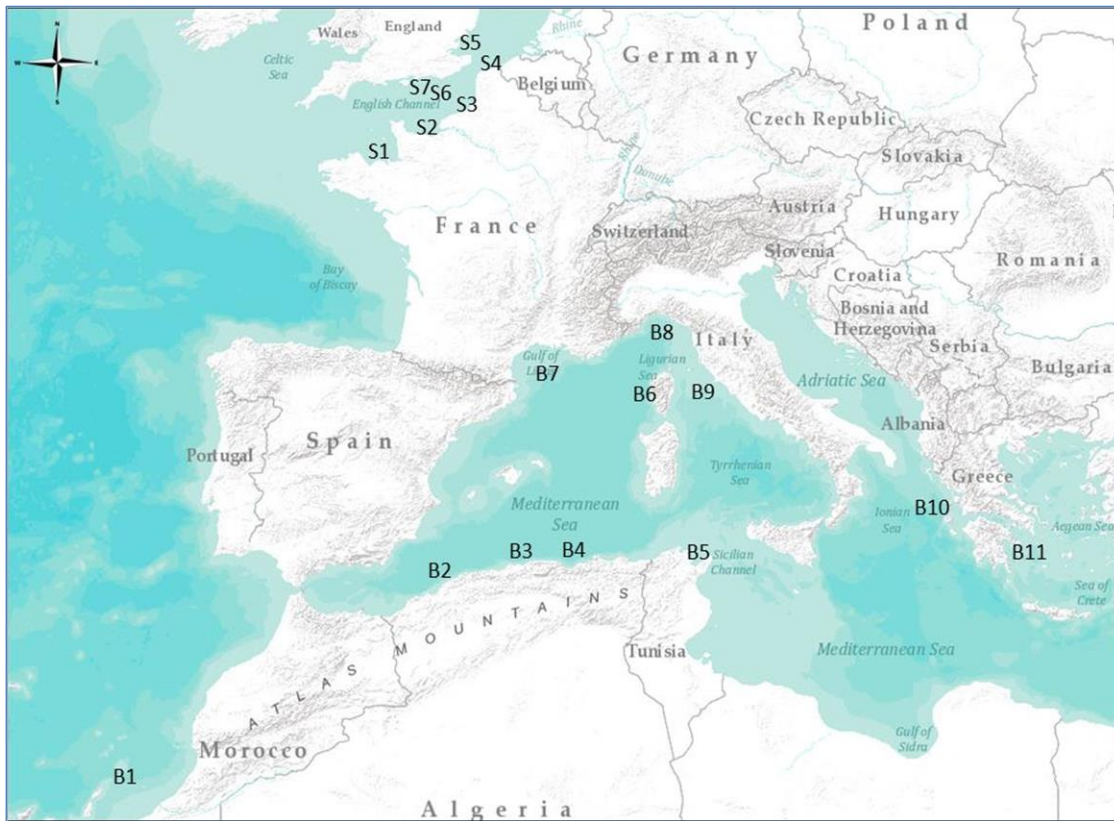


Figure 42: Map of sampling locations by species The Boops boops samplings are B1: Tenerife Island; B2: Gulf of Oran, B3: Gulf of Bejaia, B4: Gulf of Annaba, B5: Gulf of Tunis, B6: Corsica Island, B7: Gulf of Lion, B8: Ligurian Sea, B9: Tyrrhenian Sea, B10: Ionian Sea, B11: Aegean Sea. The Solea solea samplings are S1: Mont Saint Michel Bay, S2: Bay of Seine, S3: Bay of Somme, S4: French Coast of the North Sea, S5: Thames estuary, S6: Central area of the Eastern Channel, S7: English coast of the Eastern Channel.

Table 21: Fish Number sampled by species and geographical area. Total length characteristics (mean \pm SD) are given for each sample.

Species	Geographical area		Number	Total length (cm) mean \pm se
<i>Boops boops</i>	B1	Tenerife Island	67	19.00 \pm 0.93
	B2	Gulf of Annaba	40	19.12 \pm 4.52
	B3	Gulf of Bejaia	92	15.06 \pm 1.70
	B4	Gulf of Oran	47	15.50 \pm 0.71
	B5	Gulf of Tunis	48	18.50 \pm 1.02
	B6	Corsica Island	41	18.50 \pm 1.91
	B7	Gulf of Lion	54	21.00 \pm 4.69
	B8	Ligurian sea	50	19.00 \pm 1.74
	B9	Tyrrhenian sea	59	18.82 \pm 2.07
	B10	Ionian Sea	35	16.80 \pm 2.86
	B11	Aegean Sea	27	20.75 \pm 0.71
<i>Solea solea</i>	S1	Mont Saint Michel Bay	476	29.04 \pm 8.21
	S2	Bay of Seine	251	19.83 \pm 7.75
	S3	Bay of Somme	581	27.38 \pm 4.60
	S4	French Coast of the North Sea	402	30.33 \pm 2.50
	S5	Thames estuary	297	28.71 \pm 5.75
	S6	Central area of the Eastern Channel	125	22.63 \pm 7.04
	S7	English coast of the Eastern Channel	299	29.04 \pm 2.02

Bogue samples were collected from the Canary Islands to the Aegean Sea between 2013 and 2016 and common sole samples were collected from the western English Channel to the southern North Sea during 2017. Sampling was supported by 8 research institutes (Institut

Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer - IFREMER, France; Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science - CEFAS, U.K. England, Institute for agricultural and fisheries research - ILVO, Belgium, University Abderrahmane Mira, Algeria; APLYSIA institute, Italy; University of Tunis, Tunisia; Instituto Español de Oceanografía - IEO, Spain; Hellenic Centre for Marine Research-HCMR, Greece) worked during four international surveys (Beam Trawl Survey : BTS, International Bottom Trawl Survey : IBTS; Channel Ground Fish Survey : CGFS, international bottom trawl survey in the Mediterranean sea : MEDITS). Samples were collected on board fishing vessels and from fish markets. The age range of fish sampled was limited from two to five years to limit the bias of age on the otolith shape.

9.2.2 Otolith shape analysis

A calibrated high-resolution image (3.200 dpi) of the proximal face of the whole left and right sagittal otolith was obtained using a scanner with reflected light (Epson V750). Within this process, a fixed single magnification was used to ensure as high resolution as possible. Images were processed using the image analysis system TNPC (Digital processing for calcified structures, version 7) with the *sulcus acusticus* facing up. In order to compare left and right otolith shapes, mirror images of left otoliths were used.

To describe the external contour of otoliths, several techniques have been developed: univariate descriptors (e.g. shape factors such as roundness, or circularity; e.g. Tuset *et al.*, 2003), the geometric morphometric analyses (e.g. Ponton, 2006; Ramirez-Perez *et al.*, 2010; Vergara-Solana *et al.*, 2013), wavelet functions (Parisi-Baradad *et al.*, 2005; Sadighzadeh *et al.*, 2014), growth markers (Benzinou *et al.*, 2013) and the geodesic method (Benzinou *et al.*, 2013). However, the elliptical Fourier analysis (EFA) remains the most widely used and robust method to describe otolith shape. An Elliptic Fourier Analysis (e.g. Lestrel, 2008) was carried out on each otolith contour delineated and extracted after image binarization. All

Elliptic Fourier Descriptors (EFD) were obtained by using TNPC 7 software. For each otolith, the first 99 elliptical Fourier harmonics (H) were extracted and normalised with respect to the first harmonic and were, thus, invariant to otolith size, rotation and starting point of contour description (Kuhl and Giardina, 1982). To determine the number of harmonics required to reconstruct the otolith outline, the cumulated Fourier Power (F) was calculated for each individual otolith as a measure of the precision of contour reconstruction obtained with n_k harmonics (i.e. the proportion of variance in contour coordinates accounted for by the n_k harmonics):

$$F_{(n_k)} = \sum_{i=1}^{n_k} \frac{A_i^2 + B_i^2 + C_i^2 + D_i^2}{2}$$

Where A_i , B_i , C_i and D_i are the coefficients of the H_i harmonic. $F_{(n_k)}$ and n_k were calculated for each individual otolith k in order to ensure that each individual otolith in the sample was reconstructed with a precision of 99.99% (Lestrel, 2008). The maximum number of harmonics $n = \max(n_k)$ across all otoliths was then used to reconstruct each individual otolith of the sample.

9.2.3 Statistical analyses

Asymmetry between left and right otolith shape was analysed as the effect of inner ear location (side, thereafter) on otolith shape. Firstly, Principal Components Analysis (PCA) was applied to selected EFDs matrix (EFDs as columns and individual otolith as lines) of otolith contours (Rohlf and Archie, 1984) and a subset of the resulting Principal Components (PCs) was selected as otolith shape descriptors according to the broken stick model (Legendre and Legendre, 1998). The matrix of selected PCs is referred to as “shape matrix” hereafter. This procedure allowed us to decrease the number of variables used to describe otolith shape variability while ensuring that the main sources of shape variation were kept, as well as to avoid co-linearity between shape descriptors (Rohlf and Archie, 1984). Secondly, pRDA was performed on the shape matrix as explained matrix depending on side (left/right) as

potentially influential variable and the individual as a conditioning variable. This type of analysis was carried out for all individuals and after that separately for each sampling location. pRDA is an extension of multiple regression to multivariate response data and an extension of PCA (Legendre and Legendre, 1998), combined with permutation tests (marginal effect, type II; Fox and Weisberg, 2011) on the selected PCs matrix. To visualise differences in otolith shape between right and left sides, an average otolith shape of each side group was rebuilt based on EFDs of the averaged shape. To evaluate the amplitude difference at the level of all individuals and for each sampled location, the percentage of the non-overlapping surface between the right and left otolith shapes, was calculated by reconstructing the shape of both otoliths on the basis of the EFDs for each individual. It was computed relative to the total area and averaged across individuals.

Statistical analyses were performed in R (R Development Core Team, 2016) with ‘Vegan’ (Oksanen *et al.*, 2013), ‘SP’ (Bivand *et al.*, 2013), ‘RGEOS’ (Bivand *et al.*, 2013), ‘MASS’ (Venables and Ripley, 2002) packages.

9.3 Results

Among the 99 Fourier harmonics extracted to describe individual otolith contours, the first 26 harmonics for bogue and the first 28 harmonics for common sole explained at least 99.99% of the variation in otolith contour of each individual and were used for further analysis. After PCA on the EFDs, only the first six PCs for both species were kept for the shape matrix according to the broken-stick model. The pRDA performed on data across all sampling sites detected a significant directional asymmetry between left and right otolith shape ($p=0.018$ for bogue and $p=0.005$ for common sole). The amplitude of directional asymmetry across all sampling sites, measured as the percentage of non-overlapping surface between the right and left otolith shape, were on average equal to 2.77% for bogue and 5.27% for the common sole

(Fig. 43). These two mean values showed significant directional asymmetry for bogue and common sole.

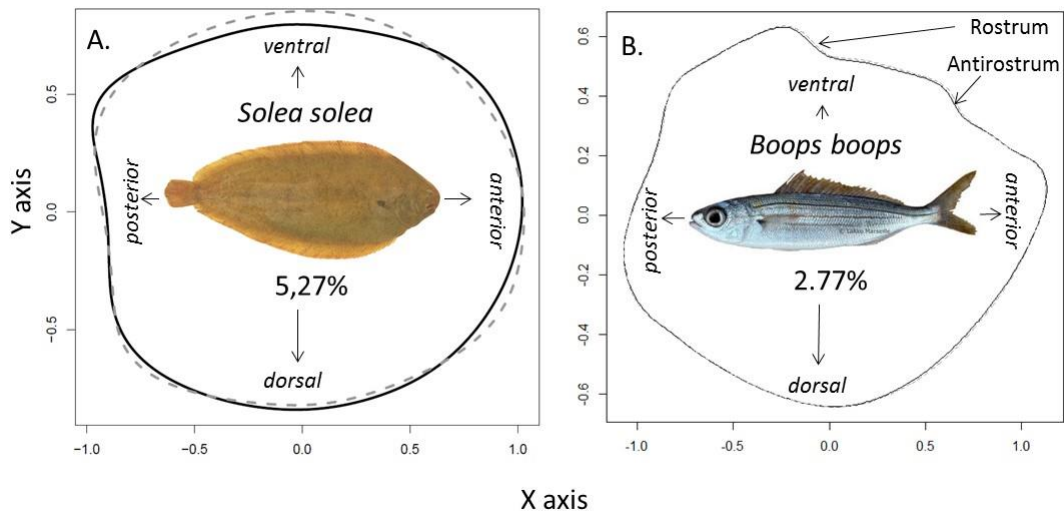


Figure 43: Difference among otolith mean shapes from the left (grey dotted line) and the right (black line) otolith (A: *S. solea*; B: *B. boops*).

In *B. boops*, only 5 out of 11 locations showed significant directional bilateral asymmetry positioned and in only two different areas with the Algerian coasts (B2: Gulf of Oran, B3: Gulf of Bejaia & B4: Gulf of Annaba) and the western part of the Italian Coasts (B8: Ligurian Sea & B9: Tyrrhenian Sea) (Fig. 44). The main shape difference between left and right otoliths was located between the rostrum and the antirostrum. The right otolith was larger than the left otolith in the Ligurian and Tyrrhenian Seas and this phenomenon was reversed in the Gulfs of Oran, Bejaia and Annaba. This type of asymmetry is defined by the antisymmetry.

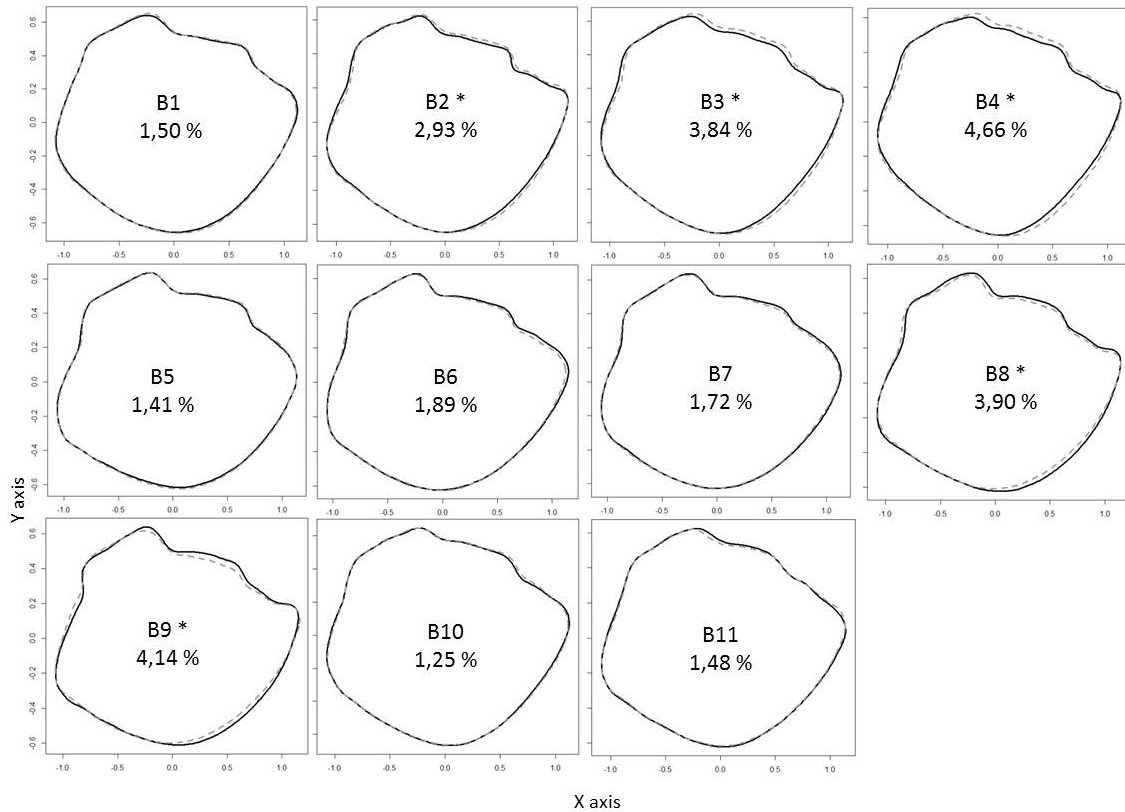


Figure 44 : Difference between right (black line) and left (grey dotted line) otolith shape of Boops boops by each geographical location with the percentage of directional asymmetry (*: significant asymmetry). B1: Tenerife Island; B2: Gulf of Oran, B3: Gulf of Bejaia, B4: Gulf of Annaba, B5: Gulf of Tunis, B6: Corsica Island, B7: Gulf of Lion, B8: Ligurian Sea, B9: Tyrrhenian Sea, B10: Ionian Sea, B11: Aegean Sea.

The level of bilateral asymmetry was bigger in *S. solea* than in *B. boops* individuals. Moreover, all locations showed significant bilateral asymmetry in the same side which characterized the directional asymmetry. The ventral part of the common sole otolith is the main area that showed asymmetry with the left consistently larger than the right otoliths. The asymmetry values varied in terms of amplitude between 3.84% and 6.57% depending on the sampling site (Fig. 45). These asymmetry mean values could be separated in two large areas with the English part of studied area from 3.84% to 4.72% (Thames estuary, Central area of the Eastern Channel & English coast of the Eastern Channel) and the French part of studied area from 5.76% to 6.57% (Mont Saint Michel Bay, Bay of Seine, Bay of Somme and French Coast of the North Sea) (Fig. 45).

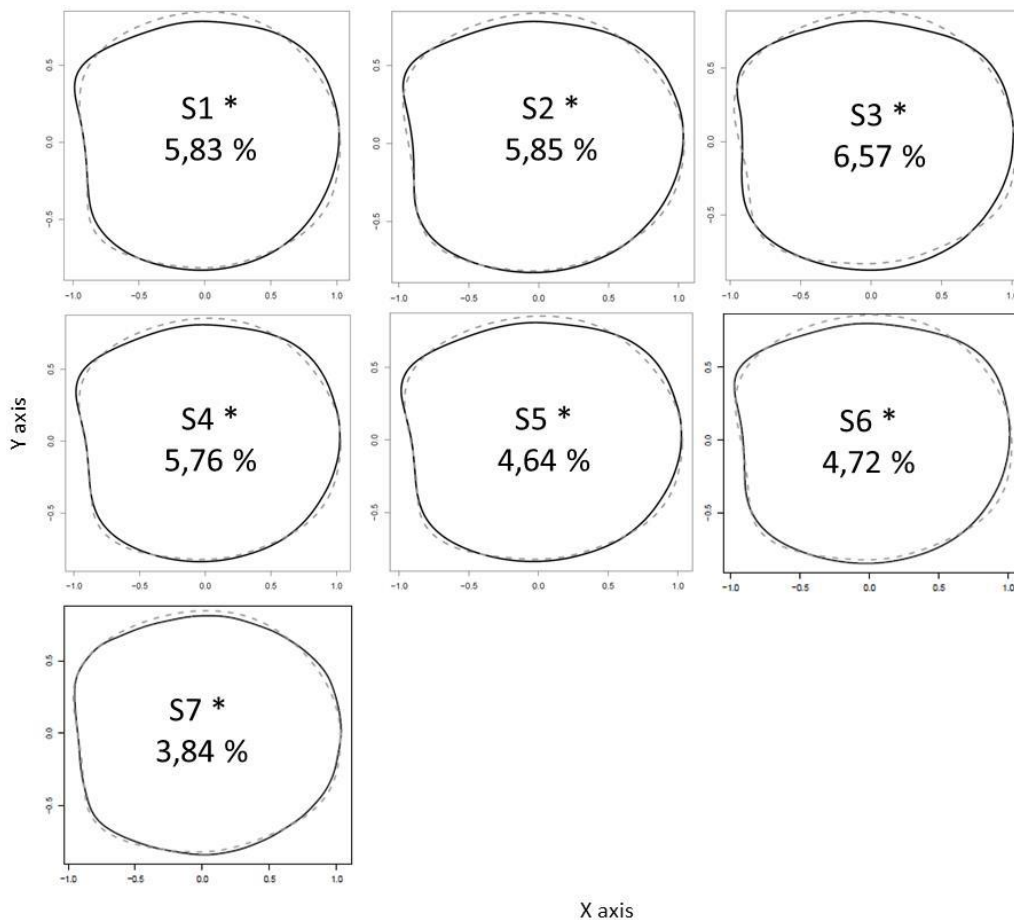


Figure 45: Difference between right (black line) and left (grey dotted line) otolith shape of *Solea solea* by each geographical location with the percentage of directional asymmetry (*: significant asymmetry). S1: Mont Saint Michel Bay, S2: Bay of Seine, S3 : Bay of Somme, S4 : French Coast of the North Sea, S5 : Thames estuary, S6: Central area of the Eastern Channel, S7: English coast of the Eastern Channel.

9.4 Discussion

The otolith shape of fish is frequently used to discriminate the stock units within a species as a consequence of a number of factors such as abiotic environmental parameters (e.g. temperature, salinity), biotic parameters (e.g. prey availability) and genetic (Campana and Casselman, 1993; Cadrin and Friedland, 1999; Torres *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2004; Gagliano and McCormick, 2004; Swan *et al.*, 2006; Vignon and Morat, 2010). Other ontogenetic factors such as fish length (Smith, 1992; Campana and Casselman, 1993; Mérigot *et al.*, 2007), age (Bird *et al.*, 1986), year-class (Castonguay *et al.*, 1991; Campana and

Casselman, 1993; Bolles and Begg, 2000; Mapp *et al.*, 2017), sexual maturity (Campana and Casselman, 1993; Cardinale *et al.*, 2004) and sexual dimorphism (Campana and Casselman, 1993; Bolles and Begg, 2000) could modify the otolith shape too. However, the potential intra-individual factor between the right and left inner as variation source of otolith shape has been very under-studied. In Biology, symmetry in bilaterally symmetrical organisms including vertebrates is consistent to be considered “standard” maintained by homeostasis process (Palmer, 2009). However, numerous studies have documented a consistent asymmetry in human upper limb bones, with right side elements typically being larger, while lower limb bones tend to be more symmetric (Auerbach and Ruff, 2006). Humans preferentially use the right upper limb and many skeletal studies have argued that lateralized behaviours among humans lead to the differences in bone size and shape between sides, especially of the upper limb (Ambrose, 2001). For the otolith shape, the fluctuating asymmetry defined as the random deviations from perfect symmetry between the left and right otoliths, has been reported for some species of both roundfish and flatfish (Lychakov and Rebane, 2005; Lychakov *et al.*, 2008; Lemberget and McCormick, 2009; Lychakov, 2013). The directional asymmetry, for its part, was measured for eighteen fish species. Symmetry between the left and right otoliths showing the two strictly similar parts of the vestibular system, was observed in *Gadus morhua* (Cardinale *et al.*, 2004; Petursdottir *et al.*, 2006), *Synechogobius ommaturus* (Wang *et al.*, 2011), *Coryphaena hippurus* (Duarte-Neto *et al.*, 2008), *Xiphias gladius* (Mahé *et al.*, 2016), *Scomber scombrus* (Castonguay *et al.*, 1991), *Melanogrammus aeglefinus* (Mille *et al.*, 2015), *Mullus barbatus* (Mille *et al.*, 2015), *Clupea harengus* (Mille *et al.*, 2015) and *Lutjanus kasmira* (Vignon and Morat, 2010). Conversely, otolith directional asymmetry, showing the lateralization, was observed for roundfish as *Liza ramada* (Rebaya *et al.*, 2017), *Diplodus annularis* (Trojette *et al.*, 2015), *Diplodus puntazzo* (Bostanci *et al.*, 2016), *Scomberomorus niphonius* (Zhang *et al.*, 2016) and *Merlangius*

merlangus (Mille *et al.*, 2015) and for flatfish as *Solea solea* (Merigot *et al.*, 2007; Mille *et al.*, 2015), *Pleuronectes platessa* (Mille *et al.*, 2015), *Limanda limanda* (Mille *et al.*, 2015) and *Lepidorhombus whiffiagonis* (Mille *et al.*, 2015). This study corroborated the results observed in otolith of common sole and identified the otolith asymmetry of bogues. Directional bilateral asymmetry or antissymmetry in fish otolith could be a result of differences in otolith biomineralisation between the left and right inner ears (Mille *et al.*, 2015). This asymmetry is an indicator for possible dysfunction considering the vestibular sensing (Hilbig *et al.*, 2011). Otolith directional asymmetry affects the acoustic functionality (sensitivity, temporal processing and sound localization) (Lychakov and Rebane, 2005; Lychakov *et al.*, 2008) and kinetic swimming of fish (aberrant movement pattern or static space sickness) (Anken *et al.*, 1998; Beier *et al.*, 2002; Hilbig *et al.*, 2003; Hilbig *et al.*, 2011). As Mille *et al.* (2015), our results showed that the observed level of otolith asymmetry for flatfish is higher than for roundfish. Otolith asymmetry could change during the life of flatfish especially after a cranial deformation and the migration of one eye to the other side caused by cell proliferation in suborbital tissue (Bao *et al.*, 2011). This lateralization process induces the difference of otolith biomineralisation (carbonate accretion rates) with the blind side generally growing faster in length and weight than the other side (Sogard, 1991; Fischer and Thompson, 2004; Helling *et al.*, 2005, Mille *et al.*, 2015). Gravity is probably a source of otolith asymmetry in flatfish too (Schreiber, 2006). *Solea solea* is a dextral species (right-eyed flatfish) showed the right inner ear above the left inner ear. The left otolith shape is larger than the right otolith. Consequently, this study corroborated that the blind side was the location of the widest otolith for flatfish (Merigot *et al.*, 2007; Mille *et al.*, 2015). In conclusion, if directional asymmetry is observed more frequently in the flatfish than roundfish species, there might be environmental patterns other than gravity to explain the degree of otolith shape asymmetry in fish species.

No study examined the fluctuations of directional bilateral asymmetry in fish otoliths according to the geographical origin. The canalization process is defined by the tendency of a specific genotype to follow the same phenotypic trajectory under varied developmental and environmental influences (developmental stability). It limits the potential directional asymmetry. One study showed that the magnitude of asymmetry between the Scallop (*Bivalvia: Pectinidae*) valves shape could be linked to the type of ecomorph and therefore environmental pressures difference (Sherratt *et al.*, 2017). For fish species, molecular investigations have suggested that mandibular asymmetry corresponds to genomic loci (Stewart and Albertson 2010). The morphological asymmetry of scale-eating cichlids in Lake Tanganyika having a genetic basis showed two individual groups (Hata *et al.*, 2013). The directional asymmetry of dental formulae and arch shape identified the hybrids and the parental species of the clonal fish *Chrosomus eos-neogaeus* (Leung *et al.*, 2017). This experimental study showed that left-right asymmetry in dentition and shape of pharyngeal arches reflected phenotypic plasticity. In the same way, one other study focalized on *Astyanax mexicanus* highlighted the directional asymmetry of osteocranial shape to identify the specimen from the cavefish population in comparison with those from the surface population. This difference was not directly associated with eye loss but cave-adapted fish (Powers *et al.*, 2017). Consequently, the directional asymmetry concerning skeletal or calcified structures could be a genetic or/and phenotypic marker for studies on evolution or to discriminate the populations.

For *Boops boops*, significant directional asymmetry was observed for one species associated to some geographical areas, whereas this was not the case for other geographical areas. There are two large areas with the Algerian coasts and the western part of the Italian Coasts showing one directional asymmetry but in the opposite difference between the left and the right otoliths. Consequently, it suggests two specific individual's groups separated by the Strait of

Sicily, one mixed area influenced in the western part by Atlantic Ocean current and conversely, at the eastern part by the Levantine Intermediate Water current (LIW) which moves water masses from east to west (Skiriris, 2014). There are no available data at Mediterranean Sea scale on the stock distribution of *Boops boops*. Ider *et al.* (2017) analyzed the Algerian coasts and identified only one stock for this area as the result of asymmetry in our study. For *Solea solea*, the otolith asymmetry values could be separated in two large areas with the English part *and* the French part of English Channel and Southern North Sea. Archambault *et al.* (2018) who combined the available life cycle (a) larval retention within spawning regions, b) spatial segregation of juveniles inside separated coastal and estuarine nursery grounds, c) limited individual movement at the adult stages, identified three subpopulations of common sole in the Eastern Channel with a separation between the English and the French parts. In conclusion, the directional bilateral asymmetry in fish otolith confirms the conclusion on the stock discrimination from the life history traits and otolith shape.