



HAL
open science

Maturité objective des poissons par l'histologie quantitative

Carine Sauger

► **To cite this version:**

Carine Sauger. Maturité objective des poissons par l'histologie quantitative. Physiologie [q-bio.TO]. Normandie Université, 2024. Français. NNT : 2024NORMC202 . tel-04518472

HAL Id: tel-04518472

<https://theses.hal.science/tel-04518472>

Submitted on 23 Mar 2024

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

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS**

Préparée au sein de l'**Université de Caen Normandie**

Maturité objective des poissons par l'histologie quantitative

Présentée et soutenue par
CARINE SAUGER

Thèse soutenue le 12/01/2024
devant le jury composé de :

M. DANIEL PAULY	Professeur - University of British Columbia	Rapporteur du jury
M. FABRICE TELETCHÉA	Maître de conférences HDR - Université de Lorraine	Rapporteur du jury
M. LAURENT DUBROCA	Cadre de recherche - IFREMER	Membre du jury
MME MARIA CRISTINA FOLLESA	Professeur - CAGLIARI - UNIVERSITA DEGLI STUDI DI	Membre du jury
MME CHRISTELE KELLNER	Maître de conférences HDR - Université de Caen Normandie	Membre du jury
M. BENOIT PLANCOULAINÉ	Professeur émérite - Université de Caen Normandie	Président du jury

Thèse dirigée par **CHRISTELE KELLNER** (Biologie des organismes et écosystèmes aquatiques (Caen))

Avant-propos

Ce travail de thèse s'insère dans le projet *MATurité Objective des poissons par l'histologie quantitative* (MATO), financé sous une convention (PH/2020/14) entre l'*Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer* (Ifremer) et *France Filière Pêche* (FFP) et soutenu par les comités et organisations liés à la pêche professionnelle : From-Nord, CRPMEM Nouvelle-Aquitaine, Comité des pêches de Normandie, AGLIA et la Compagnie des pêches Saint-Malo.

La réalisation de ces travaux a pu se faire au sein de trois laboratoires ou plateformes :

- ✧ *Biologie des ORganismes et Écosystèmes Aquatiques* (BOREA), Université de Caen Normandie
- ✧ *Laboratoire des Ressources Halieutiques de Port-en-Bessin* (LRHPB), Ifremer
- ✧ *Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie* (CMABio3), Université de Caen Normandie

L'acquisition des données supportant ce travail de thèse a été rendue possible grâce aux campagnes halieutiques *Channel Ground Fish Survey* (CGFS), *EValuation Halieutique Ouest de l'Europe* (EVHOE) et *International Bottom Trawl Survey* (IBTS), à la Direction Scientifique d'*Ifremer*, aux Pêcheurs d'Aquitaine, à SN Jeanne Mareyage de Port-en-Bessin et à la SCAPECHE Bretagne Ouest.

Enfin, j'aimerais remercier tous les partenaires de m'avoir permis de travailler sur ce projet.



Remerciements

Pour ceux qui me connaissent, vous m'avez peut-être entendu dire que «je n'aime pas les gens ». Mais quand j'ai dû me poser et écrire cette page, je me suis rendu compte que, finalement, j'avais pas mal de personnes à remercier et que, en toute honnêteté, je les aimais bien.

J'aimerais donc remercier en tout premier lieu, mes deux encadrants : Kristell K. et Laurent D.. Merci à vous de m'avoir accompagnée depuis mon arrivée en terres Normandes, de m'avoir poussée du Master à la Thèse, d'avoir été là en soutien aussi bien moral que physique. Il me faudrait peut-être plusieurs paragraphes pour exprimer pleinement à quel point j'ai été ravie de vous avoir en tant que Directrice et Directeur de cette thèse, donc je vais faire court. A vous deux, a *big thank you!*

J'aimerais, bien évidemment, remercier Nicolas du [CMAbio3](#) pour sa patience, sa bienveillance et ses prouesses en *coding* qui ont rendu les lectures stéréologiques agréables. Ainsi que les membres de mon CSI, Laure P., Bastien M. et Caroline A. pour leur accompagnement hors pair.

J'aimerais aussi remercier toutes ces merveilleuses personnes qui m'ont aidée lors de mes longues heures de manip's, en labo et sur le terrain. Nadège et Sandra pour leur efficacité plus que redoutable au microtome. Les trois techniciens en or de Port-en-Bessin, Sophie, Fanchon et Victor et leur rapidité inégalée dans l'extraction d'otolithes. Finalement merci à Anna et Valentine, pour leur super boulot que j'ai eu la chance de co-encadrer et qui m'ont grandement aidée pour cette thèse.

J'adresse aussi plein de mercis à cette merveilleuse équipe que j'ai eu l'honneur de rencontrer ces dernières années lors du dernier Leg d'[EVHOE](#) (le meilleur Leg, en toute objectivité). Yves, Fanch, Didier, Vévé, Loïc, Séb, Luisa, Nico, Coline... Merci à vous pour vos conseils précieux qui ont fait des fiches ce qu'elles sont aujourd'hui et ce qu'elles seront demain !

Merci aussi à tous les collègues de L'[Ifremer](#) avec lesquels j'ai eu le plaisir d'échanger ces dernières années, notamment Julien pour l'intérêt qu'il a montré pour mes travaux en histologie même si, à la base, cela n'était pas des ovaires de bivalves, mais juste des ovaires de poissons.

Merci aussi aux collègues de [BOREA](#), et surtout à mon "copain de gonades" Fabian, pour toutes ces conversations à refaire le monde de la maturité sexuelle et cette motivation.

Je porte une attention toute particulière à ma famille, qui même loin, était là pour moi. Merci pour votre soutien qui date de ma naissance. Je vous aime fort.

Enfin, à mes amis. Pour votre soutien moral inégalable, votre bonne humeur et tous les bons moments en général. Sweety, Ophé, St Martin, Zone, Momo, Titi, l'équipe ICP ... *I love you guys, thanks for being there for me!*

A tous ceux que j'ai rencontrés, depuis mon arrivée dans les terres pluvieuses Normandes : Merci.

Table des matières

Avant-propos	i
Remerciements	iii
Table des matières	v
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xi
Acronymes	xii
1 Introduction générale	1
1 Contexte Halieutique	3
1.1 Organisation et réglementations	3
1.2 L'évaluation des stocks	7
2 Maturité sexuelle : données et utilisation	8
2.1 Échelle de maturité	9
2.2 Indice gonado-somatique	10
2.3 Méthode " <i>whole mount</i> "	11
2.4 Autres méthodes pour la détermination de la maturité	13
3 Traits d'histoire de vie	14
3.1 La théorie des traits d'histoire de vie	14
3.2 Maturité sexuelle et populations exploitées	15
4 Ovogenèse chez les téléostéens	17
4.1 Les modes de reproduction	17
4.2 Structure et organisation des ovaires	19
4.3 L'ovogenèse	22
4.3.1 Origine des cellules germinales	22
4.3.2 La prolifération des ovogonies	23
4.3.3 La pré-vitellogenèse	23
4.3.4 La vitellogenèse	25
4.3.5 La maturation et l'ovulation	25
4.4 L'atrésie	27
2 Étude macroscopique de la maturité sexuelle pour 4 espèces de téléostéens pêchées en Atlantique Nord-Est	31

1	Introduction	33
1.1	Critères CIEM	33
1.2	Les quatre espèces de téléostéens à l'étude	36
1.3	La plie, <i>Pleuronectes platessa</i> Linnaeus, 1758	36
1.3.1	Biologie	37
1.3.2	Gestion du stock de Manche Est (7d)	38
1.4	Le rouget barbet de roche, <i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus, 1758	39
1.4.1	Biologie	39
1.4.2	Gestion des stocks	41
1.5	La cardine franche, <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> (Walbaum, 1792)	43
1.5.1	Biologie	43
1.5.2	Gestion des stocks	45
1.6	La cardine à quatre taches, <i>Lepidorhombus boscii</i> (Risso, 1810)	46
1.6.1	Biologie	46
1.6.2	Gestion des stocks	48
2	Matériel et Méthodes	50
2.1	Paramètres biologiques	50
2.2	Prises de photographies de gonades	50
2.3	Phases de maturité macroscopique	50
3	Résultats	52
3.1	La plie (<i>Pleuronectes platessa</i>)	52
3.1.1	Échantillonnage	52
3.1.2	Indice gonado-somatique	53
3.1.3	L ₅₀ et A ₅₀	54
3.2	Le rouget barbet de roche (<i>Mullus surmuletus</i>)	54
3.2.1	Échantillonnage	54
3.2.2	Indice gonado-somatique	55
3.2.3	L ₅₀ et A ₅₀	56
3.3	La cardine franche (<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>)	57
3.3.1	Échantillonnage	57
3.3.2	Indice gonado-somatique	57
3.3.3	L ₅₀ et A ₅₀	58
3.4	La cardine à quatre taches (<i>Lepidorhombus boscii</i>)	58
3.4.1	Échantillonnage	58
3.4.2	Pourcentage d'accord entre agents	59
3.4.3	Indice gonado-somatique	60
3.4.4	L ₅₀ et A ₅₀	61
4	Discussion	63
4.1	États des stocks	63
4.2	Échantillonnage	64
4.3	Détermination de la phase de maturité	65
4.4	Indices de maturité	66
4.4.1	Longueur et âge auxquels 50% de la population est sexuellement mature	66
4.4.2	Indice gonado-somatique	68
5	Bilan	70

3	Détermination objective de la maturité : l'histologie quantitative	73
1	Introduction	75
1.1	Échelle de maturité WKASMSFM	75
1.2	L'histologie	77
1.3	La stéréologie	78
1.3.1	Généralités sur la stéréologie	78
1.3.2	Méthode stéréologique d'après Glagolev (1934)	81
1.4	La stéréologie en halieutique	82
2	Matériel et Méthodes	90
2.1	Préparation des lames histologiques	90
2.2	Vérification de l'homogénéité cellulaire	93
2.3	Lexiques descriptifs de l'ovogenèse	93
2.4	Quantification stéréologique	95
2.5	Calibration inter-agents	97
2.6	Classification des phases de maturité	99
2.6.1	Analyses complémentaires - <i>Clustering</i>	100
2.7	Longueur et âge à première maturité	100
3	Résultats	100
3.1	Lexiques pour les lectures stéréologiques	100
3.1.1	Ovogenèse de la plie, <i>Pleuronectes platessa</i> Linnaeus, 1758	101
3.1.2	Ovogenèse du rouget barbet de roche, <i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus, 1758	102
3.1.3	Ovogenèse de la cardine franche, <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> (Walbaum, 1792)	105
3.1.4	Ovogenèse de la cardine à quatre taches, <i>Lepidorhombus boscii</i> (Risso, 1810)	107
3.2	Validation de l'utilisation de l'histologie quantitative	110
3.2.1	Calibration inter-agents	110
3.2.2	Homogénéité cellulaire	110
3.3	Dynamique cellulaire de l'ovogenèse	111
3.3.1	La plie, <i>Pleuronectes platessa</i> Linnaeus, 1758	111
3.3.2	Le rouget barbet de roche, <i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus, 1758	112
3.3.3	La cardine franche, <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> (Walbaum, 1792)	113
3.4	Comparaison des méthodes	115
3.4.1	La plie, <i>Pleuronectes platessa</i> Linnaeus, 1758	115
3.4.2	Le rouget barbet de roche, <i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus, 1758	117
3.4.3	La cardine franche, <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> (Walbaum, 1792)	119
3.5	Mise à disposition des données	122
4	Discussion	124
4.1	Méthode macroscopique	124
4.2	L'histologie	124
4.3	Description des phases cellulaires	125

4.4	La méthode de stéréologie	125
4.4.1	Calibration inter-agents	126
4.4.2	Homogénéité	127
4.5	La dynamique cellulaire	127
4.5.1	La plie, <i>Pleuronectes platessa</i> Linnaeus, 1758	127
4.5.2	Le rouget barbet de roche, <i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus, 1758	128
4.5.3	La cardine franche, <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> (Walbaum, 1792)	128
4.6	Calculs des L_{50} et A_{50} basés sur la stéréologie	129
	Article 1	132
	Article 2	154
	Article 3	184
5	Bilan	224
6	Annexes	228
4	Identification automatique de structures cellulaires par apprentissage supervisé	231
1	Introduction	233
1.1	L'intelligence artificielle (IA)	233
1.2	L'apprentissage automatique	235
1.3	L'intelligence artificielle en halieutique	237
2	Matériel et Méthodes	241
2.1	Échantillonnage et histologie quantitative	241
2.2	Apprentissage supervisé	241
3	Principaux résultats	241
4	Discussion	244
4.1	Données	244
4.2	Segmentation des ovocytes	245
4.3	Apprentissage supervisé sous YOLOv5	246
	Article 4	248
5	Bilan	272
	Conclusion et perspectives	275
	Autres activités en lien avec la formation doctorale, l'enseignement, la vulgarisation, la diffusion des résultats auprès des organisations pro- fessionnelles	282
	Bibliographie	288

Liste des figures

1.1	Carte des divisions CIEM de la zone de pêche FAO 27	4
1.2	Schéma des acteurs et outils mis en place pour la gestion des ressources	5
1.3	Schéma des phases de maturité sexuelle	6
1.4	Schéma des phases de maturité sexuelle	9
1.5	Schéma des types morphologiques d’hermaphrodisme	18
1.6	Schéma d’organes de poisson	20
1.7	Schéma de la structure ovarienne des téléostéens	21
1.8	Photographies de cellules germinales primordiales en microscopie	23
1.9	Schéma d’un follicule ovarien chez les téléostéens	25
1.10	Schéma synthétisant l’ovogenèse et ses contrôles hormonaux chez les téléostéens	27
2.1	Photographie de <i>P. platessa</i>	37
2.2	Distribution géographique de <i>P. platessa</i>	37
2.3	Nombre de captures pour <i>P. platessa</i> du stock de Manche Est	39
2.4	Photographie de <i>M. surmuletus</i>	40
2.5	Distribution géographique de <i>M. surmuletus</i>	41
2.6	Nombre de captures pour <i>M. surmuletus</i> du stock mur.27.43a7d	42
2.7	Nombre de captures pour <i>M. surmuletus</i> du stock mur.27.67a-ce-k89a	43
2.8	Photographie de <i>L. whiffiagonis</i>	44
2.9	Distribution géographique de <i>L. whiffiagonis</i>	44
2.10	Nombre de captures pour <i>Lepidorhombus</i> spp. du stock 27.7b-k8abd	46
2.11	Photographie de <i>L. boscii</i>	46
2.12	Distribution géographique de <i>L. boscii</i>	47
2.13	Nombre de captures pour <i>L. boscii</i> du stock 27.7b-k8abd	48
2.14	Boxplot des indices gonado-somatiques (%) de <i>P. platessa</i> en fonction de la phase de maturité macroscopique	53
2.15	L_{50} A_{50} de <i>P. platessa</i> calculé en fonction de la phase de maturité macroscopique	54
2.16	Boxplot des indices gonado-somatiques (%) de <i>M. surmuletus</i> en fonction de la phase de maturité macroscopique	56
2.17	L_{50} A_{50} de <i>M. surmuletus</i> calculés en fonction de la phase de maturité macroscopique	56
2.18	Indices gonado-somatiques (%) de <i>L. whiffiagonis</i> en fonction de la phase de maturité macroscopique	58

2.19	L ₅₀ A ₅₀ de <i>L. whiffiagonis</i> calculées en fonction de la phase de maturité macroscopique	58
2.20	Boxplote des indices gonado-somatiques (%) de <i>L. boscii</i> en fonction de la phase de maturité macroscopique	61
2.21	L ₅₀ A ₅₀ de <i>L. boscii</i> calculées en fonction de la phase de maturité macroscopique	61
2.22	Schéma des méthodes utilisées pour l'échantillonnage des paramètres biologiques	71
3.1	Sondes stéréologiques et relations d'égalité	80
3.2	Plan de travail pour l'inclusion des pièces en paraffine	90
3.3	Ovocyte à alvéoles corticales coloré au bleu alcian - PAS	91
3.4	Schéma décrivant le principe de la vérification de l'homogénéité cellulaire	94
3.5	Interface du logiciel QuPath avec grille d'échantillonnage stéréologique	96
3.6	Schéma décrivant le processus de calibration inter-agents	97
3.7	Évaluation visuelle des résultats lors de la calibration	98
3.8	Arbre de décision pour l'identification des stades cellulaires	101
3.9	Longueur des cellules de la lignée germinale femelle de <i>P. platessa</i>	102
3.10	Longueur des cellules de la lignée germinale femelle de <i>M. surmuletus</i>	103
3.11	Résumé des critères pour l'identification des stades cellulaires de <i>M. surmuletus</i>	104
3.12	Longueur des cellules de la lignée germinale femelle de <i>L. whiffiagonis</i>	105
3.13	Résumé des critères pour l'identification des stades cellulaires de <i>L. whiffiagonis</i>	106
3.14	Longueur des cellules de la lignée germinale femelle de <i>L. boscii</i>	107
3.15	Résumé des critères pour l'identification des stades cellulaires de <i>L. boscii</i>	108
3.16	<i>P. platessa</i> dans le temps	111
3.17	<i>M. surmuletus</i> classés par date d'échantillonnage, longueur (cm) et phase de maturité	113
3.18	Pourcentages moyen (%) des cellules de la lignée germinale retrouvées dans les ovaires de <i>L. whiffiagonis</i>	114
3.19	<i>L. whiffiagonis</i> classés par date d'échantillonnage, longueur (cm) et phase de maturité	115
3.20	Morphologie et histologie des ovaires de femelles de <i>P. platessa</i>	116
3.21	Morphologie et histologie des ovaires femelle de <i>M. surmuletus</i>	118
3.22	Morphologie et histologie des ovaires de femelles <i>L. whiffiagonis</i>	120
3.23	Schéma de synthèse du Chapitre 3	226
3.24	Estimation des L ₅₀ et A ₅₀ pour <i>L. whiffiagonis</i>	228
3.25	Boxplot des pourcentages (%) des structures cellulaires retrouvées dans les ovaires de <i>L. whiffiagonis</i> en fonction de la phase de maturité	229
4.1	Différents sous-domaines en intelligence artificielle	234
4.2	Schéma de synthèse du matériels et méthodes	243
4.3	Schéma de synthèse du Chapitre 4	273
6.4	Extraction d'ovaires de <i>Mullus surmuletus</i>	284
6.5	Échographie d'ovaire de plie	286

Liste des tableaux

1.1	Définitions des phases de maturité sexuelles	12
2.1	Descriptions macroscopiques des phases de maturité sexuelle chez les femelles téléostéens	34
2.2	Plan d'échantillonnage pour la plie (<i>P. platessa</i>)	52
2.3	Plan d'échantillonnage pour le rouget barbet de roche (<i>M. surmuletus</i>)	55
2.4	Plan d'échantillonnage pour la cardine franche (<i>L. whiffiagonis</i>)	57
2.5	Plan d'échantillonnage pour la cardine à quatre taches (<i>L. boscii</i>)	59
2.6	Résultats macroscopique de 3 lecteurs	60
3.1	Descriptions des phases de maturité sexuelle chez les femelles téléostéens	76
3.2	Littérature utilisant la stéréologie sur ovaires de téléostéens	84
3.2	Articles utilisant la stéréologie sur des lames histologiques ovariennes de téléostéens (suite)	86
3.2	Articles utilisant la stéréologie sur des lames histologiques ovariennes de téléostéens (suite)	88
3.3	Abréviations des structures cellulaires ovariennes	95
3.4	Règles de classification des phases de maturités	99
3.5	Comparaison des L_{50} et A_{50} pour <i>P. platessa</i>	117
3.6	Comparaison des L_{50} et A_{50} pour <i>M. surmuletus</i>	119
3.7	Matrice de confusion méthodes macroscopique et stéréologique pour <i>L. whiffiagonis</i>	121
3.8	L_{50} et A_{50} pour <i>L. whiffiagonis</i>	121
5.1	Études effectuées sur les différentes espèces	277

Acronymes

aoA ovocyte en atrésie α

aoB ovocyte en atrésie β

bv vaisseaux sanguins

CA alvéoles corticales

cao ovocytes à alvéoles corticales

CGP cellules germinales primordiales

ct tissu conjonctif

E espace non naturel

E2 17β -estradiol

FSH *Follicle stimulating hormone*

GVB *Germinal vesicle breakdown*

gw paroi gonadique

ho ovocytes hydratés

Is espace intercellulaire

L lyse

LH hormone lutéinisante

ldo ovocytes avec gouttelettes lipidiques

MIS *maturation inducing steroid*

og ovogonie

oih ovocytes en cours d'hydratation

po1 ovocytes primaires stade 1

po2 ovocytes primaires stade 2

POF follicules post-ovulatoires

U indéterminées

vtg ovocytes en vitellogenèse

Accobiom *ACquisition de COonnaissances sur les paramètres BIologiques des ressources marines exploitées en Outre-Mer*

ACOST *Amélioration de la COonnaissance sur les STcks du golfe de gascogne*

ACP Analyse en Composantes Principales

Archimer *Archive Institutionnelle de l'Ifremer*

BOREA *Biologie des ORganismes et Écosystèmes Aquatiques*

CGFS *Channel Ground Fish Survey*

CIEM *Conseil International pour l'Exploration de la Mer*
CMAbio3 *Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie*
DCF *Data Collection Framework*
EVHOE *EValuation Halieutique Ouest de l'Europe*
FAO *Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture*
FFP *France Filière Pêche*
IA *Intelligence Artificielle*
IBTS *International Bottom Trawl Survey*
Ifremer *Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer*
IGS *Indice Gonado-Somatique*
LRHPB *Laboratoire des Ressources Halieutiques de Port-en-Bessin*
MATO *MATurité Objective des poissons par l'histologie quantitative*
LMC *Longueurs Minimales de Captures*
PCP *Politique Commune de la pêche*
RMD *Rendement Maximal Durable*
SSB *Biomasse des Reproducteurs*
STECF *Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries*
TAC *Totaux Admissibles de Captures*
WKASMSF *Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish*
WKMATCH *Workshop for Maturity Staging Chairs*
WGBIOP *Working Group on BIOlogical Parameters*

Chapitre 1

Introduction générale

«Toutes les grandes personnes ont d'abord été des enfants.»

Le Petit Prince (Antoine de Saint-Exupéry, 1943)

1 Contexte Halieutique

La pêche est une activité qui consiste à capturer des organismes aquatiques, tels que des poissons, des crustacés, des mollusques ou d'autres espèces marines ou d'eau douce, à des fins alimentaires, récréatives ou commerciales, ce, à l'aide de différentes techniques (filets, lignes, chaluts, *etc.*). Cette activité varie en termes d'échelles, depuis la pêche de subsistance à petite échelle à la pêche industrielle couvrant plusieurs océans, en passant par la pêche artisanale qui concerne généralement une zone côtière limitée.

Actuellement, les pêches (qui englobent la gestion, les captures, la transformation et la commercialisation du poisson) et l'aquaculture (l'élevage du poisson) jouent des rôles importants dans l'alimentation et l'économie au niveau mondial. En effet, en 2020, la production halieutique et aquacole a atteint 214 millions de tonnes, ce qui représente 424 milliards de dollars US, avec en moyenne 20,2 kg de produits alimentaires d'origine aquatique consommés par habitant par an. De plus, le secteur primaire associé emploie 58,5 millions de personnes, avec environ 600 millions de personnes qui dépendent au moins partiellement de la pêche et de l'aquaculture (FAO, 2022).

Dans l'objectif de nourrir de manière efficace, équitable et surtout durablement la population mondiale, une gestion des stocks exploités est indispensable. Ces stocks sont définis comme étant «la partie exploitable de la population d'une espèce dans une zone donnée [...] qui ne comprend ni les œufs, ni les larves, ni les juvéniles n'ayant pas atteint une taille suffisante pour être capturés »(IFREMER, 2018).

1.1 Organisation et réglementations

Les informations présentées ici sont issues de sites officiels du Parlement européen et de la Commission européenne (COMMISSION~EUROPÉENNE, 2023 ; PARLEMENT~EUROPÉEN, 2023).

La mise en place de moyens de gestion pour l'exploitation des ressources vivantes des milieux marins ou dulcicoles au niveau mondial a été formalisée dans les années 1995 avec l'adoption du Code de conduite pour une pêche responsable par 170 membres de l'*Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture* (FAO), incluant la France. Depuis sa création en 1945, la FAO s'est toujours positionnée dans une optique d'amélioration des programmes englobant l'agriculture dans un premier temps, puis l'aquaculture et la pêche. Son objectif est d'établir des normes alimentaires internationales, en assurant le suivi de codes de conduite permettant une exploitation responsable des ressources (FAO, 2022, 2023a). En 1970, le Conseil Européen adopte des textes pour l'établissement d'une organisation commune des marchés et produits issus de la pêche pour les mers européennes.

Le "Code de conduite pour une pêche responsable" est un recueil de principes et d'objectifs ayant pour vocation d'aider les pays à développer et améliorer leurs secteurs de pêche et d'aquaculture afin de conserver et gérer les ressources halieutiques et leurs habitats. C'est aux gouvernements des pays de faire appliquer ce Code, en élaborant et en appliquant une politique et une législation adaptées.

La zone d'étude dans laquelle se positionne ce travail est inscrite dans la zone de pêche FAO 27 en Atlantique Nord-Est, et c'est le *Conseil International pour l'Exploration de la Mer* (CIEM) qui coordonne la recherche sur les ressources et l'environnement marin, au travers des multiples divisions géographiques (Figure 1.1) qui seront utilisées lors de l'attribution des quotas de pêche par le Conseil Agriculture et pêche de l'Union Européenne (IFREMER, 2022a).



FIGURE 1.1 – Carte des divisions CIEM de la zone de pêche FAO 27. D'après ©FAO (2023b)

Chaque année, et lors de la mise en place de nouvelles réglementations, ou de la révision de ces politiques, la Commission Européenne demande un avis scientifique fourni par les corps scientifiques que sont le *Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries* (STECF), le *Conseil International pour l'Exploration de la Mer* (CIEM) et les organisations régionales des pêches. Les données permettant d'établir les avis scientifiques sont alors collectées par les instituts de recherche des 20 états membres concernés de l'Union Européenne, incluant la France. Les données sont collectées dans le cadre de la *Data Collection Framework* (DCF) et sont retransmises à des groupes d'experts qui vérifient la qualité de la donnée, l'analysent et mettent en place des modèles de gestion. Les résultats de ce processus sont ensuite transmis aux corps scientifiques qui mettent en place les avis de gestion, puis à la Commission Européenne. Celle-ci élabore des propositions préliminaires, notamment pour les **Totaux Admissibles de Captures (TAC)** par stock, et soumet ces propositions législatives à discussion dans diverses instances (conseils consultatifs et comités consultatifs régionaux, Comité économique et social européen (CESE),

Comité consultatif des pêches et de l'Aquaculture (CCPA) et le Comité des Représentants Permanents (COPERER)). Suite à ces échanges, des conclusions sont présentées au Conseil Agriculture et Pêche de l'Union Européenne, regroupant les ministères associés à la pêche de chaque état membre. C'est le Conseil des ministres qui fixe annuellement le volume de débarquement maximum qui est autorisé (**TAC**) par espèce et par zone. Les **TAC** sont alors répartis en quotas nationaux (une proportion fixe des **TAC** est allouée à chaque état membre annuellement). Ces quotas peuvent être assortis de mesures complémentaires telles que des **Longueurs Minimales de Captures (LMC)**, des périodes de pêche, l'usage de certains engins de pêche ou l'accès aux zones de pêche (IFREMER, 2022b).

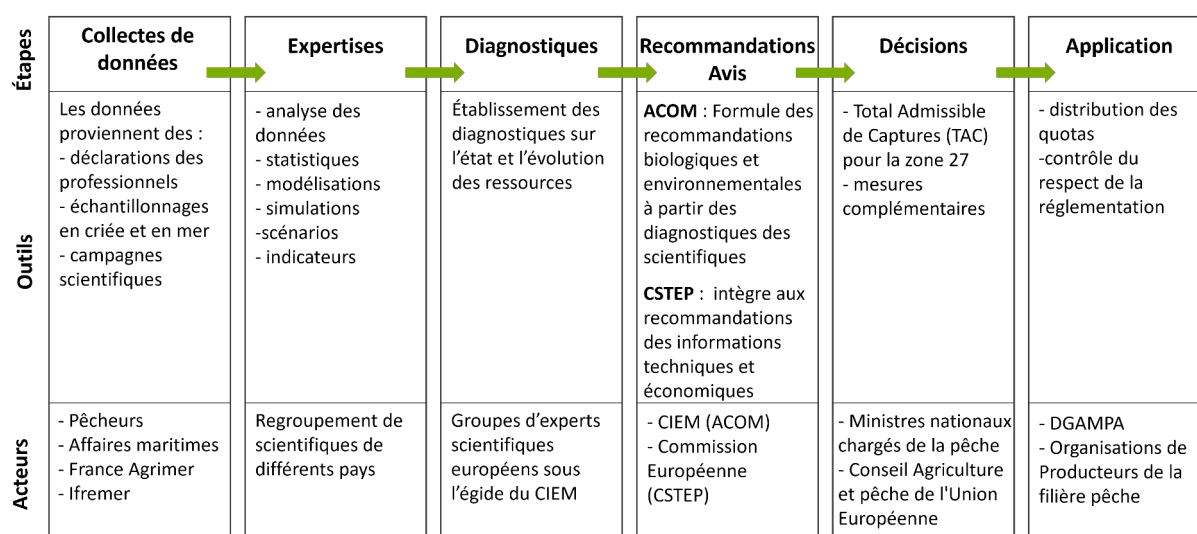


FIGURE 1.2 – Schéma résumant les différentes étapes de la gestion des ressources halieutiques pour la Zone **FAO 27** en France, et les outils mis en place par différents acteurs. Avec, DGAMPA = Direction Générale des Affaires Maritimes, de la Pêche et de l'Aquaculture et ACOM = Advisory COMmittee. D'après ©Ifremer

En France, c'est la Direction Générale des Affaires Maritimes, de la Pêche et de l'Aquaculture (DGAMPA) qui a la responsabilité de la gestion des stocks dans le respect de la réglementation européenne. Elle répartit les quotas entre les différentes organisations de producteurs de la filière pêche. En amont, l'échantillonnage des données et l'évaluation des ressources est effectuée principalement par l'*Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer)*, l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), le Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) et l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE).

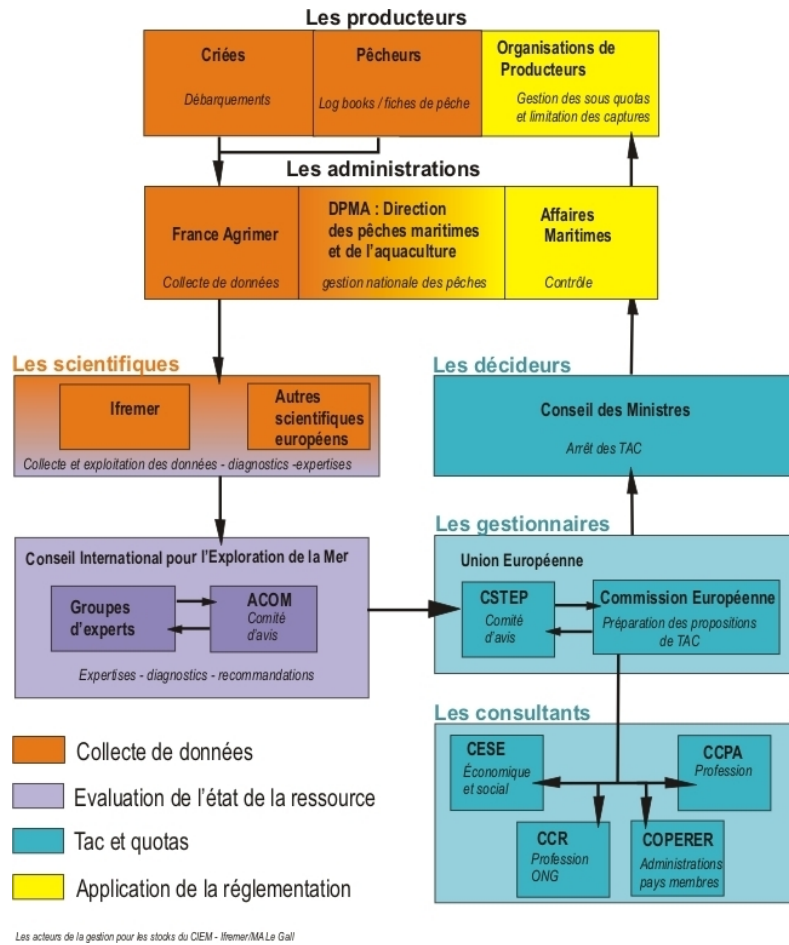


FIGURE 1.3 – Schéma des acteurs de la gestion des stocks du CIEM en France. D'après ©Ifremer / M.A. Le Gall

En terme réglementaire, la **DCF** vient en appui à la **Politique Commune de la pêche** qui est à la base des avis de gestion. La **DCF** finance, évalue et harmonise la collecte et la gestion des données issues de l'aquaculture et de la pêche effectuées au niveau national. La **PCP** propose un ensemble de règles mises en place pour la gestion durable des activités liées à la pêche et l'aquaculture, d'un point de vue environnemental, économique et social, à l'échelle régionale et internationale. Les règles mises en place pour la gestion des pêches ont pour but de contribuer à la conservation des ressources biologiques marines, d'augmenter la productivité, d'assurer un niveau de vie satisfaisant aux acteurs du secteur de la pêche, et de garantir une disponibilité des ressources alimentaires à des prix raisonnables. Pour atteindre ces objectifs, des outils de gestion sont mis en place en fonction des zones et des espèces, tels que des réglementations sur les engins de pêches, des diamètres des maillages autorisés, des **Longueurs Minimales de Captures (LMC)**, l'exploitation au **Rendement Maximal Durable (RMD)** pour tous les stocks, la régionalisation des règles, un suivi de l'origine des individus pêchés par étiquetage, et depuis 2019, l'interdiction des rejets et l'obligation de débarquement de la totalité des captures, incluant les individus

en dessous des **Longueurs Minimales de Captures (LMC)** réglementaires.

1.2 L'évaluation des stocks

Les informations suivantes sont tirées des avis délivrés par le **CIEM** chaque année pour la gestion durable des stocks, ainsi que des définitions résumées dans les publications de BISEAU (2021) et RESTREPO (2022).

La pêche est basée sur l'exploitation d'animaux sauvages qui ne peuvent pas être contrôlés, à la différence des élevages en agriculture, pour en obtenir la plus grande plus-value. L'évaluation des stocks va servir à estimer le **Rendement Maximal Durable (RMD)**. Le **RMD** «correspond à la plus grande quantité de biomasse (généralement exprimée en tonnes) que l'on peut extraire en moyenne et à long terme d'un stock halieutique dans les conditions environnementales existantes sans affecter le processus de reproduction» (COBRENORD, 2023). La gestion des ressources halieutiques a donc pour but de permettre aux pêcheurs de maximiser leurs captures sans entraver la pérennité de la population concernée.

Avant de définir la biomasse que l'on peut extraire d'un stock, il faut évaluer l'état de ce dernier. Pour cela, des indicateurs permettent le suivi de l'évolution des ressources. Le premier indicateur est la *Spawning Stock Biomass*, ou **Biomasse des Reproducteurs (SSB)** en Français, qui est la masse d'individus capables d'émettre des gamètes viables, c'est donc la capacité d'un stock à se reproduire. Le deuxième indicateur est le taux de mortalité par pêche. L'évolution annuelle de ces indicateurs (**SSB** et taux de mortalité par pêche) sur plusieurs années (plusieurs décennies en général) permet de résumer la pression de pêche que subit le stock. En fonction des informations disponibles, un dernier indicateur peut être calculé, l'âge de recrutement qui est l'âge auquel il est estimé que les poissons deviennent disponibles pour la pêche.

A partir des deux indicateurs que sont la **SSB** et le taux de mortalités, il est possible d'établir des "points de référence biologiques" ou "points limites de référence", qui sont des seuils à ne pas dépasser pour assurer une exploitation durable des stocks. Ces seuils visent à estimer les niveaux minimums de reproducteurs nécessaires pour assurer la pérennité du stock. Ces deux seuils B_{lim} et F_{lim} ont pour définition :

- ✧ B_{lim} : le seuil de **Biomasse des Reproducteurs (SSB)** en dessous duquel le maintien du stock par le renouvellement des générations a une forte probabilité d'être compromis. Cela souligne que le nombre de reproducteurs n'est pas suffisant pour assurer le renouvellement de la population.
- ✧ F_{lim} : le taux d'exploitation (mortalité par pêche) au delà duquel est présente une forte probabilité de faire diminuer la **SSB** en dessous de B_{lim}

Ainsi, pour limiter les risques d'effondrement d'un stock exploité, le taux d'exploitation de ce dernier devrait être inférieur à F_{lim} et la **Biomasse des Reproducteurs (SSB)** supérieure à B_{lim} . Si ces critères ne sont pas respectés, alors le stock n'est pas considéré comme étant "dans ses limites biologiques de sécurité". Afin d'atteindre le **Rendement Maximal Durable**, il est nécessaire de maintenir la mortalité bien en dessous de F_{lim} . Cette valeur est appelée F_{msy} . Pour assurer l'atteinte du **RMD**, les captures européennes sont gérées par des **Totaux Admissibles de Captures (TAC)**. En 2019, 64,6% des stocks halieutiques étaient exploités à un niveau biologique durable (FAO, 2022).

Une gestion efficace des stocks exploités est donc indispensable soit pour permettre aux stocks en déclin de se reconstituer d'année en année, soit pour s'assurer que les stocks ne rentrent pas en état de surexploitation. La surexploitation correspond à un prélèvement d'individus trop élevé qui mène à la diminution du nombre de reproducteurs conduisant à l'effondrement du recrutement, à un niveau pour lequel ce stock ne pourra plus être exploité. Ainsi, une exploitation raisonnée des stocks passe avant tout par une estimation précise des indices que sont la **SSB** et la mortalité par pêche, qui eux-même sont dépendants de la qualité de la donnée récoltée. Dans ce cas, ce sont les informations relatives à la **maturité sexuelle** qui permettent non seulement le calcul de la **Biomasse des Reproducteurs (SSB)**, mais aussi d'estimer des métriques telles que l'ogive de maturité. L'ogive de maturité permet l'estimation des percentiles de la distribution des individus sexuellement matures et ceux immatures, par rapport à la longueur ou l'âge (DOMINGUEZ-PETIT et al., 2018 ; WEST, 1990). Cela permet d'estimer, par exemple, la longueur (L_{50}) ou l'âge (A_{50}) auxquels 50% de la population se reproduit.

En fonction des données disponibles pour un stock, ces analyses peuvent être plus ou moins complètes. Les stocks au sein du **CIEM** sont classés dans 6 catégories, allant de 1 à 6 en fonction de la donnée et des connaissances disponibles. En général, une évaluation analytique est possible pour les stocks de catégories 1 et 2.

2 Maturité sexuelle : données et utilisation

En halieutique, les données concernant le paramètre de maturité sont utilisées pour calculer les ogives de maturité ou la **Biomasse des Reproducteurs (SSB)**. La maturité peut être suivie pour les deux sexes, mais elle est généralement mesurée chez les femelles, car le recrutement est lié à la production d'ovocytes par les femelles (BEVERTON et al., 1993). Afin de déterminer la maturité, plusieurs méthodes sont disponibles. En 2014, pour 148 stocks concernant 53 espèces dans 8 écorégions de la zone **FAO 27**, l'évaluation annuelle des stocks n'incluait pas la maturité pour 59% des stocks. Seuls 14% des stocks disposaient d'une ogive de maturité annuelle estimée à partir des données récoltées (ICES, 2014). Cette faible utilisation de la maturité dans le processus d'évaluation était soit liée à une

mauvaise qualité des données soit à leur absence. La donnée était qualifiée de "mauvaise" quand le protocole d'échantillonnage était manquant, quand le calcul de l'ogive de maturité n'était pas explicité ou si ce dernier incluait les deux sexes d'une espèce.

2.1 Échelle de maturité

L'échelle à 6 phases a été mise en place en 2014 lors du *Workshop for Maturity Staging Chairs (WKMATCH)*, et améliorée et standardisée en incluant les mâles et femelles, puis généralisée à toutes les espèces de téléostéens et élastombranches (Figure 1.4). Les termes utilisés sont alors redéfinis en se basant sur la littérature scientifique (BROWN-PETERSON et al., 2011 ; LOWERRE-BARBIERI et al., 2011).

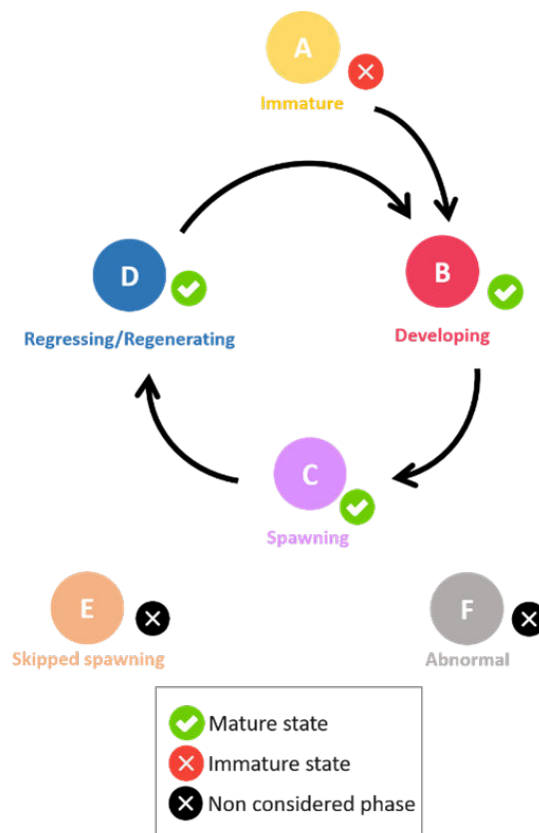


FIGURE 1.4 – Schéma des 6 phases pouvant être trouvées chez les téléostéens, adaptées des grilles de l'ICES (2018). Avec Immature (A), Développement (B), En ponte (C) et Régression / Régénération (D), Omission de ponte (E) et Anormal (F). D'après MARTIN (2022)

Si certaines espèces montrent des spécificités, des sous-phases rattachées aux 6 phases principales peuvent être utilisées. Ce sous-découpage permet de prendre en compte les

particularités de l'espèce, sans perdre la cohérence et la traçabilité de l'information. Ces sous-phases, décrites dans le [Tableau 1.1](#), vont permettre de classer avec plus de précision les espèces qui participent à plusieurs événements de ponte lors d'une même saison de reproduction ou encore les espèces vivipares. En 2018, la grille a été reprise lors du *Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF)*, en renommant les phases de A à F. Elle est la grille de référence utilisée pour l'échantillonnage des paramètres biologiques en halieutique en Europe à l'heure actuelle (BOOIS et al., 2023 ; ICES, 2018).

La détermination de la phase de maturité peut être d'une part effectuée sur la base de critères macroscopiques, détaillée dans le [Chapitre 2](#), d'autre part elle peut être déterminée sur la base de l'analyse de l'[Indice Gonado-Somatique \(IGS\)](#).

2.2 Indice gonado-somatique

La masse de la gonade est fortement corrélée à la longueur du poisson, ainsi, pour éliminer l'influence de la masse du corps, l'[Indice Gonado-Somatique \(IGS\)](#) calculé exprime la masse de la gonade ramenée sur le pourcentage de la masse totale de l'individu ([Équation \(1.1\)](#)) ou de la masse sans viscères ([Équation \(1.2\)](#)) (NIKOLSKY, 1963).

$$IGS(\%) = \frac{\text{Masse des gonades}}{\text{Masse totale de l'individu}} * 100 \quad (1.1)$$

$$IGS(\%) = \frac{\text{Masse des gonades}}{\text{Masse de l'individu sans viscères}} * 100 \quad (1.2)$$

La dynamique de l'[IGS](#) dans le temps dépend du développement de l'ovaire et donc du cycle de reproduction de l'espèce. Les espèces tropicales qui pondent tout au long de l'année supportent ainsi des dynamiques d'[IGS](#) beaucoup moins marqués par rapport aux espèces des zones tempérées qui montrent un développement important sur une saison de reproduction bien définie (NIKOLSKY, 1963). Chez les espèces pour lesquelles les femelles ont un fort investissement dans la reproduction, l'[IGS](#) peut atteindre 15 à 40% pendant la période du frai (TYLER et al., 1996).

Néanmoins l'utilisation de cet indice a été remis en question, avec le besoin de validation préalable de son utilisation en fonction de l'espèce considérée (DE VLAMING et al., 1982). En effet, plusieurs espèces présentent un [IGS](#) corrélé à leur longueur, avec une masse de l'ovaire qui croit plus rapidement en fonction de la longueur (WEST, 1990).

2.3 Méthode "*whole mount*"

Des méthodes microscopiques classiques pour l'estimation de la maturité sont l'histologie et la stéréologie, qui seront plus amplement décrites en [Chapitre 3](#). une autre méthode est l'examen des tissus entiers (*whole mount method*).

C'est une méthode plus précise que l'identification par critères macroscopiques et plus simple à mettre en place que l'histologie. Elle permet d'examiner les ovocytes soit sous microscope soit sous loupe binoculaire. Le liquide de Gilson permet de dissocier la paroi gonadique des ovocytes et de préserver ces derniers. Les ovocytes entiers sont alors classés en stade en fonction de leur degré de transparence et de leur diamètre pour déterminer la phase de maturité (CLARK, 1934). WITTHAMES et al. (2009) ont aussi exploré la possibilité de colorer les ovocytes (avec de l'éosine, du rose bengal ou le réactif de Schiff) afin d'améliorer l'identification des stades, notamment des [ovocytes à alvéoles corticales](#), des [follicules post-ovulatoires](#) et des follicules en atrophie, montrant que l'intensité des teintures variaient en fonction de l'espèce étudiée.

Il est aussi possible de coupler cette méthode à l'utilisation d'un compteur à particule (WITTHAMES et al., 1987). Cet instrument utilisé notamment pour l'estimation de la fécondité, permet un comptage et la mesure automatique des ovocytes, cela de manière rapide sur un volume d'ovocytes plus important. Les classes de tailles issues de ce comptage sont associées à des stades cellulaires, et l'attribution d'une phase de maturité est faite en fonction du stade cellulaire au diamètre le plus grand.

TABLEAU 1.1 – Tableau récapitulatif des phases de maturité telles que définies par le CIEM (ICES, 2014, 2018)

Etat	Phase	
SI (Sexuellement Immature) Spécimens qui ne présentent pas de développement gonadique. Un individu sera SI une seule fois dans sa vie.	A (Immature) Phase initiale dans le cycle de reproduction, avec des individus qui ne se sont jamais reproduits, et qui ne produiront pas de gamètes pendant la période de reproduction en cours.	
SM (Sexuellement Mature) Spécimens qui présentent une croissance gonadique et un développement de gamètes qui sont gonadotropines dépendantes (production d'hormones stéroïdiennes et activation de récepteurs hormonaux correspondants). Une fois qu'un individu est SM , il restera dans cet état jusqu'à la fin de sa vie. Cependant, un individu SM ne participera pas toujours à la période de reproduction en cours.	B (En développement)	
	Ba (En développement mais fonctionnellement immature)	Bb (En développement mais fonctionnellement mature)
	Uniquement pour les espèces avec un cycle de reproduction plus long qu'une saison de reproduction, et l'individu est dans sa première saison de reproduction. La gonade a commencé son développement, mais il n'y aura pas émission des gamètes lors de la saison en cours, ou si le développement se fait pour la première fois. Pas de participation à la saison de reproduction en cours.	Uniquement pour les espèces avec un cycle de reproduction plus long qu'une saison de reproduction. Les individus vont émettre leurs gamètes lors de la saison de reproduction en cours (ovocytes vitellogéniques plus avancés que en Ba).
	C (Ponte/Frai)	
	Cette phase aide à définir la période de frai : les femelles sont en ovulation ou libèrent les oeufs. Présence d'hormone lutéinisante (LH) et stéroïdiennes qui induisent la maturation (MIS). Phase généralement très courte chez les ' <i>total spawners</i> ', les individus sont capables de pondre (physiologiquement et développement des gamètes), avec un seul événement d'émission massive. Pour les ' <i>batch spawners</i> ', si il y a besoin de séparer les individus qui vont pondre imminemment, cette phase peut être divisée en deux sous-phases: Ca & Cb	
	Ca (En ponte/frai)	Cb (En capacité de pondre)
	La ponte est imminente ou l'individu a déjà initié la ponte. Les ovocyte sont en ovulation et les ovocytes hydratés sont observés.	Pour les ' <i>batch spawners</i> ', au moins une émission de gamètes a été produite. Cette sous-phase est la période entre deux événements de ponte. Pour les ' <i>total spawners</i> ', cette période est très courte juste avant l'émission des gamètes.

<p>SM (Sexuellement Mature) Spécimens qui présentent une croissance gonadique et un développement de gamètes qui sont gonadotropines dépendantes (production d'hormones stéroïdiennes et activation de récepteurs hormonaux correspondants). Une fois qu'un individu est SM, il restera dans cet état jusqu'à la fin de sa vie. Cependant, un individu SM ne participera pas toujours à la période de reproduction en cours.</p>	<p>D (Régression/Régénération) Phase longue chez la plupart des espèces. Cette période va de la fin de la saison de reproduction jusqu'au début de la suivante. Cette phase inclut les deux sous-phases 'régression' et 'régénération', mais est généralement considérée comme une seule phase. Quand la régénération peut être confondue avec la phase Immature (A) ou Omission de ponte (E) en suivant les critères macrscopiques, les deux sous-phases peuvent être utilisées.</p>	
	<p>Da (Régression) Pendant cette phase, l'ovaire ré-absorbe le matériel de sa précédente activité. La production d'ovocytes est terminée. La présence d'atrésie massive après la ponte est aussi un signe de régression.</p>	<p>Db (Régénération) Uniquement pour les espèces itéropares, avec une activité métabolique et physiologique importante dans l'ovaire qui va se réorganiser pour préparer les prochains cycles de reproduction (prolifération d'ovogonies et ovocytes primaires). La phase de régénération est influencée par les facteurs biologiques et/ou environnementaux, et se termine avec le début de la nouvelle saison de reproduction.</p>
	<p>E (Omission de ponte) Cette phase inclut : les individus présentant un premier développement ovocytaire qui sera mis en arrêt et dont les individus ne contribueront pas à l'effort de reproduction (émission des gamètes); les individus n'émettront pas de gamètes lors de la saison de reproduction en cours. Pendant cette phase, de l'atrésie massive peut être observée (au moins 50% des ovocytes sont en atrésie) et aucun ovocyte hydraté n'est émis. Pas de participation à la période de reproduction en cours.</p>	
	<p>F (Anormal) Les individus présentent des anomalies au niveau du développement de la gonade (nécrose, sclérose, intersexe chez espèces gonochoriques), ou des indications de pathologies. Cette catégorie ne doit pas être utilisée pour les individus avec une phase de maturité indéterminée, difficiles à classer ou montrant de l'atrésie massive. Pas de participation à la période de reproduction en cours.</p>	

2.4 Autres méthodes pour la détermination de la maturité

D'autres méthodes, moins utilisées en halieutique, existent pour estimer la maturité.

L'indice hépato-somatique, calculé sur le même principe que l'**IGS**, peut être utilisé pour les espèces qui stockent des réserves énergétiques au niveau du foie. La teneur en gras peut aussi être notée. Ces indices sont utilisés notamment chez les petits pélagiques (NUNES et al., 2011). Il est aussi possible d'obtenir d'autres mesures macroscopiques, telles que la coloration moyenne de l'ovaire et les mesures des dimensions d'ovaires, comme outil pour prédire la phase de maturité (MIDWAY et al., 2013). Une autre méthode est le dosage d'hormones sexuelles (estradiol, vitellogénine, testostérone, *etc.*) dans le plasma et les gonades, permettant de relier les différentes phases de maturité aux concentrations d'hormones (KAGAWA et al., 1983; PAVLIDIS et al., 2000). Un autre procédé permettant

d'identifier le sexe et l'état de maturité des individus utilise la transcriptomique. En effet, lors de la transcription de certaines protéines dans la gonade, ROJO-BARTOLOMÉ et al. (2016, 2017) ont noté une accumulation d'acide ribonucléique ribosomales (ARNr) de petites tailles en présence d'ovocytes primaires, et des ARNr de grandes tailles en présence d'ovocyte en vittellogenèse. Finalement, la revue bibliographique de NOVELO et al. (2010) met en avant l'analyse d'images par ultrasons (ultrasonographie) comme méthode pour différencier les individus mâles ou femelles et matures ou immatures. Cette méthode a la particularité de ne pas nécessiter la mise à mort du poisson, et est donc mise en oeuvre notamment pour le contrôle du développement gonadique des espèces fragiles ou à très forte valeur commerciale telles que l'esturgeon (*Scaphirhynchus* spp.) ou la morue (*Gadus morhua*).

Il est à noter que l'ensemble de ces méthodes utilisent comme base de validation soit la détermination des phases de maturité par l'observation macroscopique ou par l'histologie. Ces approches sont donc validées en s'appuyant sur les phases déterminées par les deux méthodes utilisées dans ce travail de thèse.

3 Traits d'histoire de vie

Au-delà de son utilisation en halieutique, la maturité sexuelle est un trait d'histoire de vie dont l'étude est essentielle à la compréhension des dynamiques des populations naturelles. Cette section détaille son importance dans le cadre de la théorie des traits d'histoire de vie. Ces éléments sont tirés du travail mené pendant le stage de Master 2 de V. MARTIN (2022).

3.1 La théorie des traits d'histoire de vie

La théorie des traits d'histoire de vie a pour objectif d'explicitier les mécanismes qui conditionnent le succès reproducteur des organismes (STEARNS, 2000). Ces mécanismes comportent des composantes écologiques (pression de sélection) et génétiques (variabilité allélique) et influent les traits impactant la survie et la fécondité des individus. Ces traits incluent la longueur à la naissance, le mode de croissance, la longueur et l'âge à maturité sexuelle, la fécondité, la sénescence et la mortalité. Ils ont un effet direct sur la dynamique des populations associées et conditionnent donc leur devenir. Étant conditionnés par l'environnement, et donc par la sélection naturelle, ces traits peuvent se retrouver sous des fonctions antagonistes, les faisant évoluer selon des compromis (ou *trade-offs*) (STEARNS, 1989).

Ces *trade-offs* empêchent l'ensemble des traits d'être maximisés simultanément, ce qui peut ainsi représenter des bénéfices pour certains traits et des coûts pour d'autres.

Par exemple, un individu participera à une saison de reproduction au détriment de sa croissance ou de sa survie, ce qui impactera ses futures reproductions. Le premier cas de figure (compromis entre reproduction et survie) découle d'une allocation concurrentielle pour les ressources énergétiques disponibles, souvent limitées, dans le milieu. L'allocation concurrentielle est une situation durant laquelle l'apport énergétique peut être détourné afin de privilégier un processus (*i.e.* la reproduction) aux dépens d'un autre (*i.e.* la croissance) (STEARNS, 1989). Le second cas de figure est le compromis entre la reproduction actuelle et la ou les reproductions futures. Ce scénario met en jeu la probabilité de survie de l'individu entre deux évènements de ponte, ce qui amène donc à la question de l'investissement énergétique dans chaque évènement de ponte compte tenu de cette probabilité (MCBRIDE et al., 2015).

3.2 Maturité sexuelle et populations exploitées

La longueur ou l'âge à maturité sont des traits d'histoire de vie clés car ils influencent le succès reproducteur de l'individu, et impactent directement la dynamique de sa population. En gestion des populations naturelles exploitées, et notamment en halieutique, l'évolution de la longueur à première maturité impactera la productivité du stock (TRIPPEL, 1995). Les traits d'histoire de vie associés à la maturité peuvent aussi évoluer en fonction de *trade-offs*. Par exemple, une maturité sexuelle anticipée chez une espèce à fécondité indéterminée, en présence de facteurs favorables, pourra permettre plusieurs évènements de ponte lors d'une même période de reproduction (STEARNS, 1992). À l'inverse, une maturité plus tardive peut permettre la production d'une progéniture de meilleure qualité, ayant de meilleures chances de survie (STEARNS, 2000).

Les facteurs environnementaux jouent aussi une part importante dans le contrôle des cycles de reproduction. En effet, la photo-période est le facteur le plus influent qui déclenchera ce développement, mais en fonction de l'espèce on peut aussi retrouver l'influence des paramètres physico-chimiques, comme le changement de salinité chez le saumon *Salmo salar*, ou les facteurs sociaux (signaux des congénères par stimuli sonore, visuel ou chimique), notamment chez les espèces hermaphrodites. L'ensemble de ces facteurs permettent, en outre, la coordination d'une synchronisation de la maturation et l'émission des gamètes au niveau de la population (BROMAGE et al., 2001).

La reproduction chez les poissons est adaptée aux fluctuations de leur milieu (variation naturelle des saisons ou migration dans le cycle de vie de l'espèce). Pour les espèces qui se reproduisent en fonction des saisons, ces adaptations permettent aux larves d'avoir accès à la nourriture à l'éclosion. Cet ajustement dépendra des caractéristiques de l'espèce tel que le temps que l'embryon passe dans la colonne d'eau avant l'éclosion, temps qui est lui-même relié au diamètre de l'œuf et sa teneur en vitellus. Cette adaptation requiert

ainsi l'anticipation de la gamétogenèse dont la mise en place peut durer quelques mois jusqu'à plus d'un an (BROMAGE et al., 2001).

Si les traits d'histoire de vie individuels sont déterminés par la pression de sélection comme évoqué plus haut (JORGENSEN, 1990), la plasticité phénotypique participe aussi à leurs déterminations (AGRAWAL, 2001). La capacité que possède un organisme à exprimer différents phénotypes en fonction de son environnement peut donc influencer la longueur et l'âge à maturité (LAW, 2000). Identifier les causes de cette variabilité est alors essentiel dans le cadre de la gestion des stocks, afin d'orienter au mieux les mesures prises (*i.e.* les Longueurs Minimales de Captures).

Avec le XIX^{ème} siècle arrive l'industrialisation et les progrès techniques qui viennent s'associer au monde de la pêche et de nouvelles problématiques vont voir le jour. Deux facteurs prépondérants vont alors influencer les traits d'histoire de vie des espèces marines exploitées. Le premier facteur inclut la variabilité environnementale naturelle et les pressions de sélection biotique et abiotique correspondantes, alors que le second correspond à l'impact des activités anthropiques (PALOMARES et al., 2020). Ces derniers incluent l'exploitation par les pêcheries et les modifications de l'environnement marin induites par l'Homme (réchauffement climatique, eutrophisation des zones côtières, modification des habitats).

Un des enjeux principaux du changement climatique est l'augmentation de la température globale et son influence directe sur celle des océans. Ce phénomène peut avoir un impact sur les cycles de vie des individus et ainsi conduire à des réponses par plasticité phénotypique des populations. La température peut modifier directement ou indirectement les taux de croissance des individus, notamment celui des juvéniles (TEAL et al., 2008). Par exemple, elle peut avoir tendance à accélérer le métabolisme et la physiologie de l'individu (DHILLON et al., 2004), notamment chez les espèces ectothermes qui vont voir leurs processus physiologiques et endocriniens régulés. De cette manière, les individus peuvent être amenés à atteindre la maturité plus précocement et ainsi voir leur longueur et leur âge à maturité diminuer (DRINKWATER et al., 2002). À l'inverse, la température peut aussi jouer le rôle de facteur limitant à certains stades de la gamétogenèse (maturation méiotique et ovulation chez les salmonidés arrêtées chez la truite arc-en-ciel à 18°C par exemple (PANKHURST et al., 1996)).

Dans le contexte de l'augmentation de l'exploitation halieutique, des études ont signalé une diminution de la longueur et l'âge à maturité pour différents stocks (ERNANDE et al., 2004; HEINO et al., 2015; JØRGENSEN et al., 2007). Deux processus ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Tout d'abord, une maturité précoce pourrait apparaître comme une réponse compensatoire à la pêche (BORISOV, 1978; POLICANSKY, 1993; TRIPPEL, 1995). Cette réponse serait liée à la plasticité phénotypique : un change-

ment dans l'expression des gènes induisant une modification du phénotype, en réponse à l'environnement. Ainsi, en réduisant l'abondance des populations, la pêche diminuerait la compétition intra-spécifique et/ou inter-spécifique pour les ressources (LORENZEN et al., 2002; ROSE et al., 2001). Les poissons épargnés pourraient ainsi grandir plus rapidement et atteindre une longueur à maturité sexuelle prématurément (JORGENSEN, 1990; LAW, 2000; TRIPPEL, 1995).

Le deuxième processus concerne le taux de mortalité engendré par la pêche pouvant être jusqu'à 4 fois supérieur à celui de la mortalité naturelle (MERTZ et al., 1998). Ce taux de mortalité pourrait donc être une pression de sélection sur la population et générer une réponse évolutive (BORISOV, 1978; LAW et al., 1989; POLICANSKY, 1993; TRIPPEL, 1995). La pêche déclencherait donc un événement de sélection des individus dont le phénotype leur confère la meilleure chance de survie. Une longueur ou un âge à maturité plus précoce pourrait résulter d'une réponse démographique adaptative, face à l'augmentation de la mortalité des classes de longueurs plus grandes (DIECKMANN et al., 2007; HEINO et al., 2008; POLICANSKY, 1993; RICKER, 1981). La caractéristique fondamentale de cette composante est qu'elle serait stable dans le temps car elle conduit à la modification de la composition génotypique de la population (HEINO et al., 2002; HUTCHINGS, 2000; KUPARINEN et al., 2007). L'existence d'une évolution induite par la pêche (*Fisheries-induced evolution*) reste néanmoins à démontrer. Certains travaux antérieurs ont apporté une réponse positive à cet aspect (*i.e.* RIJNSDORP, 1993). Néanmoins, il est apparu récemment que les données disponibles ne permettaient pas de prouver de manière satisfaisante ce phénomène évolutif (PINSKY et al., 2021) et que le postulat de la réponse plastique semblait suffisant pour expliquer les schémas observés (JORGENSEN, 1990; SMITH, 1994; TRIPPEL, 1995).

Si ces éléments sont centraux dans les études de la dynamique des populations naturelles, l'information principale sur laquelle ils se basent est l'observation fiable de la maturité sexuelle au niveau de l'individu.

4 Ovogenèse chez les téléostéens

4.1 Les modes de reproduction

L'analyse des traits d'histoires de vie associée à la reproduction des téléostéens se fait généralement chez les femelles, dans la mesure où le recrutement est lié à la quantité d'œufs formés et donc à la production d'ovocytes par les femelles. La plupart des téléostéens participent à plusieurs événements de reproduction au cours de leur vie (itéroparité), les cas de sémelparité restant rares chez les poissons. L'hermaphrodisme (synchrone ou simultané) est décrit chez un petit nombre d'espèces (2% des espèces) (PAVLOV

et al., 2016). Les hermaphrodites simultanés présentent une gonade mâle et une gonade femelle, toutes les deux fonctionnelles en même temps (DOMINGUEZ-PETIT et al., 2017), au contraire des hermaphrodites séquentiels : ces types d'hermaphrodites sont le plus souvent protogyniques (l'individu est d'abord femelle puis devient mâle), mais peuvent aussi être protandriques (l'individu est d'abord mâle puis devient femelle), parfois bidirectionnels (ou alternatifs) (la femelle devient mâle et *vice versa*) (DOMINGUEZ-PETIT et al., 2017). Les hermaphrodites peuvent présenter 3 types de morphologies gonadiques (délimité, séparé et mélangé), présentées dans la Figure 1.5.

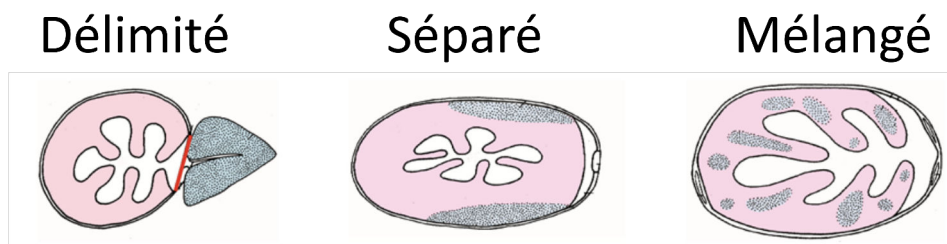


FIGURE 1.5 – Schéma des différents types de morphologies gonadiques chez les hermaphrodites. Les zones grisées correspondent au tissu testiculaire et les zones roses au tissu ovarien. La ligne rouge est une membrane conjonctive pouvant séparer les compartiments. D'après DOMINGUEZ-PETIT et al. (2017)

La situation de gonochorisme reste la plus fréquente chez les téléostéens, qui ne produiront tout au long de leur vie qu'un seul type de gamètes. Le dimorphisme sexuel est rarement visible. Chez les ovipares à fécondation externe, mâles et femelles émettent généralement leurs gamètes en même temps dans la colonne d'eau où a lieu la fécondation (JALABERT, 2005).

Lors de la période du frai, l'émission des ovocytes peut être effectuée selon deux modes (TYLER et al., 1996). Les espèces dites "**total spawner**" émettent la totalité des ovocytes hydratés de façon massive sur une courte période lors d'un seul événement de "ponte", cet épisode peut s'étendre sur une à deux semaines. Les espèces dites "**batch spawner**" forment une plus faible quantité d'ovocytes matures qui seront émis par lots (*batch*) en plusieurs événements s'étalant tout au long de la période du frai. Le nombre d'événements d'émission d'ovocytes et la durée de la période totale d'émission dépend de l'espèce. L'émission de gamètes sur une longue période de temps peut être vue comme une stratégie pour augmenter la probabilité de survie des juvéniles, mais peut aussi être liée à une contrainte anatomique pour les espèces les plus fécondes : la quantité d'ovocytes matures formés séquentiellement reste compatible avec la capacité d'expansion de la cavité abdominale du poisson (FORDHAM et al., 1999).

Ces différents modes de reproduction ont inévitablement un impact sur le **potentiel**

de reproduction, qui est la mesure de la capacité de la population à produire des œufs et/ou larves viables. Mais d'autres facteurs peuvent également moduler ce potentiel de reproduction au niveau de l'espèce, comme la **Biomasse des Reproducteurs (SSB)**, la structure en âge des adultes, la proportion entre individus se reproduisant pour la première fois et les individus se reproduisant à nouveau, la condition physique de l'individu, et finalement l'âge et la longueur auxquels les individus sont sexuellement matures (MURUA et al., 2003).

Comprendre et bien décrire le déroulement de la gamétogenèse chez une espèce est donc une étape essentielle pour estimer précisément son potentiel de reproduction, mesuré par la fécondité (c'est à dire le nombre d'ovocytes produits par une femelle). Cette fécondité peut être déterminée ou indéterminée (HUNTER et al., 1992). Pour les espèces à **fécondité déterminée**, la fécondité totale avant le début de l'émission est la fécondité annuelle potentielle. Les espèces à fécondité déterminée qui présentent plusieurs événements d'émission d'ovocytes dans une même période (*batch spawner*) auront un nombre total d'**ovocytes en vitellogenèse** qui diminuera à chaque événement d'émission, du fait de l'absence de recrutement des cohortes d'ovocytes primaires. Pour les espèces à **fécondité indéterminée**, la fécondité annuelle potentielle n'est pas fixée avant le début de la ponte. Les ovocytes qui ne sont pas encore entrés en vitellogenèse continuent à mûrir progressivement et sont émis avant la fin de la saison de reproduction en cours. Ce recrutement d'ovocytes en pré-vitellogenèse pendant la saison de reproduction est décrit sous l'appellation de "vitellogenèse *de novo*".

4.2 Structure et organisation des ovaires

L'ovogenèse est le développement des cellules de la lignée germinale femelle, depuis l'**ovogonie** jusqu'à l'ovocyte mature hydraté. Elle se déroule dans les ovaires, organes le plus souvent pairs, situés dans la cavité abdominale des téléostéens. Les ovaires sont généralement de forme allongée, orientés longitudinalement dans la cavité abdominale et sont maintenus par du tissu conjonctif. La partie postérieure de chaque ovaire se prolonge par un oviducte connecté à la papille uro-génitale (**Figure 1.6**) (JALABERT, 2005).

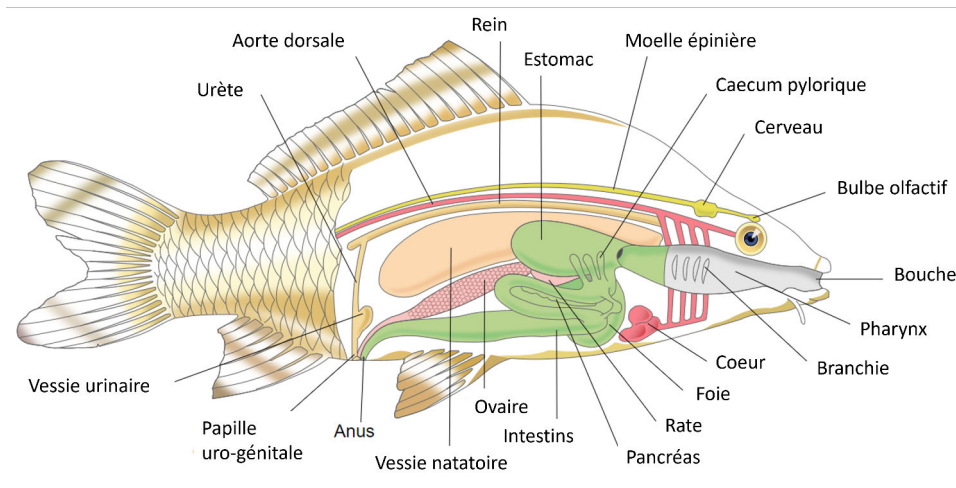


FIGURE 1.6 – Schéma anatomique d'un téléostéen. D'après ©Sharon High School

La Figure 1.7 schématise les deux types d'organisation structurelles chez les téléostéens ovipares, l'ovaire gymnovarien qui est ouvert vers la cavité abdominale et l'ovaire cystovarien enfermé dans une membrane ovarienne (capsule ovarienne ou [paroi gonadique](#)) qui peut être musculieuse ou non (HOAR, 1957).

Chez les téléostéens ovipares à fécondation externe, l'ovaire est organisé en lamelles (PAVLOV et al., 2016) : l'ovaire forme un sac dont les replis internes constituent les lamelles ovariennes. Les parois des lamelles sont constituées d'un épithélium germinale au niveau duquel sont retrouvées des cellules de la lignée germinale (qui seront à l'origine des ovocytes) et leurs cellules somatiques associées (JALABERT, 2005 ; KAGAWA, 2013).

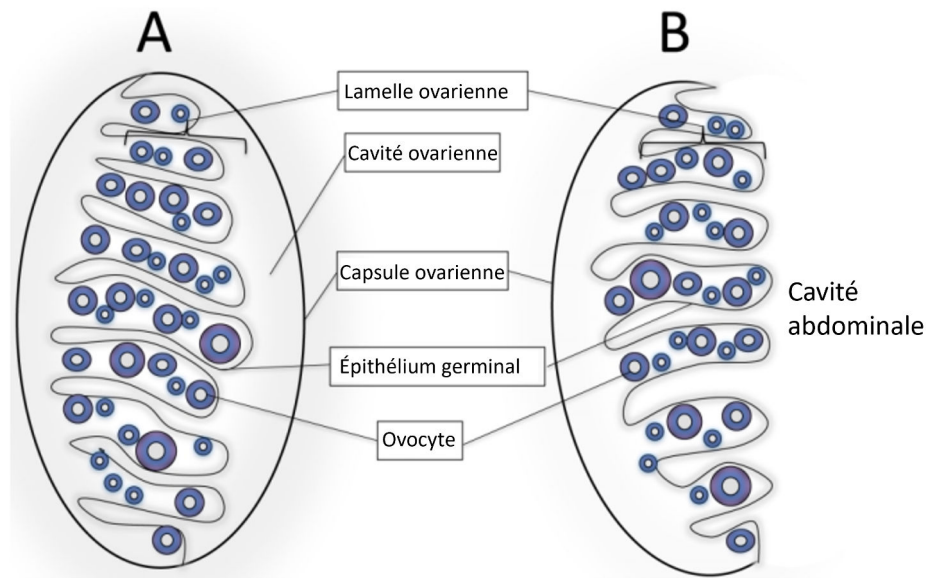


FIGURE 1.7 – Schéma de la structure des ovaires de téléostéens de type (A) cystovarien et (B) gymnovarien. D'après KAGAWA (2013)

La dynamique cellulaire de cette organisation peut être synchrone, groupe-synchrone ou asynchrone (WALLACE et al., 1981). Dans le cas d'une dynamique cellulaire **synchrone**, le développement et l'ovulation de la totalité des ovocytes se font de façon synchrone. Il n'y a pas de renflement du stock d'ovocytes par une cohorte moins développée. Ce schéma est retrouvé chez les téléostéens sémelpares. Les espèces à dynamique **groupe synchrone** présentent au moins deux cohortes d'ovocytes qui peuvent être observées tout au long de la reproduction. La première cohorte est une population synchrone d'ovocytes au stade le plus avancé, elle est aussi appelée couvée ou *clutch*. Elle sera émise lors d'un premier évènement de "ponte" de la saison de reproduction en cours. La seconde cohorte est constituée de cellules germinales à des stades plus hétérogènes qui seront émises par la suite, dans la même saison de reproduction. Cette dynamique est généralement observée chez les espèces itéropares présentant de courtes saisons de reproduction. Chez les espèces **asynchrones**, des ovocytes à tous les stades de développement sont présents dans les ovaires sans qu'une cohorte ne soit dominante par rapport aux autres, et cela pour tous les stades cellulaires avant l'hydratation. Lorsque la phase d'hydratation débute, il est possible d'identifier une population d'ovocytes en pré-vitellogenèse et une autre population d'ovocytes de diamètres plus importants en vitellogenèse. Ce schéma est retrouvé également chez les espèces itéropares présentant des saisons de ponte longues. Dans ces cas-là, l'accumulation de vitellus dépendra surtout de la disponibilité en nourriture dans le milieu (WALLACE et al. (1981) et références associées).

4.3 L'ovogenèse

Les cellules de la lignée germinale génèrent des gamètes haploïdes impliqués dans la transmission de l'information génétique d'une génération à la suivante. Chez les femelles, ce processus est appelé ovogenèse, il est à l'origine de la formation d'ovocytes matures retrouvés dans un follicule ovarien. Chez les poissons, l'ovogenèse est divisée en cinq étapes et repose sur les processus de mitose et de méiose : la prolifération des gonies (I), la prévitellogenèse (II), la vitellogenèse (III), la maturation (IV) et l'ovulation (V). Les grandes étapes de ce processus seront brièvement reprises dans ce document en s'appuyant sur les revues de BISWAS et al. (2021), JALABERT (2005), LUBZENS et al. (2010) et YÖN et al. (2015).

4.3.1 Origine des cellules germinales

Durant les premières divisions embryonnaires, quelques blastomères qui seront à l'origine de la lignée germinale s'individualisent, ils donneront les **cellules germinales primordiales (CGP)**. Ces cellules dont le protoplasme est dense et granuleux, contiennent des ARN et des protéines spécifiques, comme par exemple les protéines *vasa* et *nanos*, utilisées pour l'identification des **CGP** (Figure 1.8a). Ces **CGP** observables en microscopie sont caractérisées par leur forme sphérique, d'un diamètre allant de 10 à 20 μm selon les espèces, un noyau excentré dont l'enveloppe nucléaire est souvent irrégulière, avec un ou deux nucléoles. De plus, les **cellules germinales primordiales** présentent un "nuage", visible en microscopie électronique à transmission, qui apparaît sous forme de granules localisés contre la face cytoplasmique de l'enveloppe nucléaire (Figure 1.8b).

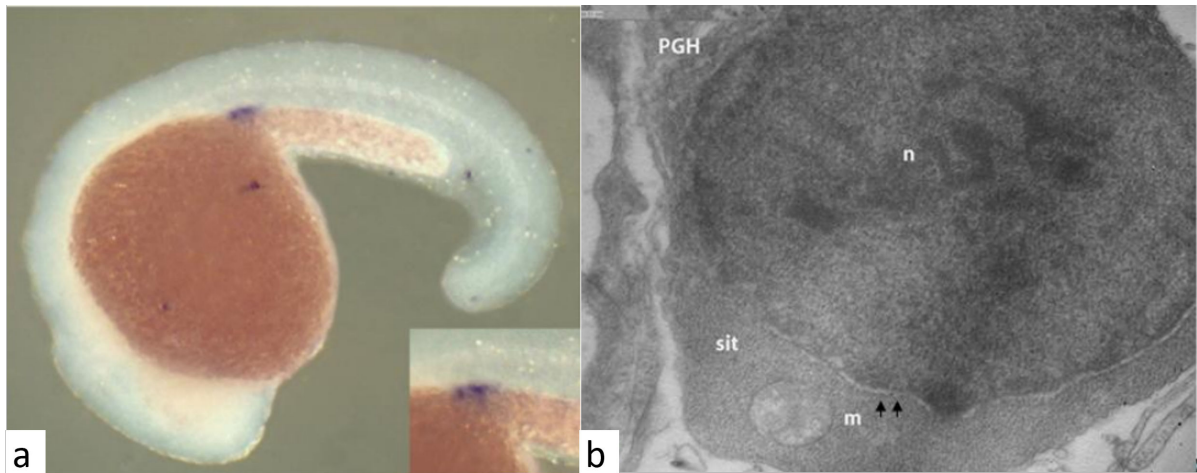


FIGURE 1.8 – a : Mise en évidence des cellules germinales primordiales chez une larve de *Danio rerio* 24 heures après fécondation. Les **CGP** sont marquées à l'aide d'un anticorps anti-Vasa

, b : **CGP** de larve de *Danio rerio* en microscopie électronique à transmission, avec le noyau (n), le cytoplasme (sit), une mitochondrie et le "nuage" (flèches) Images provenant de YÖN et al. (2015)

4.3.2 La prolifération des ovogonies

Les **cellules germinales primordiales** entament au cours du développement une migration vers la crête génitale, où se développeront les gonades. Quand elles ont atteint la crête génitale, ces **CGP** totipotentes s'associent aux cellules somatiques présentes et se différencient en cellules germinales, colonisant la gonade.

Sous l'effet d'hormones gonadotropes (**17 β -estradiol (E2)**) et **17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β P)**), les cellules germinales précoces (diploïdes) subissent des divisions mitotiques, et de cette prolifération seront issues les niches germinales. Contrairement à ce qui est retrouvé chez les mammifères, ces cellules précoces continuent à proliférer chez les femelles adultes (TOKARZ, 1978).

4.3.3 La pré-vitellogenèse

Cette phase correspond à l'entrée en méiose des cellules germinales qui portent alors le nom d'ovocytes primaires. La première division est bloquée en fin de prophase I. L'ovocyte primaire présente dans son noyau des nucléoles dont le nombre augmente progressivement (SELMAN et al., 1993). Pendant cette phase de croissance primaire, les cellules germinales s'enveloppent de deux assises différentes d'origine somatique. La première est la *granulosa*, composée de cellules somatiques morphologiquement semblables, à l'exception des cellules hautement spécialisées qui formeront le micropyle (KAGAWA, 2013). Ces cellules de la

granulosa sécrètent la *lamina basa* (ou lame basale). La seconde assise cellulaire externe forme la thèque, associée à des vaisseaux sanguins. Des microvillosités apparaissent à la surface de l'ovocyte et s'étendent vers les cellules de la *granulosa*, dans la zone où se formera la future *zona radiata*.

Par définition, un ovocyte enveloppé des cellules de la *granulosa*, de la *lamina basa* et de la thèque, constitue un follicule ovarien (TYLER et al., 1996). Les ovocytes primaires (ovocytes issues de la croissance primaire) comprennent l'ensemble des follicules ovariens en première division méiotique avant le stade à **alvéoles corticales (CA)**.

Avant l'entrée en vitellogenèse, le stade à **alvéoles corticales** est le premier stade issu de la croissance secondaire. C'est une structure clé dans le suivi de l'ovogenèse car elle indique que la femelle a atteint un état sexuellement mature (TOMKIEWICZ et al., 2003). La formation des **CA** est associée à la production chez les femelles matures d'hormones stéroïdiennes (**E2** et *Follicle stimulating hormone (FSH)*) indicatrices de maturité sexuelle. Au fur et à mesure de la vitellogenèse, les **CA** sont déplacées vers la *zona radiata*, alors que les gouttelettes de vitellus s'accumulent dans le cytoplasme de l'ovocyte (SELMAN et al., 1993). Le contenu de ces vésicules est libéré sous la *zona radiata* au moment de la fécondation et jouera un rôle dans la restructuration des protéines qui forment la *zona radiata*.

L'apparition des **CA** est suivie d'une augmentation du diamètre de l'ovocyte. Le nombre de **CA** croît au fur et à mesure que l'ovocyte se développe et que son diamètre augmente (WALLACE et al., 1981). La *zona radiata* se forme à la base des microvillosités, et s'épaissit progressivement jusqu'à l'ovulation. Des gouttelettes lipidiques apparaissent alors dans le cytoplasme, elles seront plus abondantes dans les premiers stades de la vitellogenèse.

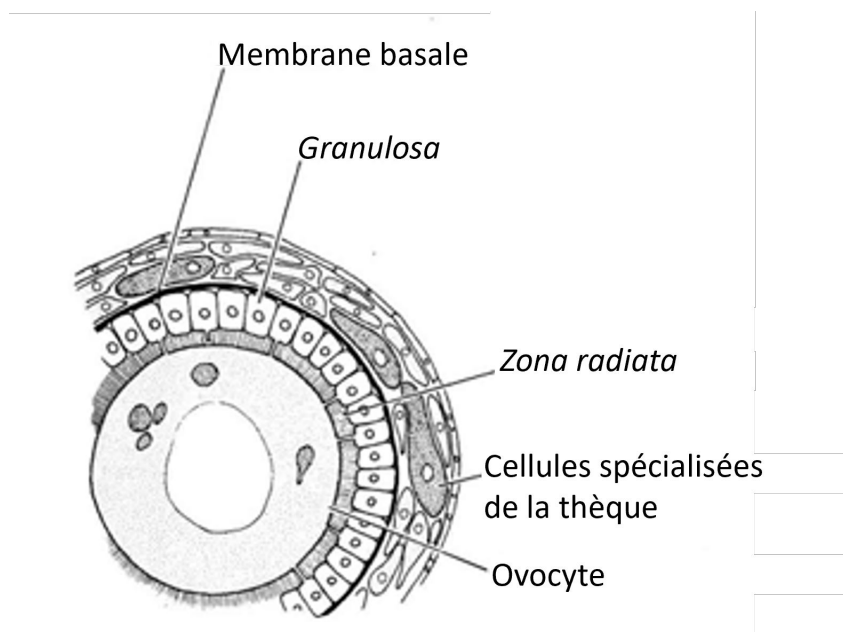


FIGURE 1.9 – Schéma d'un follicule ovarien, représentant l'ovocyte entouré par sa *zona radiata* et les cellules spécialisées de la *granulosa* et de la thèque (KAGAWA, 2013). Adapté de HOAR et al. (1978)

4.3.4 La vitellogenèse

La vitellogenèse est un processus long qui peut, chez certaines espèces, durer plus d'un an (JUNQUERA et al., 2003). Elle est définie par l'accumulation de vitellogénine (phospholipoglycoprotéines) dans l'ovocyte (LE MENN et al., 2007), et s'amorce suite à l'augmentation de FSH et E2 dans le sang (SWANSON et al., 2003). La présence de E2 stimule la synthèse de vitellogénine principalement par le foie et cette dernière sera transportée dans l'ovocyte grâce aux capillaires sanguins associés à la thèque. Les cellules de la *granulosa* participent aussi à la stéroïdogénèse en synthétisant l'estradiol, à partir de précurseurs transmis par des cellules de la thèque, qui sera acheminé à l'ovocyte par les microvillosités.

Les gouttelettes de vitellus, ainsi que les gouttelettes lipidiques, s'accumulent progressivement dans les ovocytes en vitellogenèse. En fin de vitellogenèse, l'ovocyte est enveloppé d'une *zona radiata* épaisse (enveloppe fibreuse, poreuse et souvent d'aspect strié) et des deux assises cellulaires (folliculaires et thèque).

4.3.5 La maturation et l'ovulation

Le début de la maturation est marqué par la migration du noyau (ou vésicule germinale) vers le pôle animal de l'ovocyte. Une fois cette migration achevée, la première

division méiotique reprend. L'entrée en métaphase se traduit par une rupture de l'enveloppe nucléaire (MURUA et al., 2003). Cette phase est associée à une augmentation importante d'hormone lutéinisante (**LH**) dans le sang, stimulant la synthèse de stéroïdes induisant la maturation (*maturation inducing steroid* (**MIS**)) telle que la 17,20 β P. Les **MIS** varient en fonction de l'espèce et sont des dérivés des progestérones. Ils sont responsables du déclenchement de la rupture de la vésicule germinative (*Germinal vesicle breakdown* (**GVB**)), de l'hydratation et de l'augmentation du volume de l'ovocyte.

Chez un grand nombre d'espèces, l'hydratation des ovocytes débute une fois la migration du noyau accomplie, juste avant l'ovulation (MURUA et al., 2003). Pendant la phase d'hydratation, les gouttelettes de vitellus fusionnent entre elles, formant une masse de vitellus unique et liquide. Les structures cristallines internes se dissocient, donnant aux ovocytes matures leur aspect translucide (CERDÀ et al., 2007). L'augmentation rapide du volume des follicules ovariens est due à l'augmentation de sa teneur en eau, phénomène notable chez les téléostéens marins dont les œufs seront pélagiques, afin d'assurer leur flottabilité (KAGAWA, 2013).

La phase d'hydratation et de maturation est courte, et se termine par la rétractation des microvillosités de l'ovocyte et la rupture localisée des cellules folliculaires, expulsant l'ovocyte bloqué en métaphase II. L'émission des ovocytes matures dans le lumen de la cavité ovarienne (ou abdominale en fonction de l'espèce) est appelée ovulation. Finalement, une fois émis, les ovocytes seront "pondus" dans le milieu en passant par l'oviducte et la papille uro-génitale.

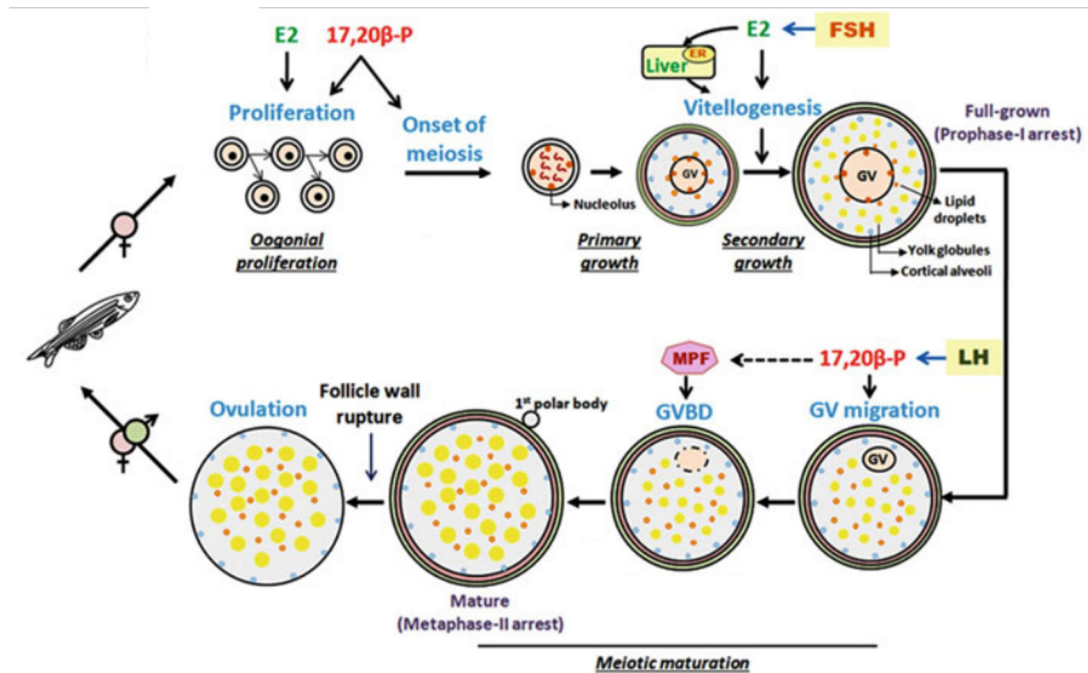


FIGURE 1.10 – Schéma de synthèse de l'ovogenèse chez les téléostéens, avec **E2** = 17β -estradiol, $17,20\beta$ P = $17,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, FSH = hormone de stimulation folliculaire, **LH** = hormone lutéinisante, MFP : maturation promoting factor et **GVB** = rupture de la vésicule germinative. D'après BISWAS et al. (2021)

4.4 L'atrésie

L'atrésie folliculaire, ou juste atrésie, est la dégénération de l'ovocyte. C'est un processus de régulation ovarien, commun à tous les ovaires de vertébrés (MIRANDA et al., 1999 ; SAIDAPUR, 1978), qui est retrouvé à tous les stades de la folliculogenèse (GURAYA, 1986). Un fort taux d'atrésie est un marqueur d'arrêt du cycle de reproduction de l'individu (HUNTER et al., 1985b).

Ce sont les ovocytes en vitellogenèse qui entrent le plus souvent en atrésie. Il semble que l'atrésie soit plus fréquente chez les femelles entrant tardivement dans la période de ponte (GLENTEN et al., 2010). La totalité des ovocytes en vitellogenèse n'atteignent pas la maturité complète ou ne seront pas ovulés, ils entrent alors en dégénérescence (SAIDAPUR, 1978), et l'atrésie permet la lyse du vitellus et sa résorption pour redistribuer les composés du vitellus riches en énergie vers le reste des organes de l'individu (WOOD et al., 2003). Une augmentation de l'atrésie folliculaire peut être engendrée par plusieurs facteurs physiologiques, physiques ou environnementaux tels qu'un manque d'apport en nourriture, des changements de température, un stress ou la présence de perturbateurs endocriniens (GLENTEN et al., 2010 ; GURAYA, 1986).

L'atrésie a été étudiée chez plusieurs espèces de téléostéens, et même si des différences sont notées entre les espèces, le processus général de la mise en place des corps atrétiques est entraîné par la désorganisation et la phagocytose des follicules. Ce processus a été décrit par plusieurs auteurs, notamment HUNTER et al. (1985b), LAMBERT (1970) et MIRANDA et al. (1999). KJESBU et al. (2010) identifient le début de l'atrésie en observant l'épaississement de la *zona radiata*. MIRANDA et al. (1999) identifient les premiers signes de l'atrésie comme étant la désintégration du noyau de l'ovocyte, des mitochondries et des alvéoles corticales, suivi de la fragmentation de la *zona radiata* et l'hypertrophie des cellules folliculaires. L'étape suivante est la différenciation des cellules de la *granulosa* et de la thèque en macrophages qui vont soit phagocyter le vitellus et l'ensemble des organites, soit libérer des enzymes dans l'ovocyte en dégénérescence. Suite à la résorption de l'ovocyte, le nombre de cellules de la thèque diminue et le tissu conjonctif vascularisé se développe autour du follicule atrétique. Le volume du follicule atrétique diminue et la régression de la *granulosa* laisse place à des granules parfois pigmentés en jaune-marron à l'hématoxyline-éosine.

L'identification de l'atrésie est primordiale, notamment en histologie. En effet, quantifier l'atrésie ovocytaire permet d'identifier les individus en omission de ponte, et donc par extension d'estimer correctement les ogives de maturité ainsi que les longueurs et âges à première maturité. Une difficulté peut résider dans le fait que les [follicules post-ovulatoires](#) qui sont présents après l'ovulation sont également résorbés rapidement, avec un aspect histologique proche de celui des ovocytes en fin d'atrésie (HUNTER et al., 1985b).

L'atrésie pouvant avoir lieu à tous les stades cellulaires, ce processus impactera le nombre d'ovocytes qui seront recrutés aux stades suivants. Chez certaines espèces, il a été observé que le taux d'atrésie augmente entre deux évènements de ponte, avec des ovocytes non émis lors du premier évènement de ponte qui entrent en atrésie alors que la prochaine cohorte d'ovocytes est en ovulation (TYLER et al., 1996). Chez les *batch spawners*, cela souligne l'importance de suivre tous les évènements de ponte, afin de pouvoir estimer correctement le nombre de gamètes émis. Ceci est à prendre en compte lors de l'évaluation de la **fécondité annuelle réalisée** qui sera le nombre total d'ovocytes émis par la femelle durant l'année, en prenant en compte les pertes d'ovocytes par atrésie, par rapport à la **fécondité annuelle potentielle** qui est le nombre d'ovocytes en développement au début de la saison de reproduction (HUNTER et al., 1992).

Objectifs

Ce travail de thèse a pour objectif de mettre en place un ensemble d'outils permettant de déterminer de façon fiable la maturité sexuelle des femelles pour quatre espèces de poissons pêchés en Atlantique Nord-Est : la plie (*Pleuronectes platessa*), le rouget barbet de roche (*Mullus surmuletus*), la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*) et la cardine à quatre taches (*Lepidorhombus bosci*). Parmi les espèces suivies, certaines font l'objet de règles de gestion simplifiées comme les cardines (gestion des 2 espèces sous un même stock) ou absentes (rouget barbet de roche en Atlantique Nord).

Nous avons comparé plusieurs approches méthodologiques de détermination des phases de maturité : une approche basée sur les seuls critères macroscopiques, une approche stéréologique avec lecture par un expérimentateur et une approche stéréologique couplée à une lecture automatisée utilisant l'apprentissage supervisé à l'aide d'un algorithme d'Intelligence Artificielle.

La comparaison de ces 3 approches s'appuie sur le calcul des longueurs et âges à première maturité sexuelle (L_{50} et A_{50}), qui sont des métriques utilisées dans les plans de gestion des stocks. Cette comparaison permet de préciser les points de faiblesse rencontrés lors de la détermination de la maturité sexuelle. Elle permet également de proposer des solutions pour améliorer ces points et à terme optimiser la gestion des stocks.

Le premier volet décrit l'échantillonnage suivant les protocoles de campagnes halieutiques, et le déploiement d'outils destinés à harmoniser la prise de données macroscopiques. Ces données sont ensuite analysées et intégrées dans le calcul des valeurs L_{50} et A_{50} pour les différentes espèces d'intérêt.

Le second volet du travail porte sur la mise en place d'une méthodologie quantitative basée sur une approche histologique, pour déterminer les phases de maturité des espèces suivies. Cette mise en place s'effectue à travers la rédaction de différents documents :

- ✧ un recueil de protocole pour le traitement des ovaires par l'histologie en halieutique.
- ✧ des règles d'identification des structures cellulaires ovariennes pour assurer la reproductibilité de la méthode.
- ✧ des lexiques décrivant les structures cellulaires ovariennes pour chaque espèce.

Au delà de ces outils méthodologiques, l'objectif est, pour la plie, le rouget barbet de roche et la cardine franche, l'attribution à chaque individu d'une phase de maturité sexuelle objective basée sur des données quantitatives, le calcul de la L_{50} et A_{50} et la comparaison de ces indices avec les données de référence décrites dans le premier volet.

Enfin, dans un dernier volet, pour l'espèce *L. whiffiagonis*, nous développons une stratégie d'automatisation du processus de lecture des lames stéréologiques par l'utilisation d'une méthode en apprentissage supervisé. Cette stratégie est utilisée pour identifier et quantifier les structures cellulaires présentes sur les lames histologiques. À nouveau, le calcul de la L_{50} et A_{50} est réalisé sur la base de ces données et les résultats comparés à ceux obtenus dans les chapitres précédents. Ceci permet à la fois de valider l'apprentissage supervisé mais aussi de rendre envisageable la généralisation de l'approche stéréologique pour le suivi de la maturité sexuelle des populations de téléostéens.

Chapitre 2

Étude macroscopique de la maturité sexuelle
pour 4 espèces de téléostéens pêchées en
Atlantique Nord-Est

Publication sans comité de lecture et présentée dans le Volume II :

✧ **Protocole de prises de photos standardisées.** Disponible sous [Archimer](https://doi.org/10.13155/89703) (DOI : <https://doi.org/10.13155/89703>)

«Je ne sais qu'une chose, c'est que je ne sais rien.»

Socrates

1 Introduction

Dans ce [Chapitre 2](#), les **paramètres biologiques** ont été récoltés pour quatre espèces d'intérêt commercial provenant des stocks d'Atlantique Nord-Est. En plus des données réglementaires collectées lors des campagnes d'échantillonnage halieutiques (masse du poisson et sa longueur, âge et maturité), la prise de **mesures rapides et complémentaires** (masse des ovaires, photographies) a pu être réalisée en parallèle. Ces données supplémentaires permettent la mise en place d'**outils** qui aideront à relier les paramètres macroscopiques des individus à un trait fonctionnel tel que la phase de maturité sexuelle de l'individu.

1.1 Critères CIEM

L'utilisation de critères macroscopiques de la gonade pour l'estimation de la phase de maturité sexuelle est la méthode la plus rapide et la moins coûteuse, ce qui explique son utilisation en routine et le fait qu'elle soit retenue par le *Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM)* comme méthode de référence (BOOIS et al., 2023). Afin de relier ces critères macroscopiques à une phase de maturité, des échelles de maturité ont été définies. Ces échelles ont d'abord été construites en fonction des pays et des espèces, incluant un nombre de phases différent et en utilisant des terminologies variées. Lors de la mise en commun de ces informations au niveau européen, une même espèce pouvait donc être identifiée sous différentes appellations en fonction de l'échelle utilisée par le pays ou même de l'institut qui avait récolté la donnée (ICES, 2007). En 2007 sont initiées les premières ébauches pour la mise en place d'une échelle générale à 6 phases, dans l'objectif d'harmoniser la prise de données et de faciliter leur exploitation par les évaluateurs de stocks en Europe (ICES, 2007, 2008).

Les critères macroscopiques de classification des femelles téléostéens dans une phase de maturité sexuelle sont présentés dans le [Tableau 2.1](#). Ces critères sont généralistes et basés sur la couleur, la texture ou le volume d'occupation de la gonade dans la cavité abdominale du poisson. Il est toutefois indispensable d'adapter ces critères à chaque espèce étudiée, notamment au niveau de la coloration de l'ovaire qui peut différer en fonction de l'espèce à l'étude.

Chapitre 2. Étude macroscopique de la maturité sexuelle pour 4 espèces de téléostéens pêchées en Atlantique Nord-Est

TABLEAU 2.1 – Tableau récapitulatif décrivant l’aspect macroscopique des ovaires aux différentes phases de maturité sexuelle chez les téléostéens. Tableau traduit de SAUGER et al. (2023d) et adapté de BROWN-PETERSON et al. (2011) et ICES (2014, 2018)

Etat de maturité	Phases		Terminologies (CIEM 2018)		Critères macroscopiques	
		Sous-phases possibles		Sous-phases possibles		Sous-phases possibles
SI : Sexuellement immature (sans développement gonadique)	Immature		A		Ovaires petits rosâtres et translucides (souvent clairs), ovaires ne dépassant pas 1/3 de la cavité abdominale. Vaisseaux sanguins indistincts et absence d'ovocytes matures	
SM : Sexuellement mature (avec développement gonadique)	En développement	En développement mais fonctionnellement immature (développement pour la première fois)	B	Ba	Croissance des ovaires, vaisseaux sanguins plus distincts	Petit rosâtre/rouge, ovaires ne dépassant pas 1/2 de la cavité abdominale. Ovocytes non visibles à l'œil nu
		En développement mais fonctionnellement mature		Bb		Rosâtre-rougeâtre/rougeâtre-orange et translucide, ovaires d'une longueur d'environ 1/2 de la cavité abdominale. Vaisseaux sanguins visibles, pas d'ovocytes matures visibles
	Ponte/Frai	En ponte/frai	C	Ca	Ovaires larges, vaisseaux sanguins importants, ovocytes individuels visibles à l'œil nu	Rosâtre-jaune, ovaires avec un aspect granuleux et une longueur d'environ 2/3 de la cavité abdominale. Ovocytes matures visibles à l'œil nu à travers la paroi gonadique qui n'est pas encore translucide. Pas d'émission des ovocytes en appliquant une légère pression
		En capacité de ponte		Cb		Orange-rose, ovaires avec des vaisseaux sanguins visibles et une longueur dépassant 2/3 de la cavité abdominale. Ovocytes matures larges, transparents, et parfaitement visibles. Ils sont émis sous une légère pression de l'ovaire, ou spontanément

SM : Sexuellement mature (avec développement gonadique)		Régression		Da		Ovaires rougeâtres d'une longueur environ la moitié de la cavité abdominale. Paroi ovarienne flasque, vaisseaux sanguins abondants et possibilité d'observer des reliquats d'ovocytes matures translucides/opaque en dégradation
	Régression / Régénération		D			
		Régénération		Db		Ovaires petits et rosâtres, translucides d'une longueur d'environ 1/3 de la cavité abdominale, avec vaisseaux sanguins présents mais réduits. Aucun ovocyte mature n'est observé dans la gonade
	Omission de ponte		E		Indiscernable à l'œil nu	
Anormal			F		Problèmes dans le développement de la gonade (nécrose, sclérose, intersexe chez espèces gonochoriques, majorité de la gonade montrant des signes de pathologies)	

L'utilisation de cette méthode basée sur des critères relativement subjectifs peut mener à des défauts de fiabilité des lectures. L'origine de ce problème est multiple, citons par exemple (1) les conditions matérielles (luminosité variable, manque de temps d'observation, contraste des couleurs en fonction du plan de travail), (2) la perception individuelle des critères par les agents (notamment la couleur) ou (3) le manque d'expertise des agents. Ce biais est le plus souvent évalué en calculant un pourcentage d'accord (*percentage agreement*) qui correspond au nombre de fois où des agents identifient la même phase de maturité pour un même individu sur le nombre total de lectures effectuées pour cet individu. Afin de limiter les biais entre lecteurs, des protocoles détaillant l'échantillonnage

des données et des ateliers d'homogénéisation de lecture, peuvent être mis en place pour une calibration entre agents (DOMÍNGUEZ-PETIT et al., 2009; ICES, 2012b, 2013, 2020). Cette stratégie d'inter-calibration est par exemple utilisée dans le cadre de la lecture d'âge sur les otolithes qui demande l'acquisition d'un certain niveau d'expertise. Mais elle est encore peu développée pour l'estimation de la maturité. Il convient de noter que cette démarche d'"atelier maturité" prend du temps et reste "espèce-spécifique". Si elle est facilement accessible aux agents qui suivent les groupes CIEM et embarquent régulièrement à bord des bateaux réalisant les campagnes halieutiques, les participants occasionnels à l'échantillonnage des paramètres biologiques (étudiants, contractuels) n'auront pas cette expertise.

1.2 Les quatre espèces de téléostéens à l'étude

Les quatre espèces étudiées dans ce travail sont la plie (*Pleuronectes platessa*), le rouget barbet de roche (*Mullus surmuletus*), la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*) et la cardine à quatre taches (*Lepidorhombus bosci*). Ces quatre espèces sont régulièrement pêchées dans les zones suivies, point important pour permettre un échantillonnage mensuel suffisant réalisé grâce aux campagnes de pêche et complété par des achats en criée. Le programme *MATurité Objective des poissons par l'histologie quantitative* (MATO) auquel est adossé cette thèse ciblait d'abord des espèces de pleuronectiformes. Des premiers travaux avaient été initiés sur la sole (*Solea solea*) et nous avons choisi de les poursuivre sur 3 autres poissons plats : la plie et deux espèces de cardines. Par ailleurs, les professionnels de la pêche et financeurs de cette thèse étaient en demande d'informations sur la reproduction du rouget barbet de roche et nous avons de ce fait inclus cette espèce dans le projet *MATurité Objective des poissons par l'histologie quantitative* (MATO). En effet, pour cette espèce qui fait l'objet d'une pêche croissante, les stocks du Golfe de Gascogne et de Manche Est sont peu étudiés, avec comme seul apport de données celles des débarquements (ICES, 2022b,c).

1.3 La plie, *Pleuronectes platessa* Linnaeus, 1758

La plie (*P. platessa*) a été choisie car il s'agit d'une espèce abondante en Atlantique Nord-Est qui fait l'objet d'une pêche importante en France mais pour laquelle peu de données biologiques sont disponibles pour le stock de Manche Est (ICES, 2023c). Depuis les premiers travaux sur la plie (DAWES, 1930), plusieurs auteurs se sont intéressés à la biologie de sa reproduction, notamment dans le cadre de l'impact de la marée noire de l'Amoco-Cadiz sur la reproduction (BRULE, 1987; MIOSSEC, 1984) avec une description partielle de l'ovogenèse. De plus, un échantillonnage mensuel de cette espèce est facilement réalisable grâce aux campagnes halieutiques mais également à la criée de Port-en-Bessin

où elle est abondante en toutes saisons.

1.3.1 Biologie

Le plie est le seul représentant de son genre dans la famille des Pleuronectiformes (poissons plats) (FROESE et al., 2000).

Éléments de taxonomie :

Classe : Actinopterygii

Ordre : Pleuronectiformes

Famille : Pleuronectidae

Genre : *Pleuronectes*



FIGURE 2.1 – Photographie de *P. platessa*, ©Ifremer/P. Porcher

Distribution : Sa présence est signalée à l'ouest de la Méditerranée, le long des côtes Atlantiques européennes depuis l'Espagne et remonte jusqu'en Islande, mer Blanche et parfois jusqu'au Groenland (HOARAU et al., 2004; MILLNER et al., 2018). Cette espèce benthique est localisée dans des eaux peu profondes (<100 m) (HOARAU et al., 2004) sur des fonds de graviers, sableux ou vaseux. Elle se nourrit d'invertébrés tels que des polychètes, annélides et mollusques bivalves (IFREMER, 2011).

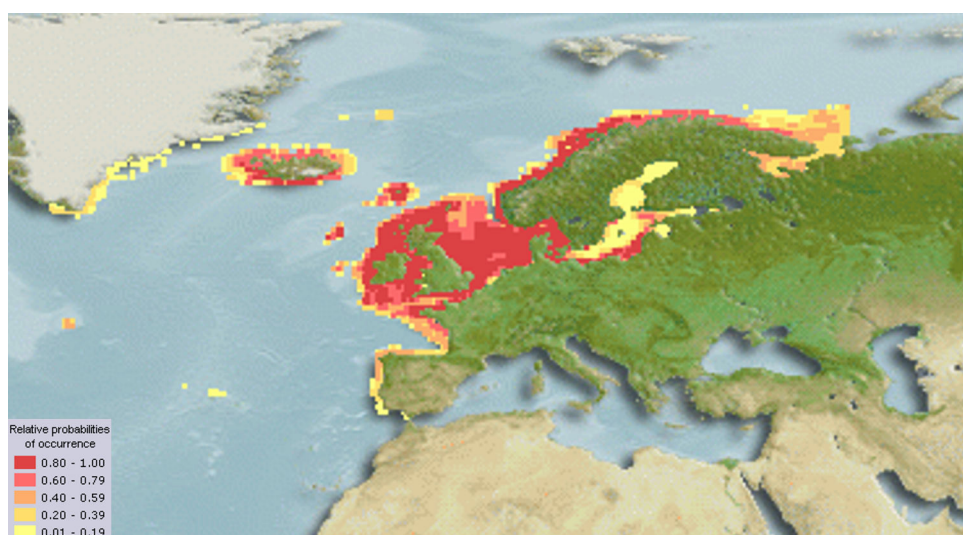


FIGURE 2.2 – Distribution géographique de *P. platessa* d'après les données ©Fishbase (FROESE et al., 2000) (<https://www.fishbase.se/summary/Pleuronectes-platessa.html>)

Cycle de vie : *P. platessa* est une espèce itéropare (qui se reproduit plusieurs fois au cours de sa vie). La femelle émet ses ovocytes à plusieurs reprises au cours de la saison de ponte (*batch spawner*), avec un développement ovocytaire groupe-synchrone (présentant au moins deux cohortes d'ovocytes en tout temps). Sa fécondité est dite déterminée (le nombre d'ovocytes en vitellogenèse avant le début de la ponte est considéré comme représentant la fécondité annuelle) (MURUA et al., 2003).

L'émission des ovocytes (ou ponte) a lieu au large en hiver, de décembre à mars (RIJNSDORP et al., 1991), à intervalles de deux à cinq jours sur une période de quatre à six semaines (RIJNSDORP, 1989). Des suivis de populations par marquage ont permis de montrer que les zones de ponte au large sont clairement définies et que les individus sont fidèles au site de reproduction et de nourrissage (DE VEEN, 1978), avec des migrations saisonnières des adultes entre les zones de ponte et les zones de nourrissage (HOARAU et al., 2004).

Pendant la période du frai, 20 000 à 600 000 œufs pélagiques seront relâchés par chaque femelle dans la colonne d'eau (RIJNSDORP et al., 1991) et dispersés par les courants, des frayères vers les nurseries côtières (DE VEEN, 1978 ; HOARAU et al., 2002). Les œufs puis les larves sont pélagiques sur une période de trois à quatre mois puis deviennent benthiques une fois la nurserie atteinte (GIBSON, 1973), au niveau d'embouchures d'estuaires ou dans des zones côtières peu profondes (moins de 20 m) (IFREMER, 2011 ; MILLNER et al., 2018). Les larves de *P. platessa* restent dans ces nurseries pour une période de 1 à 2 ans (GIBSON, 1973 ; HOARAU et al., 2002) avant de subir une métamorphose en juvéniles démersaux vers 10-15 mm (EDWARDS et al., 1968). Les juvéniles migrent ensuite en eaux de plus en plus profondes au fur et à mesure de leur croissance, jusqu'à rejoindre la population adulte (HOARAU et al., 2002 ; MILLNER et al., 2018).

1.3.2 Gestion du stock de Manche Est (7d)

Les populations de plies sont divisées en 10 stocks pour leur gestion. Le stock sur lequel porte ce travail est le stock de Manche Est dans la division CIEM 7d (ple.27.7d), un stock de catégorie 1 (stock avec évaluations quantitatives : suffisamment de données pour des analyses et prévisions complètes) (ICES, 2016, 2023c).

Le **Totaux Admissibles de Captures (TAC)** pour 2022 est de 9138 tonnes pour ce stock. Ce **TAC** est joint à celui du stock 7e (Manche Ouest), en raison des migrations des populations adultes des stocks ple.27.7e (Manche Ouest) et ple.27.420 (Mer du Nord et Skagerrak) vers le stock de Manche Est (ple.27.7d) en début d'année pour la reproduction (ICES, 2023c ; IFREMER, 2011).

La longueur minimale de capture pour la plie est de 27 cm (EUROPEAN UNION, 2001). Les longueurs réglementaires des mailles pour les différents engins de pêche varient de 80

mm à 100 mm et d'importants rejets sont observés pour cette espèce retrouvée dans les captures de pêcheries mixtes visant la sole (*Solea solea*) (MILLNER et al., 2018).

Comme le montre la Figure 2.3, en 2022 sur les 7520 tonnes de *P. platessa* capturées, 5919 tonnes étaient des rejets, laissant 1606 tonnes débarquées (36% de débarques françaises) (ICES, 2023c).

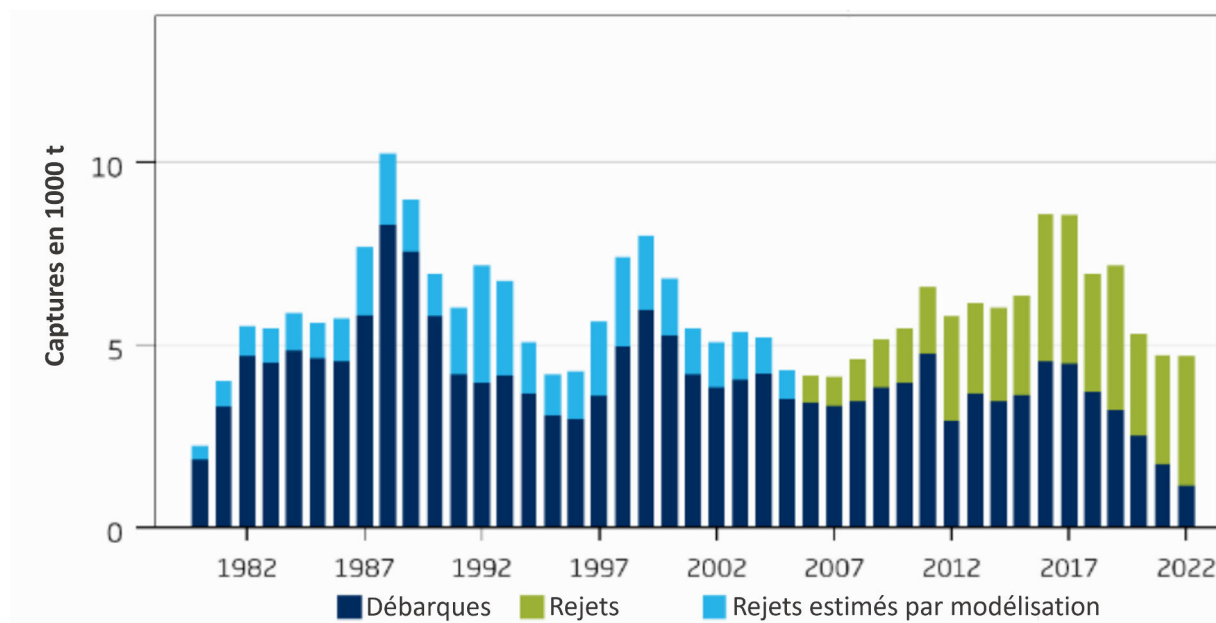


FIGURE 2.3 – Histogramme du nombre de captures pour *P. platessa*, de 1980 à 2022 pour le stock de Manche Est (ple.27.7d). Figure issue de ICES (2023c)

1.4 Le rouget barbet de roche, *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758

La deuxième espèce, le rouget barbet de roche (*M. surmuletus*) est une espèce à forte valeur commerciale en France. Les stocks du Golfe de Gascogne et de Manche Est sont peu étudiés, avec comme seul apport de données celles des débarquements (ICES, 2022b,c).

1.4.1 Biologie

Le rouget barbet de roche est un des 6 représentants de son genre dans la famille des Mullidae (rougets) (FROESE et al., 2000).

Éléments de taxonomie :

Classe : Actinopterygii

Ordre : Perciformes

Famille : Mullidae

Genre : *Mullus*



FIGURE 2.4 – Photographie de *M. surmuletus*, ©Hans Hillewaert (https://fr.wikipedia.org/wiki/Mullus_surmuletus)

Distribution : *M. surmuletus* est retrouvé en Atlantique Est, le long des côtes européennes, de la Manche jusqu'au détroit de Gibraltar, mais aussi au nord de l'Afrique de l'Ouest jusqu'au Dakar, en Mer Méditerranée et en Mer Noire (WHITEHEAD et al., 1986b). C'est une espèce benthique présente sur des fonds rocheux et sableux à moins de 100 m de profondeur (QUÉRO, 1984b; WHITEHEAD et al., 1986b), les plus grands individus pouvant se retrouver entre 200 et 400 m de fond (QUÉRO, 1984b). Pendant leur phase pélagique, les larves planctonophages se nourrissent de larves de crustacés et copépodes, et leur régime alimentaire est constitué essentiellement de crevettes, amphipodes, polychètes, mollusques et petits poissons benthiques une fois la phase benthique atteinte (QUÉRO, 1984b; WHITEHEAD et al., 1986b).

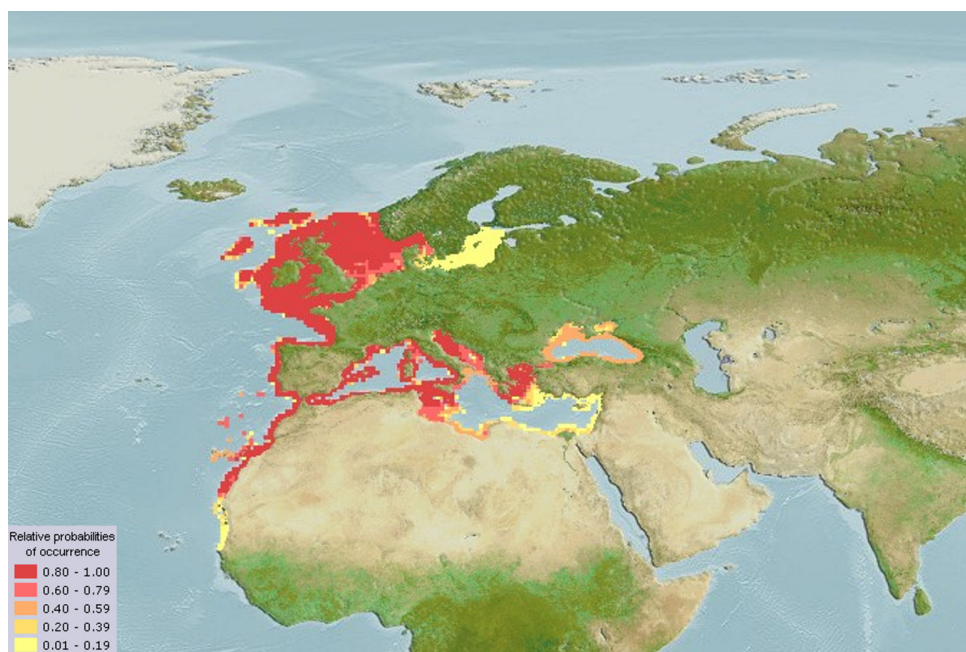


FIGURE 2.5 – Distribution géographique de *M. surmuletus* d’après les données ©Fishbase (FROESE et al., 2000) (<https://www.fishbase.se/summary/Mullus-surmuletus.html>)

Cycle de vie : *M. surmuletus* est une espèce itéropare, avec plusieurs évènements d’émission d’ovocytes au cours de la saison de reproduction (*batch spawner*) et une fécondité déterminée (N’DA et al., 1993).

La dynamique de l’ovogenèse n’a été que peu décrite (N’DA et al., 1993) et les recherches portant sur la croissance des individus des stocks autres que celui de la Méditerranée sont limitées (DESBROSSES, 1933 ; DOREL, 1986 ; MAHÉ et al., 2014 ; N’DA et al., 2006).

La période du frai se situe entre mai et juillet. Les œufs se développent dans la colonne d’eau et évoluent en larves pélagiques qui seront progressivement ramenées vers les côtes (QUÉRO, 1984b ; WHITEHEAD et al., 1986b). Les juvéniles ont une distribution côtière alors que les adultes sont retrouvés plus au large. En Méditerranée, GARCIA-RUBIES et al. (1995) ont mis en évidence une migration des individus reproducteurs, avec un recrutement des juvéniles dans les herbiers de posidonies (*Posidonia oceanica*) à faible profondeurs et une ponte dans des habitats plus profonds (MACHIAS et al., 1998).

1.4.2 Gestion des stocks

En 2022, le rouget barbet de roche de la zone de l’*Organisation des Nations Unies pour l’alimentation et l’agriculture* (FAO) 27 était géré sous deux stocks, le stock mur.27.43a7d incluant les divisions 4 (mer du Nord), 7d (Manche Est) et 3a (Skagerrak, Kattegat)

(ICES, 2022b) et le stock mur.27.67a-ce-k89a incluant les divisions 6,8, 7a–c, 7e–k et 9a (Mer du Nord, Golfe de Gascogne, sud de la mer Celtique et la côte Atlantique de la péninsule Ibérique) (ICES, 2022c).

Afin de faciliter la compréhension dans la suite de ce manuscrit, le stock mur.27.43a7d sera cité sous l'appellation "stock de Manche Est" et le stock mur.27.67a-ce-k89a sera nommé "stock du Golfe de Gascogne". Ces appellations sont liées au fait que l'échantillonnage effectué dans le stock mur.27.43a7d était localisé dans la division 7d (Manche Est) alors que l'échantillonnage dans le stock mur.27.67a-ce-k89a était localisé dans les divisions 7j, 7g et 8a-c, majoritairement situées dans le Golfe de Gascogne.

Pour ces deux stocks classés en catégorie 5 (données insuffisantes : seules les données de débarquements sont disponibles), ni **TAC** ni longueur minimale de capture n'ont été mis en place au niveau européen.

Pour le stock de Manche Est, la taille des mailles pour les engins de pêche est de 70–99 mm. Il n'y a pas de rejets pour ce stock, avec 2976 tonnes débarquées en 2021 (19.9% des débarques françaises), dont 1745 tonnes issues de la division 7d (Manche Est) (ICES, 2022b).

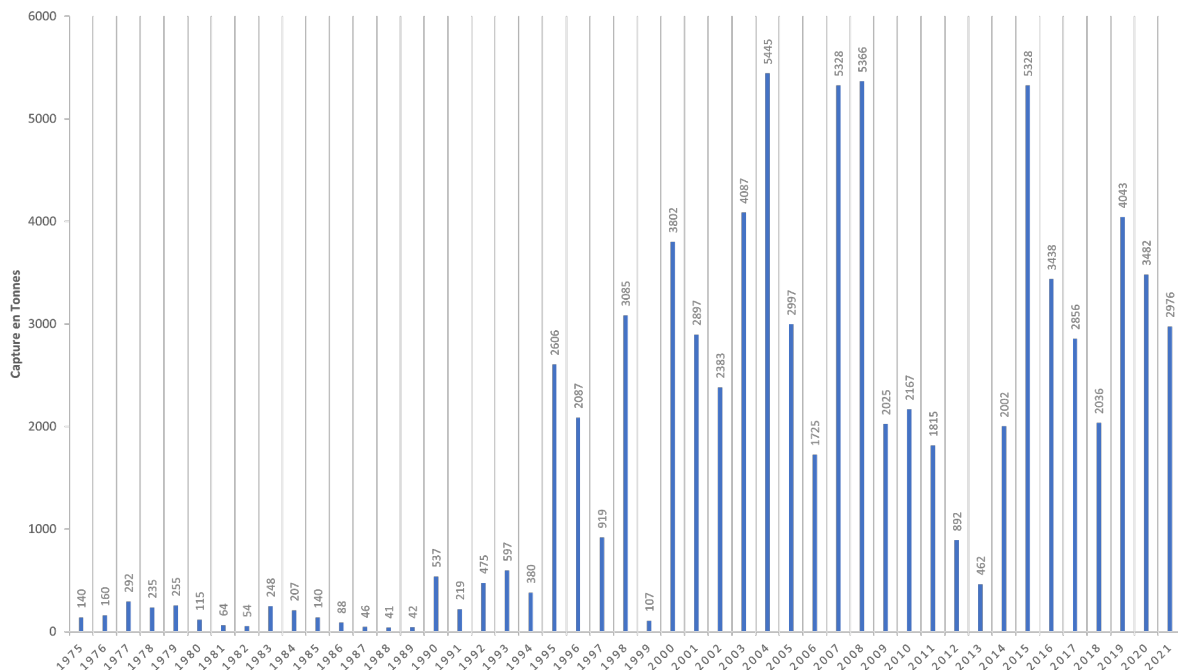


FIGURE 2.6 – Histogramme du nombre de captures pour *M. surmuletus*, de 1975 à 2021 pour le stock Manche Est. Figure réalisée à partir des données de ICES (2022b)

Pour le stock du Golfe de Gascogne, seule la France a mis en place une longueur minimale de capture de 16 cm en 2002, revue à 15 cm en 2013 (FRANCE, 2013). Les

débarques en rouget barbet de roche en 2021 étaient de 1445 tonnes (57.8% des débarques françaises), dont 844 tonnes issues des mêmes divisions que celles échantillonnées lors de cette thèse (7j, 7g, 8a-c) (ICES, 2022c).

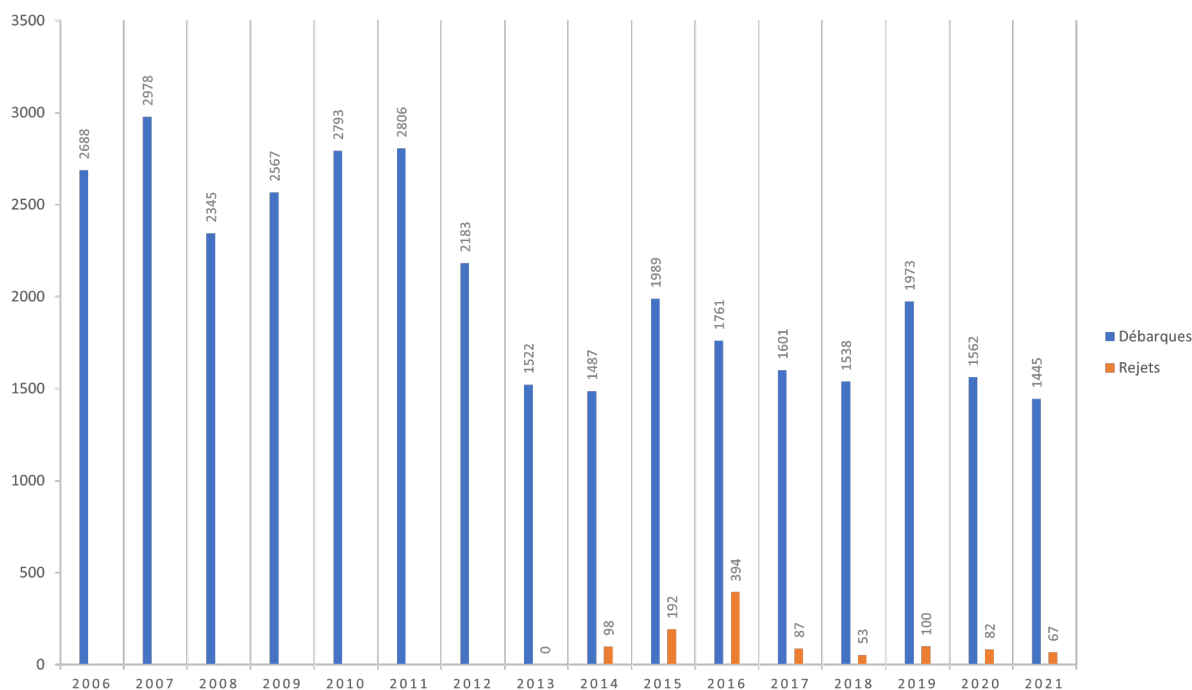


FIGURE 2.7 – Histogramme du nombre de captures (débarques et rejets) pour *M. surmuletus*, de 2006 à 2021 pour le stock du Golfe de Gascogne. Figure réalisée à partir des données de ICES (2022c)

1.5 La cardine franche, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792)

La cardine franche (*L. whiffiagonis*) et la cardine à quatre taches (*L. bosci*) sont deux espèces pêchées sur les côtes françaises, mais pour lesquelles nous disposons de peu d'informations concernant la reproduction. Ce sont néanmoins des espèces pour lesquelles l'échantillonnage a été possible par les campagnes halieutiques (CGFS et EVHOE) et qui restent disponibles en criée pour la cardine franche.

1.5.1 Biologie

La cardine franche est un des 2 seuls représentants du genre dans la famille des Scophthalmidae (turbot) (FROESE et al., 2000).

Éléments de taxonomie :

Classe : Actinopterygii

Ordre : Perciformes

Famille : Scophthalmidae

Genre : *Lepidorhombus*



FIGURE 2.8 – Photographie de *L. whiffiagonis*, ©Carine Sauger

Distribution : L'espèce *L. whiffiagonis* est largement distribuée en Atlantique Nord-Est, de la Norvège au cap Bojador, ainsi qu'à l'ouest de la mer Méditerranée (QUÉRO, 1984a; WHITEHEAD et al., 1986a). Ce poisson plat se trouve sur les substrats meubles (WHITEHEAD et al., 1986a), à des profondeurs comprises entre 100 et 600 m, mais en plus grande abondance entre 100 et 400 m de profondeur (QUÉRO, 1984a). Benthivore carnivore opportuniste, il se nourrit essentiellement de petits poissons et crustacés (DU BUIT, 1992; MORTE et al., 1999; ŠANTIĆ et al., 2009) et occasionnellement de quelques mollusques et céphalopodes (QUÉRO, 1984a; WHITEHEAD et al., 1986a).

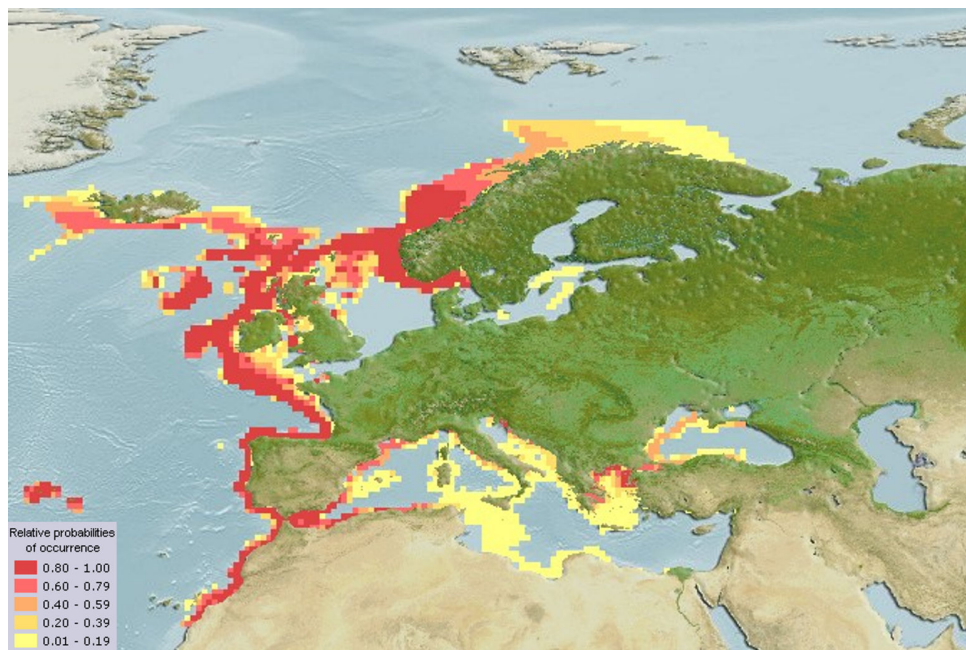


FIGURE 2.9 – Distribution géographique de *L. whiffiagonis* d'après les données ©Fishbase (FROESE et al., 2000) (<https://www.fishbase.se/summary/Lepidorhombus-whiffiagonis.html>)

Cycle de vie : *L. whiffiagonis* est une espèce itéropare. En amont de la période du frai, elle met en place un stock d'ovocytes qui seront émis lors de plusieurs événements de ponte au cours de la saison de reproduction (NIELSEN, 1989).

La période du frai de *L. whiffiagonis* se situe entre février et mars (DOMINGUEZ-PETIT et al., 2018). Les œufs se développent dans la colonne d'eau, et après l'éclosion, les larves sont pélagiques (QUÉRO, 1984a). Les individus immatures vivent dans les eaux les plus profondes (plus de 300 m), se déplaçant vers les fonds du plateau continental au fur et à mesure de leur croissance (QUÉRO, 1984a). Aucune migration n'a pu être mise en évidence pour cette espèce où les juvéniles sont plus sténobathiques que les adultes (DANANCHER et al., 2009 ; SÁNCHEZ et al., 1998).

Enfin, chez cette espèce, la croissance est plus rapide chez les femelles que chez les mâles (QUÉRO, 1984a). Il a également été rapporté que les femelles atteignent un âge plus avancé que les mâles (LANDA et al., 1996).

1.5.2 Gestion des stocks

Pour *Lepidorhombus* spp., les deux stocks lez.27.4a6a et lez.27.6b ne différencient pas *L. whiffiagonis* et *L. boscii*. Pour les quatre stocks retrouvés en 27.7b-k8abd et 8c9a, les deux espèces sont évaluées séparément, mais leur zone et gestion est commune en terme de **TAC** et de longueur minimale de capture (20 cm en Atlantique Nord-Est). Pour 2022, un **TAC** commun de 18916 tonnes a été attribué à *L. whiffiagonis* et *L. boscii* des zones 7 et divisions 8a–b et 8d–e. Ces espèces à hautes valeurs commerciales, issues des pêcheries démersales mixtes restent néanmoins des prises accessoires (ICES, 2023a).

L. whiffiagonis a été échantillonné dans les divisions CIEM 27.7e-h, 27.7j et 28.8a-c, issues du stock meg.27.7b-k8abd qui regroupe les divisions 7.b–k, 8.a–b, et 8.d (ouest et sud-ouest de l'Irlande et Golfe de Gascogne). Ce stock est de catégorie 1 (stocks avec évaluations quantitatives : suffisamment de données pour des analyses et prévisions complètes) (ICES, 2016, 2023b), avec 13161 tonnes pêchées en 2022, dont 10821 tonnes débarquées (29.2% de débarques françaises) et 2340 tonnes de rejets. Il est à noter qu'avant 2017, les deux espèces étaient débarquées sous l'appellation unique de *Lepidorhombus whiffiagonis* (ICES, 2023a).

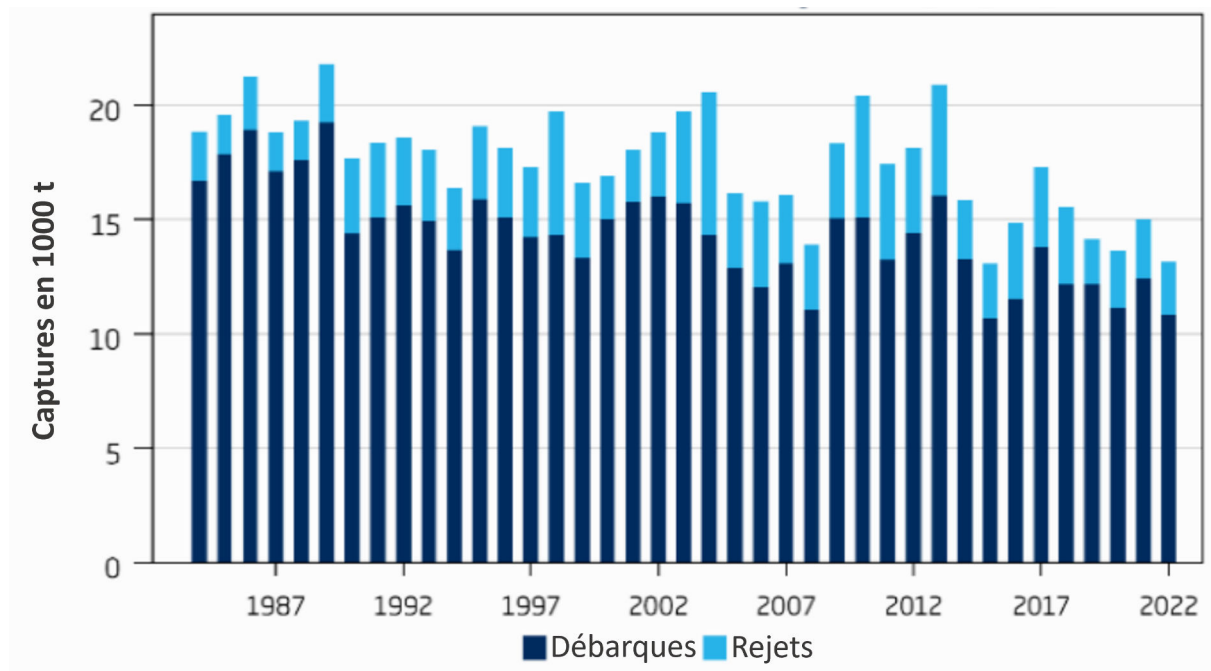


FIGURE 2.10 – Histogramme du nombre de captures pour *Lepidorhombus* spp., de 1984 à 2022 pour le stock 27.7b-k8abd. Figure issue de ICES (2023b)

1.6 La cardine à quatre taches, *Lepidorhombus boscii* (Risso, 1810)

1.6.1 Biologie

La cardine à quatre taches est le second représentant de son genre dans la famille des Scophthalmidae (turbot)(FROESE et al., 2000).

Éléments de taxonomie :

Classe : Actinopterygii

Ordre : Perciformes

Famille : Scophthalmidae

Genre : *Lepidorhombus*



FIGURE 2.11 – Photographie de *L. boscii*, ©Carine Sauger

Distribution : *L. boscii* est retrouvée en Atlantique Nord-Est, des îles Féroé au cap Bojador, et en mer Méditerranée (QUÉRO, 1984a; WHITEHEAD et al., 1986a). Les cardines à quatre taches peuvent être retrouvées de 150 m à 800 m de profondeur, mais sont

présentes majoritairement entre 200 m et 600 m (QUÉRO, 1984a; WHITEHEAD et al., 1986a), sur des substrats meubles (WHITEHEAD et al., 1986a) et se nourrissent de crustacés (mysides et natantides) (MORTE et al., 1999), mais aussi d'isopodes et d'amphipodes, la longueur des proies consommées étant proportionnelle à celle de la mâchoire du poisson (VASSILOPOULOU, 2006).

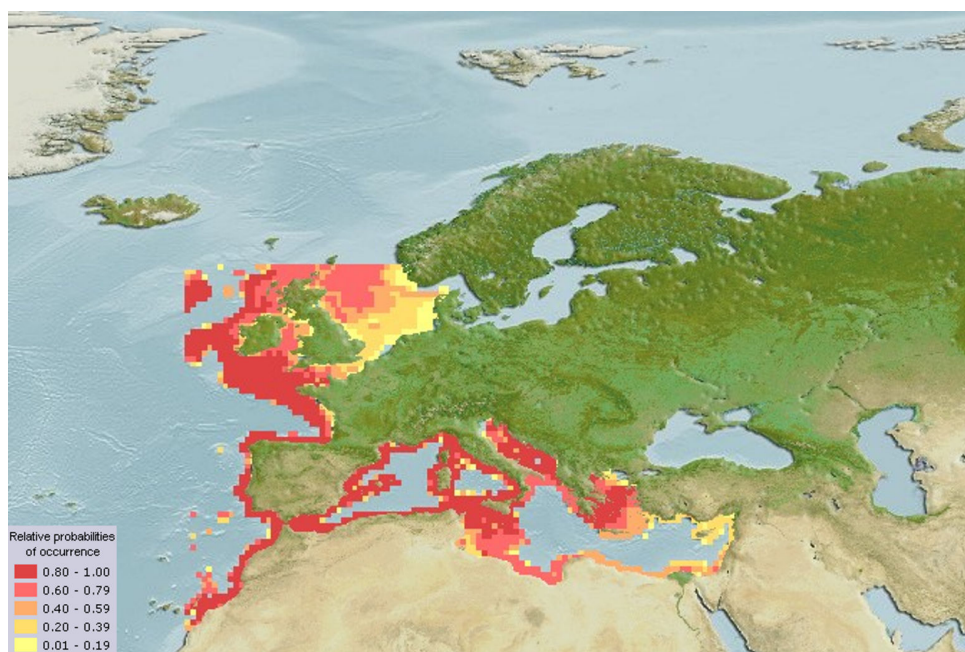


FIGURE 2.12 – Distribution géographique de *L. boscii* d'après les données ©Fishbase (FROESE et al., 2000) (<https://www.fishbase.se/summary/Lepidorhombus-boscii.html>)

Cycle de vie : *L. boscii* est une espèce itéropare, avec plusieurs évènements d'émission de gamètes au cours de la saison de reproduction (*batch spawner*) (QUÉRO, 1984a; UGRIN et al., 2023). La reproduction a lieu de mars à juin (QUÉRO, 1984a; WHITEHEAD et al., 1986a), avec en moyenne 450 000 ovocytes émis pour une femelle de 45 cm. Les larves pélagiques éclosent après 5 à 6 jours d'incubation (QUÉRO, 1984a). Les individus immatures sont sténobathiques, ils vivent dans les couches les plus profondes. Au fur et à mesure de leur croissance, les individus se déplacent vers le fond du plateau continental. (QUÉRO, 1984a; SÁNCHEZ et al., 1998; VASSILOPOULOU, 2000). De plus, chez cette espèce, une croissance identique des individus mâles et femelles est observée la première année, par la suite les femelles croissent plus rapidement et présentent une longévité plus importante que les mâles (CASTILHO et al., 1993; CENGIZ et al., 2013; LANDA et al., 2002; VASSILOPOULOU et al., 1999). GERRITSEN et al. (2010) ont suggéré une préférence d'habitat en fonction du sexe, ce qui expliquerait les grands écarts entre les *sex ratio* retrouvés en fonction de la profondeur.

1.6.2 Gestion des stocks

Les cardines à quatre taches (*L. boscii*) échantillonnées lors de ce projet provenaient des divisions CIEM 27.7j et 27.8a-c. Elles appartiennent donc au stock ldb.27.7b-k8abd qui inclut les divisions 7.b-k, 8.a-b et 8.d (ouest et sud-ouest de l'Irlande et Golfe de Gascogne). Ce stock de catégorie 5 dispose de peu de données pour la mise en place de points de références qui permettraient son évaluation. De plus, avant 2017, les deux espèces étaient débarquées sous la même appellation *L. whiffiagonis* (ICES, 2023a). La Figure 2.13 représente l'évolution des captures, mais les années 2020 et 2021 ne sont pas représentatives d'une année complète par manque de données suite à la pandémie Covid-19 (ICES, 2022a).

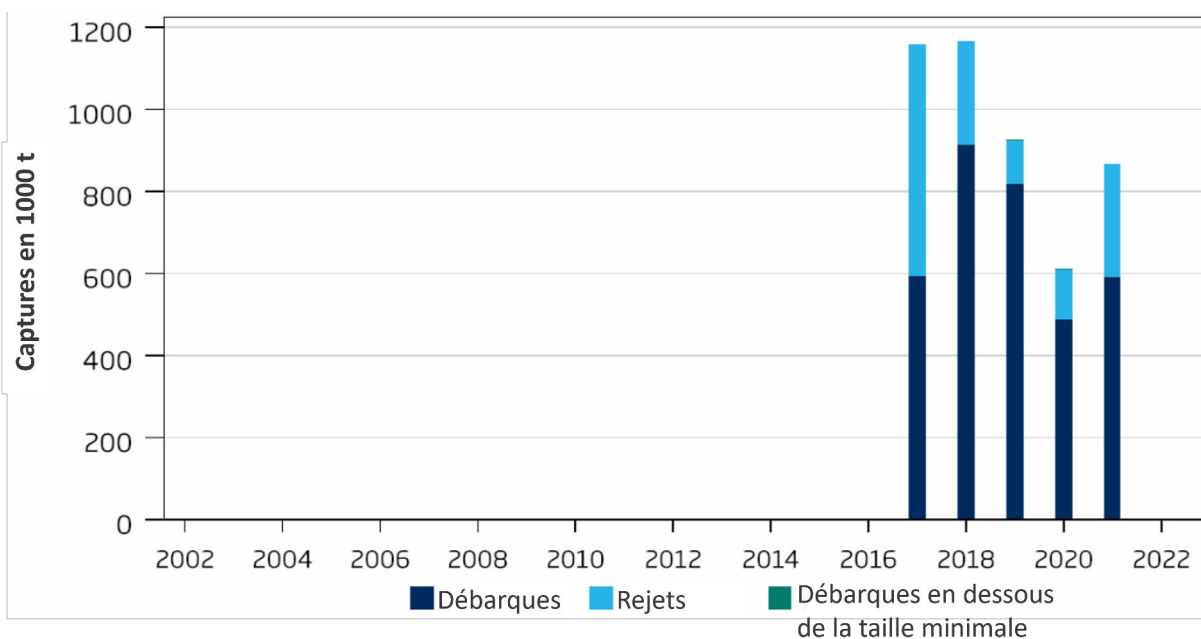


FIGURE 2.13 – Histogramme du nombre de captures pour *L. boscii*, de 2017 à 2021 pour le stock 27.7b-k8abd. Figure issue de ICES (2022a)

Objectifs

La première partie de ce travail a consisté à échantillonner sur une année complète ces 4 espèces *Pleuronectes platessa*, *Mullus surmuletus*, *Lepidorhombus whiffiagonis* et *Lepidorhombus boscii* pour caractériser leurs cycles de reproduction en utilisant les méthodes de référence pour la détermination des phases de maturité. Ces espèces font l'objet de taux de captures décroissants. De plus, même si la plie (*P. platessa*) en mer du Nord fait partie des espèces bien décrites en Europe, cela n'est pas le cas pour les trois autres espèces à l'étude qui ne sont pas considérées comme sensibles et dont les données disponibles sont insuffisantes à leur évaluation.

L'objectif est, dans un premier temps, d'acquérir de l'information sur les cycles biologiques de ces espèces en s'appuyant sur les données de la maturité macroscopique utilisée en halieutique. Dans un deuxième temps, des fiches d'aides à l'identification de la phase de maturité pourront être mises en place sur la base de photographies standardisées de gonades, prises lors de l'échantillonnage. Ces fiches ont pour but d'harmoniser les identifications lors des campagnes en mer.

Ces premières informations serviront de référence lors de mise au point, par la suite, de méthodologies alternatives pour déterminer la maturité [Chapitre 3](#). Pour cela, nous avons effectué des échantillonnages mensuels lors de campagnes halieutiques, avec des compléments de prélèvements en criée hors des périodes de campagnes. Lors des prélèvements des paramètres biologiques (masse, longueur totale, âge et phase de maturité déterminé par aspect macroscopique) les protocoles préconisés par le [CIEM](#) ont été suivis.

2 Matériel et Méthodes

2.1 Paramètres biologiques

Pour chaque espèce suivie, les individus ont été récoltés frais lors des campagnes d'échantillonnages en mer *EValuation Halieutique Ouest de l'Europe (EVHOE)*, *Channel Ground Fish Survey (CGFS)* et *International Bottom Trawl Survey (IBTS)*. Lorsque un échantillonnage en mer n'était pas possible, ou insuffisant, des individus ont été récupérés entiers (non éviscérés) en criée et conservés sur glace le temps de l'acheminement vers le laboratoire, avant l'extraction des ovaires. Tous les mois, environ 15 individus femelles ont été pesés (masse totale au gramme près), mesurés (longueur totale au centimètre près), et les otolithes ont été extraits pour l'estimation de l'âge et envoyés au Pôle sclérochronologique d'*Ifremer* de Boulogne-sur-Mer (France). Les ovaires ont été pesés séparément (à 0.01 gramme près). Les masses des individus et de leurs gonades ont permis de calculer l'**Indice Gonado-Somatique (IGS)** selon la formules suivantes :

$$IGS(\%) = \frac{\text{Masse des gonades}}{\text{Masse totale de l'individu}} * 100 \quad (2.1)$$

2.2 Prises de photographies de gonades

Lors de la dissection, les gonades ont été photographiées. Trois images ont été prises : une image de l'individu entier avec la cavité abdominale ouverte laissant voir la gonade en place, une image de l'individu entier et de ses gonades en dehors de la cavité abdominale du poisson sur fond de couleur uniforme, et enfin une image en gros plan des ovaires. Sur toutes ces photos, une règle graduée et une étiquette d'identification sont présentes, ce qui permet d'éviter les erreurs d'identification.

La prise de photographies a été standardisée afin d'appliquer la méthode à toutes les espèces commerciales retrouvées lors des campagnes halieutiques. Un protocole de prise de photographies a été rédigé (**Publication 1** du **Volume II**, LE MELEDER et al., 2022). Les photographies ainsi réalisées constituent une banque de données homogènes, particulièrement utiles pour la création de fiches d'aide à l'identification des phases de maturité par la méthode macroscopique chez de nombreuses espèces (LE MELEDER, 2022).

2.3 Phases de maturité macroscopique

Les femelles des différentes espèces ont été classées dans une des phases de maturité en fonction des critères macroscopiques préconisés par le CIEM et présentés dans le **Tableau 2.1**. Le *package sizeMat* (TORREJON-MAGALLANES, 2018) sous R Studio a permis le calcul de la longueur (L_{50}) et de l'âge (A_{50}) auxquels 50% de la population est sexuel-

lement mature. Les critères principaux pour la détermination de la phase de maturité sexuelle chez les femelles sont repris ci-dessous :

Immature (A) : femelles présentant un ovaire translucide (lame d'un couteau visible par transparence en soulevant l'ovaire de la cavité), sans présence d'ovocytes hydratés.

Développement (B) : ovaires fermes, opaques avec quelques vaisseaux sanguins visibles et une couleur rose-rougeâtre voire orange en fonction de l'espèce.

Ponte (C) : il est possible de provoquer par simple *stripping* l'expulsion d'œufs hydratés avant même l'ouverture de la cavité abdominale. Après ouverture, les ovaires apparaissent larges, contiennent au moins un œuf hydraté (cellule ronde translucide) et les vaisseaux sanguins sont nombreux.

Régression/Régénération (D) : les ovaires sont rougeâtres, leur paroi est flasque, d'aspect étiré. Ils sont généralement vides mais peuvent contenir encore quelques ovocytes hydratés.

Omission de ponte (E) : La phase E n'a pas été utilisée lors de la détermination des phases par critères macroscopiques. En effet, elle se caractérise par des marques cellulaires d'atrésie des follicules observables en microscopie.

Anormal (F) : Cette phase est indiquée lorsque l'on observe des signes de nécrose, de sclérose, d'intersexe chez une espèce gonochorique ou un aspect pathologique de la gonade.

Il est à noter que l'utilisation des sous-phases (Ba, Bb, Ca, CB, Da et Db) présentées dans le [Tableau 1.1](#) du [Chapitre 1](#) dépendra de l'espèce à l'étude. Parmi les résultats présentés ici, les sous-phases Développement mais fonctionnellement immature (Ba) et Développement mais fonctionnellement mature (Bb) ont été utilisées pour la cardine à quatre taches. Les critères du [CIEM](#) sont les suivants :

Développement mais fonctionnellement immature (Ba) : ovaires d'une longueur de moins de la moitié de la cavité abdominale, absence d'ovocytes hydratés visibles à l'oeil nu et une coloration rosâtre/rouge de l'ovaire.

Développement mais fonctionnellement mature (Bb) : ovaires d'une longueur d'environ la moitié de celle de la cavité abdominale, pas d'ovocytes hydratés visibles à l'oeil nu et une coloration de l'ovaire allant du rose-rougeâtre à l'orange.

Finalement, pour valider la détermination de la maturité macroscopique sur le terrain lors de campagnes halieutiques, 3 agents ont assigné une phase de maturité aux mêmes 25 individus *L. bosciï* frais. Le pourcentage d'accord entre les 3 lecteurs a été calculé (MCHUGH, 2012) sous RStudio (TEAM, 2022).

3 Résultats

3.1 La plie (*Pleuronectes platessa*)

3.1.1 Échantillonnage

L'échantillonnage pour la plie (Tableau 2.2), ainsi que les résultats des Indices Gonado-Somatiques (IGS) ont été décrits en détail dans l'Article 1 (Figure 9a, cf. page 132). Au total, 151 femelles ont pu être récoltées, de longueur comprises entre 15 et 36 cm.

TABLEAU 2.2 – Nombre total d'individus *P. platessa* échantillonnés par apports commerciaux dans le stock de Manche Est (division CIEM 7d)

Mois	Nombre d'individus
Jan. 2017	5
Déc. 2017	5
Mars 2018	10
Juin 2018	12
Nov. 2018	14
Déc. 2018	10
Jan. 2019	24
Fév. 2019	23
Mars 2019	30
Août 2019	18

3.1.2 Indice gonado-somatique

Les **IGS** ont été rapportés en fonction de la phase de maturité (Figure 2.14). Les individus classés en phase C (ponte) par la méthode macroscopique ont un **IGS** en moyenne plus élevés (à 17%) que ceux des autres phases (<3%). Toutefois, comme le montre la Figure 2.14, cet indice ne permet pas de distinguer entre elles les autres phases de maturité.

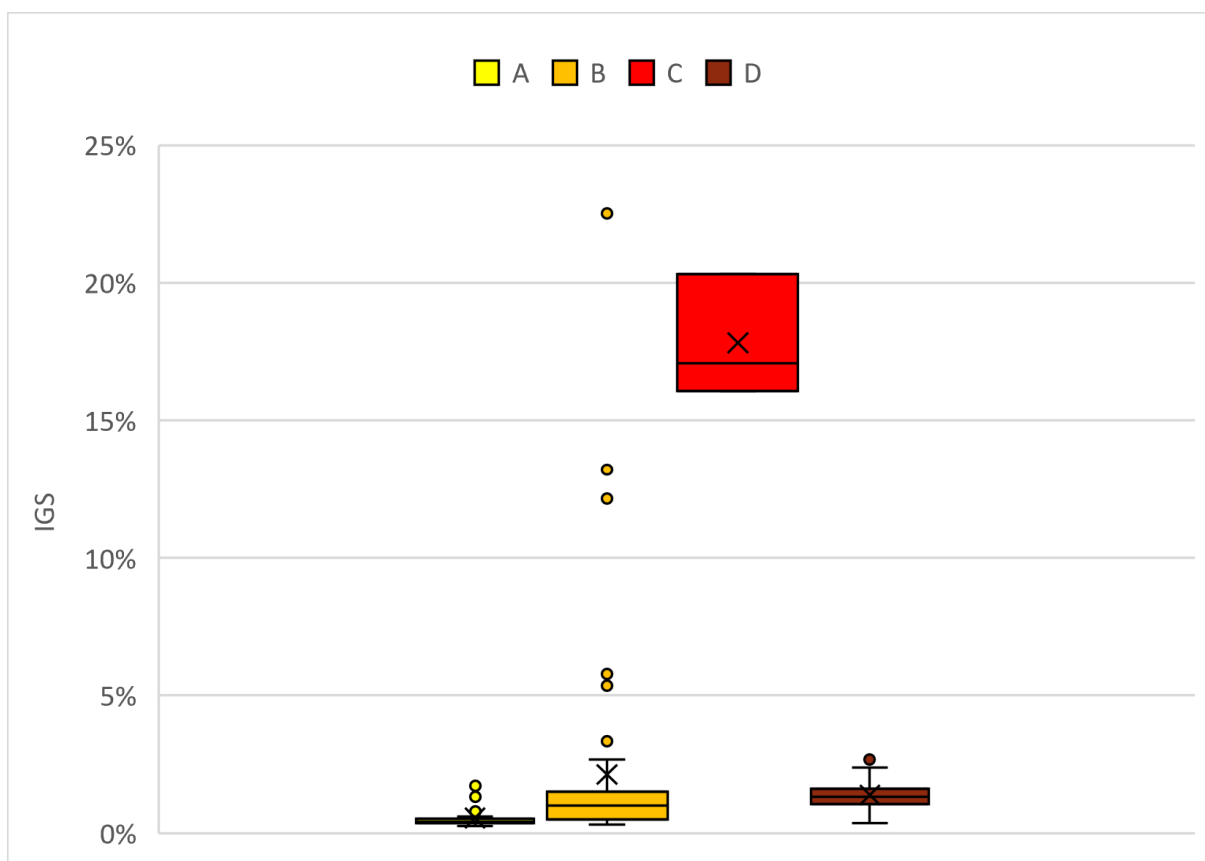


FIGURE 2.14 – Boxplot des indices gonado-somatiques (IGS %) chez des femelles *P. platessa* classées en fonction de leur phase de maturité définies par critères macroscopiques, avec : Immature (A), Développement (B), En ponte (C) et Régression / Régénération (D). Figure tirée de SAUGER et al. (2023d)

3.1.3 L_{50} et A_{50}

Sur la base de ces données macroscopiques de maturité, la L_{50} et l' A_{50} ont été calculées (Figure 2.15). Les valeurs obtenues sont : $L_{50} = 28.6$ cm et A_{50} entre 3 et 4 ans.

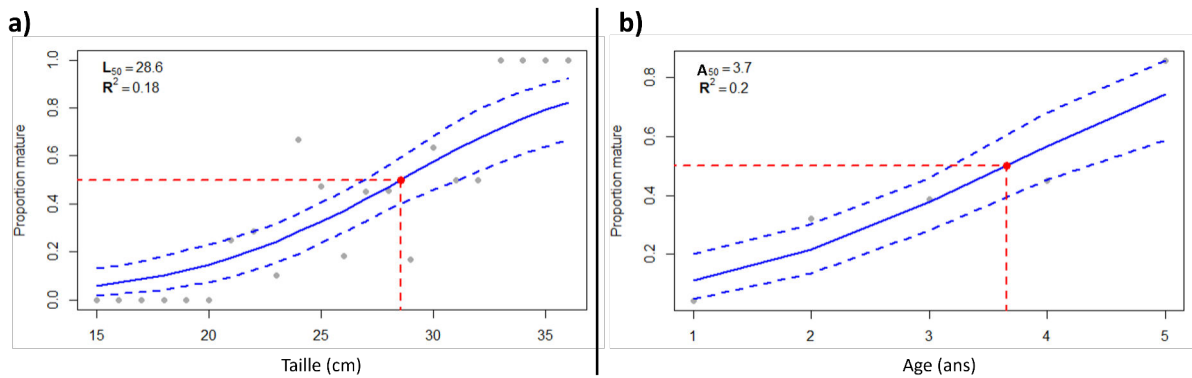


FIGURE 2.15 – Courbes pour a) la longueur (L_{50}) et b) l'âge (A_{50}) pour lesquels 50% de la population est sexuellement mature pour les femelles *P. platessa*, issues des données de maturité obtenues par identification de critères macroscopiques

3.2 Le rouget barbet de roche (*Mullus surmuletus*)

3.2.1 Échantillonnage

L'échantillonnage des individus *M. surmuletus* provenant des deux stocks (Tableau 2.3) a été décrit dans l'Article 3 (p. 184). Au total, 317 femelles de longueurs comprises entre 12 et 36 cm ont été collectées.

TABLEAU 2.3 – Nombre total d’individus *M. surmuletus* échantillonnés dans le stock de Manche Est (division CIEM 7d) et le stock du Golfe de Gascogne (divisions CIEM 8a, 8b, 8c, 7g et 7j)

Mois	Nombre d’individus	Division CIEM	Source
Nov. 2020	9	7j ; 7g	EVHOE 2020
Fév. 2021	20	7d	Commerciale
Mars 2021	13	7d	Commerciale
Avr. 2021	12	7d	Commerciale
Mai 2021	15	7d	Commerciale
Mai 2021	11	8b ; 8c	Commerciale
Juin 2021	7	8a	Commerciale
Juil. 2021	15	8b	Commerciale
Août 2021	15	7d	Commerciale
Sept. 2021	15	7d	Commerciale
Sept. 2021	15	8b	Commerciale
Oct. 2021	3	8b	EVHOE 2021
Oct. 2021	27	7d	CGFS 2021
Oct. 2021	14	7d	Commerciale
Nov. 2021	10	7d	Commerciale
Nov. 2021	1	7g	EVHOE 2021
Nov. 2021	11	8a ; 8b	EVHOE 2021
Nov. 2021	16	8b	Commerciale
Déc. 2021	14	7d	Commerciale
Jan. 2022	15	7d	IBTS 2022
Jan. 2022	15	7d	Commerciale
Fév. 2022	15	7d	Commerciale
Fév. 2022	15	8b	Commerciale
Août 2022	14	7d	Commerciale

3.2.2 Indice gonado-somatique

Les **IGS** moyens des individus des phases A, B, D et F sont $<2.5\%$, alors que l’**Indice Gonado-Somatique** moyen pour les individus en ponte (C) est de 7.5% . Néanmoins, une variabilité importante est observée pour les phases Développement (B) et Ponte (C).

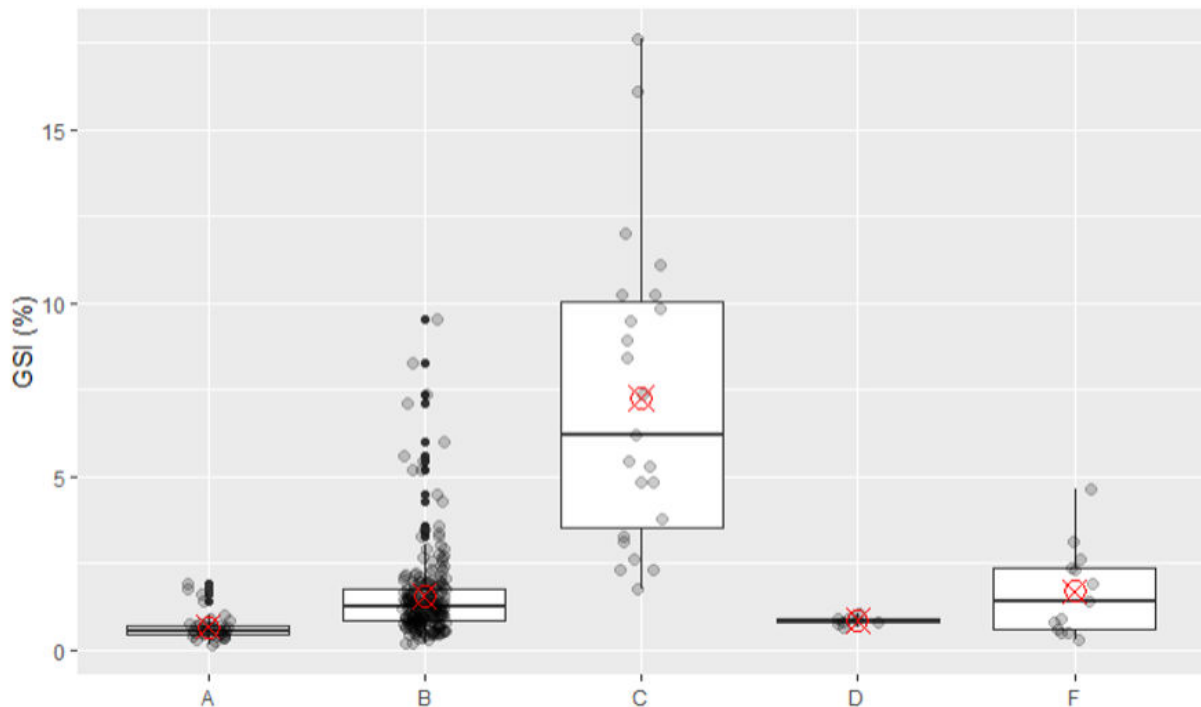


FIGURE 2.16 – Boxplot des indices gondo-somatiques (IGS %) des femelles rouget barbet de roche (*M. surmuletus*) ($n = 296$) classées en fonction de leur phase de maturité définie par critères macroscopiques, avec : Immature (A), Développement (B), En ponte (C), Régression / Régénération (D) et Anormal (F)

3.2.3 L_{50} et A_{50}

La L_{50} et l' A_{50} calculés avec les données de maturité macroscopique ont aussi été décrites dans l'Article 3 (Figure 9a, cf. page 184). La longueur à maturité (L_{50}) a été estimée à 18.0 cm pour un A_{50} à 0.3 an Figure 2.17.

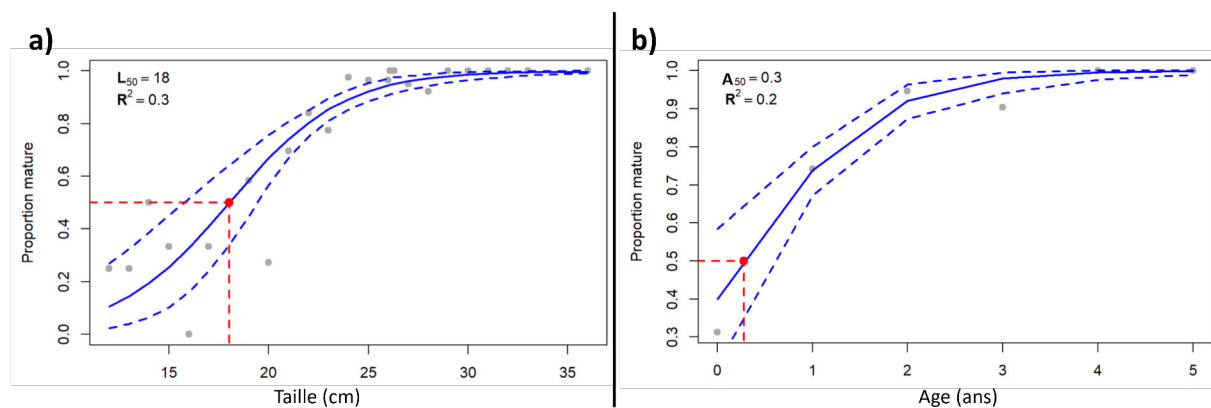


FIGURE 2.17 – Courbes pour a) la longueur (L_{50}) et b) l'âge (A_{50}) auxquels 50% de la population est sexuellement mature pour les femelles rouget barbet de roche (*M. surmuletus*), issues des données de maturité obtenues par identification de critères macroscopiques

3.3 La cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*)

3.3.1 Échantillonnage

L'échantillonnage de *L. whiffiagonis* repose sur des prises lors des campagnes en mer EVHOE et des débarquements commerciaux (Tableau 2.4). L'échantillonnage des individus immatures n'a pu être réalisé que lors des campagnes en mer qui permettaient le prélèvement d'individus de petite taille. Au total, 202 femelles ont été récoltées, de longueurs comprises entre 10 et 64 cm.

TABLEAU 2.4 – Nombre total d'individus *L. whiffiagonis* échantillonnés dans différentes divisions du CIEM tous les mois pendant l'étude

Mois	Nombre d'individus	Division CIEM	Source
Nov. 2019	25	7h ; 7j	EVHOE 2019
Nov. 2020	14	7h ; 7j	EVHOE 2020
Déc. 2020	1	7h	EVHOE 2020
Mai 2021	15	7h ; 7g	Commerciale
Juin 2021	15	7h	Commerciale
Juil. 2021	15	7h ; 7e	Commerciale
Oct. 2021	15	7g ; 7f	Commerciale
Oct. 2021	6	8a ; 8b ; 8c	EVHOE 2021
Nov. 2021	6	8a ; 8b	EVHOE 2021
Nov. 2021	15	7j	EVHOE 2021
Déc. 2021	15	7e ; 7g	Commerciale
Jan. 2022	15	7f	Commerciale
Fév. 2022	15	7g	Commerciale
Mars 2022	15	7g	Commerciale
Mai 2022	15	7g	Commerciale

3.3.2 Indice gonado-somatique

L'Indice Gonado-Somatique (IGS) moyen des individus classés en ponte (C) est le plus élevé (10%) et les individus ayant pondu (D) ont l'IGS moyen le plus faible (1%) par rapport aux autres phases (Figure 2.18). En moyenne, l'IGS augmente de novembre à mars, lors de la période du frai, avec la valeur la plus élevée en février à 11%. Pour cette espèce également, la dispersion des valeurs est très forte, notamment pour les phases B et C.

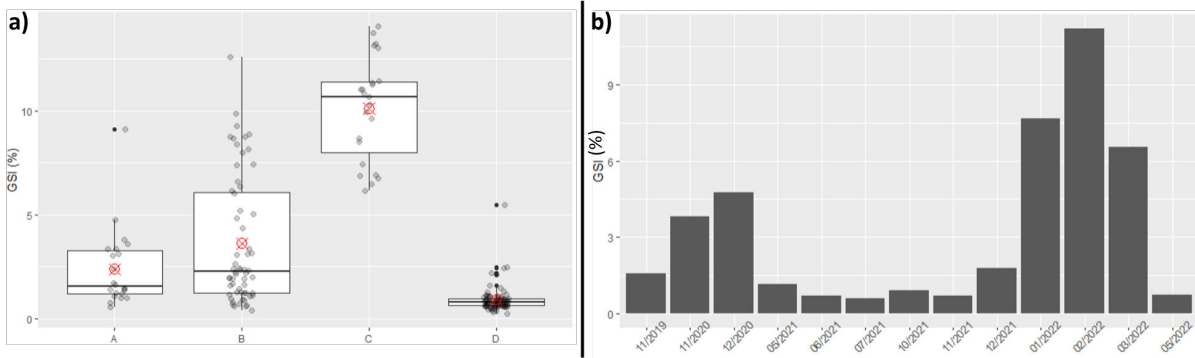


FIGURE 2.18 – a) Boxplot des indices gonado-somatiques (IGS %) des cardines franches (*L. whiffiagonis*) classées en fonction de leur phase de maturité définie par critères macroscopiques et b) histogrammes des indices gonado-somatiques moyens (IGS %) pour chaque date de prélèvement pour 187 femelles (*L. whiffiagonis*). Avec : Immature (A), Développement (B), En ponte (C) et Régression / Régénération (D)

3.3.3 L_{50} et A_{50}

Les L_{50} et A_{50} calculés sont illustrés dans la Figure 2.19, avec une première longueur à maturité estimée à 24.1 cm pour un A_{50} à 3 ans .

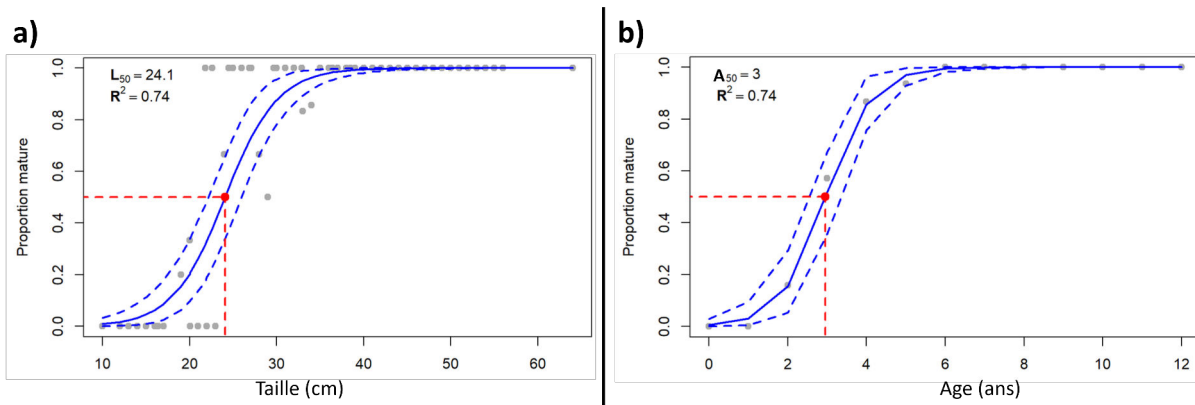


FIGURE 2.19 – Courbes pour a) la longueur (L_{50}) et b) l'âge (A_{50}) auxquels 50% de la population est sexuellement mature pour les femelles cardine franche (*L. whiffiagonis*), issues des données de maturité obtenues par identification de critères macroscopiques

3.4 La cardine à quatre taches (*Lepidorhombus boscii*)

3.4.1 Échantillonnage

Obtenir des individus frais de cardine à quatre taches (*L. boscii*) tous les mois s'est avéré difficile, avec comme seule option d'évènement d'échantillonnage les campagnes en mer *EValuation Halieutique Ouest de l'Europe* (EVHOE) (Tableau 2.5). L'échantillonnage n'a donc eu lieu qu'en octobre et novembre pour cette espèce, ce qui n'a pas permis le

suivi du cycle de reproduction ni l'observation de la période du frai. Seuls 67 individus sexuellement immatures (A) ou en développement (B) ont été obtenus, avec des longueurs allant de 6 à 35 cm.

TABLEAU 2.5 – Nombre total d'individus *L. boscii* échantillonnés lors de la campagne en mer EVHOE

Mois	Nombre d'individus	Division CIEM	Source
Nov. 2019	25	7j	EVHOE 2019
Nov. 2020	16	7j	EVHOE 2020
Oct. 2021	11	8a; 8b; 8c	EVHOE 2021
Nov. 2021	15	7j	EVHOE 2021

3.4.2 Pourcentage d'accord entre agents

Les phases de maturité déterminées par les 3 lecteurs pour 25 individus *L. boscii* sont indiquées dans le [Tableau 2.6](#). Le pourcentage d'accord entre ces 3 lecteurs est de 20%.

TABLEAU 2.6 – Résultats d’estimation de la phase de maturité sexuelle par observation de critères macroscopiques chez 25 femelles cardines à quatre taches (*L. boscii*) par 3 agents différents lors de la campagne en mer EVHOE 2019. Avec : Immature (A), Développement (B), Développement mais fonctionnellement immature (Ba) et Développement mais fonctionnellement mature (Bb)

Poisson n°	Lecteur 1	Lecteur 2	Lecteur 3
1	Ba	Bb	Bb
2	Bb	Bb	Ba
3	Ba	Bb	Ba
4	Bb	Bb	Ba
5	Bb	Bb	Ba
6	Bb	Ca	Ca
7	Bb	Bb	Ba
8	Bb	Bb	Ba
9	Bb	Bb	Bb
10	Bb	Bb	Ba
11	Bb	Bb	Ba
12	Bb	Bb	Bb
13	Bb	Bb	Ba
14	Bb	Bb	Ba
15	Bb	Bb	Ba
16	Bb	Bb	Bb
17	Ba	A	A
18	Ba	A	A
19	A	A	A
20	Ba	A	Ba
21	Ba	A	Ba
22	Ba	A	Ba
23	Ba	Ba	Bb
24	Bb	Bb	Bb
25	Bb	Ca	Bb

3.4.3 Indice gonado-somatique

L’Indice Gonado-Somatique a été estimé pour 60 cardines à quatre taches [Figure 2.20](#). Une tendance décroissante est observée entre les individus classés en immature (A) et ceux en développement (B), avec des moyennes semblables de 2-3% pour les individus classés

en B, Ba et Bb.

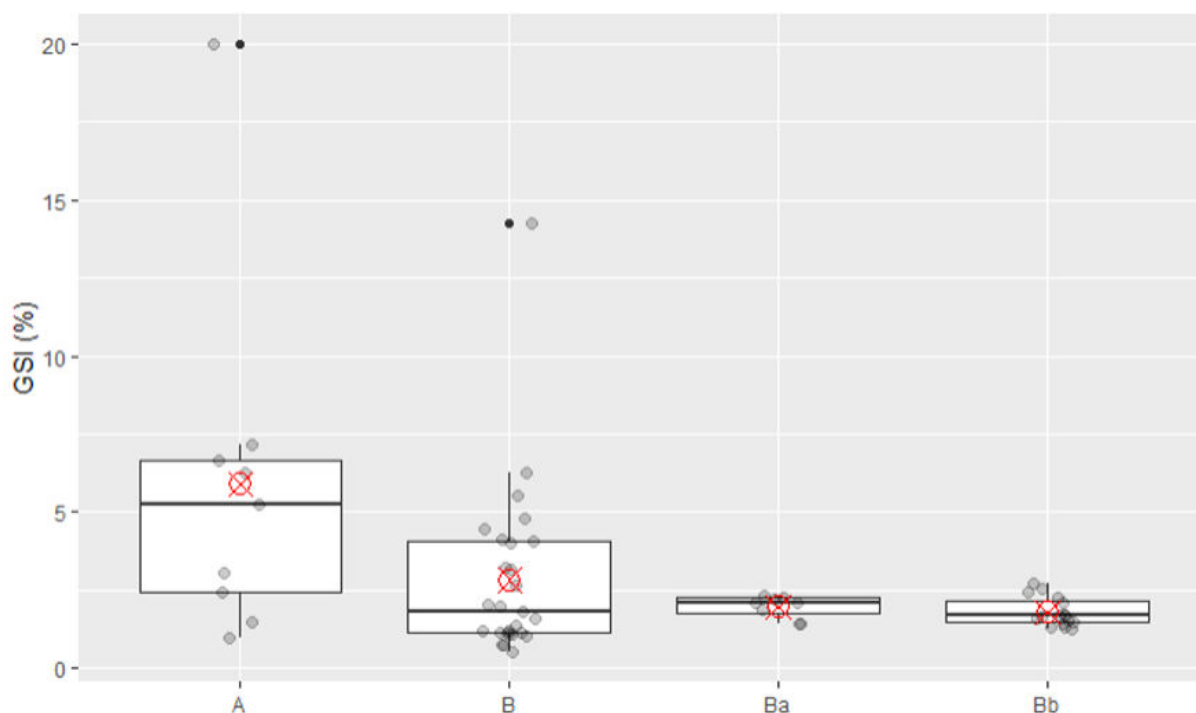


FIGURE 2.20 – Boxplot des indices gonado-somatiques (IGS %) chez des femelles cardine à quatre taches (*L. boscii*) ($n = 60$) classées en fonction de leur phase de maturité définie par critères macroscopiques. Avec : Immature (A), Développement (B), Développement mais fonctionnellement immature (Ba) et Développement mais fonctionnellement mature (Bb)

3.4.4 L_{50} et A_{50}

Pour *L. boscii*, une L_{50} a été estimée à 19.7 cm pour un A_{50} à 3 ans Figure 2.21.

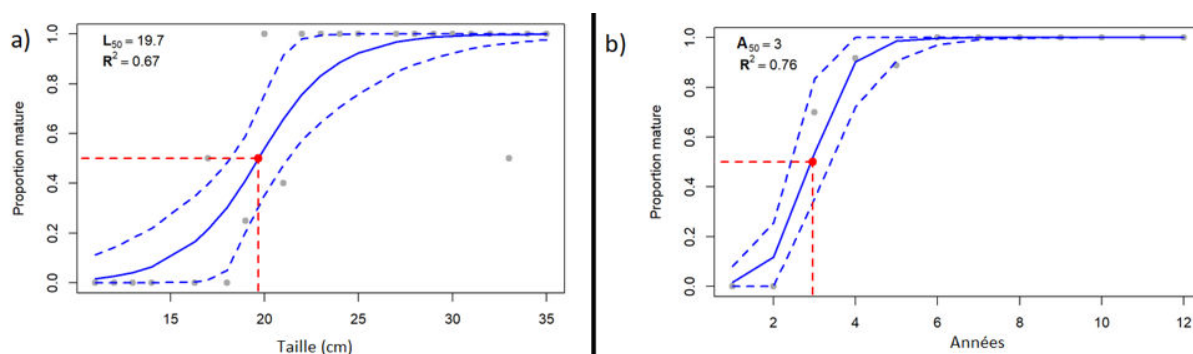


FIGURE 2.21 – Courbes pour a) la longueur (L_{50}) et b) l'âge (A_{50}) auxquels 50% de la population est sexuellement mature pour les femelles cardine à quatre taches (*L. boscii*), issues des données de maturité obtenues par identification de critères macroscopiques

Publication 1 Volume II

Titre : Protocole de photographie des gonades de poisson

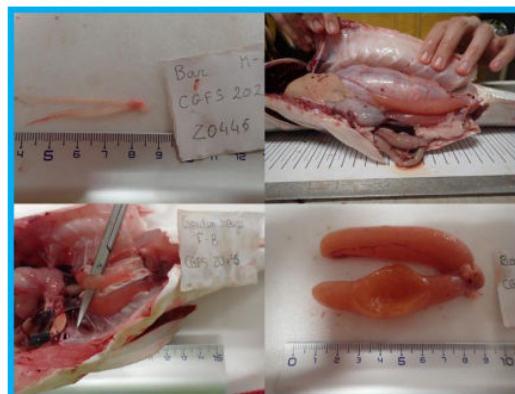
Citation : Le Meleder, A., Sauger, C., Dubroca, L. (2022) «Fish gonads' photography protocol ». 11 pp. DOI : <https://doi.org/10.13155/89703>

Résumé : Protocole pour la prise de photos standardisées utilisées pour l'illustration des fiches d'aide à l'identification des phases de maturité des espèces récoltées lors des campagnes halieutiques EVHOE, CGFS et IBTS. Les versions en anglais et en français sont disponibles dans Archimer (<https://archimer.ifremer.fr/doc/00785/89703/>). Les fiches d'identification sont disponibles ici : <https://lm-anna.github.io/MaturityScaleTools/> (LE MELEDER, 2022).

Contribution : Encadrement pour la création, conception et rédaction du document en français et en anglais. Mise en place de la méthodologie avec Anna Le Meleder et prise des photos.



Fish gonads' photography protocol



LE MELEDER Anna¹
SAUGER Carine¹
DUBROCA Laurent¹

4 Discussion

4.1 États des stocks

Les captures totales de *P. platessa* du stock de Manche Est (7d) sont en diminution depuis 2017, n'atteignant pas les **Totaux Admissibles de Captures (TAC)** (moyenne de 10 000 tonnes ces dernières années). De plus, ces captures présentent de forts taux de rejets pour 2 raisons : cette espèce est souvent une prise accessoire des pêcheries mixtes visant la sole (*Solea solea*) et la longueur minimale de capture de 27 cm n'est pas toujours atteinte (ICES, 2023c; MILLNER et al., 2018). Cette diminution des captures est aussi observée pour le stock de *L. whiffiagonis* (meg.27.7bk8abd) ainsi que celui de *M. surmuletus* (mur.27.43a7). Pour le stock mur.27.43a7, les données montrent des signes de sur-exploitation, notamment d'individus capturés avant d'avoir atteint une longueur suffisante pour se reproduire (ICES, 2022b). Une étude de MAHÉ et al. (2014) avait déjà été réalisée pour estimer une longueur à première maturité (L_{50}) via les critères macroscopiques. Elle avait comme objectif l'implantation d'une longueur minimale de capture en Europe pour ce stock.

Deux des quatre espèces à l'étude (*M. surmuletus* et *L. boscii*) font l'objet d'un échantillonnage insuffisant pour obtenir les informations nécessaires à l'évaluation de leur stock. En effet, les données pour ces stocks proviennent en majorité des relevés de débarques (en poids), les données provenant de campagnes halieutiques n'étant pas suffisantes. Cela mène à un manque de données sur les paramètres biologiques nécessaire à une évaluation adéquate de ces stocks, pourtant, il s'agit de deux espèces faisant l'objet d'une pêche importante en France, soit en tant que prise accessoire (cardines) soit du fait de sa forte valeur commerciale (rouget barbet de roche) (CASTILHO et al., 1993; ICES, 2022b,c).

Les deux espèces de cardines *Lepidorhombus* spp. sont gérées sous un même **TAC**, ce qui rend difficile le contrôle des taux d'exploitation de chacune de ces espèces individuellement. Cette situation pourrait aussi facilement mener à une sur-exploitation d'une espèce par rapport à l'autre. Afin d'affiner la gestion de ces stocks, il est nécessaire en premier lieu d'acquérir des informations concernant le mode de vie et la biologie de chacune de ces deux espèces : en particulier, des informations sur leurs sites de ponte, les zones de nurseries et leur cycle de reproduction sont nécessaires pour orienter les mesures de gestion (ICES, 2023a).

La problématique de la définition des stocks est particulièrement intéressante pour ces deux espèces de cardines. DANANCHER et al. (2009) ont utilisé des marquages génétiques et mis en évidence deux populations distinctes en Atlantique et une troisième en Méditerranée. Ce schéma de répartition des populations ne correspond pas au découpage actuel des stocks, divisés en quatre le long des côtes Atlantiques Est. En effet, même si

des informations complémentaires devront être fournies sur les capacités de dispersion des larves de cardines franches, les auteurs ont démontré qu'il y avait peu d'échanges de matériel génétique entre ces populations. Redéfinir les limites de ces stocks en fonction des populations génétiquement proches les unes des autres permettra de mieux calculer leurs biomasses, et donc d'assurer une meilleure gestion sans prendre le risque de sur-exploiter une population dans un stock qui en comprend deux. Ce même problème de classement de stocks non adapté est aussi retrouvé pour le stock de *Mulus surmuletus* mur.27.43a7d qui est composé à minima trois sous-populations distinctes pour la zone allant du Golfe de Gascogne à la Mer du Nord (BENZINOU et al., 2013). Enfin, pour la plie, HOARAU et al. (2004, 2002) ont mis en évidence des migrations entre populations en fonction de saisons de reproduction.

Bien identifier une population permet de limiter les zones d'échantillonnages pour obtenir des données fiables sur la dynamique de cette population et garantit la précision des évaluations qui y seront appliquées. En ignorant les incohérences entre le stock en tant qu'unité de gestion et la structure de la population de l'espèce, cela peut mener à une réduction de la productivité et à la diminution des populations locales qui ne seront pas remplacées par des migrations ou apports de juvéniles venant d'autres populations (WORM et al., 2006).

4.2 Échantillonnage

La qualité de la donnée récoltée repose avant tout sur le plan d'échantillonnage. L'étude sur la plie (*P. platessa*) du stock de Manche Est (7d) a permis de statuer qu'un échantillonnage mensuel de 15 individus conduit à une représentativité correcte des phases de maturité, permet le prélèvement d'individus dans plusieurs classes de maturité et de longueurs, y compris en dessous des [Longueurs Minimales de Captures](#), et représente un compromis entre effort d'échantillonnage et traitement futur des ovaires par l'histologie. En effet, cet effectif peut être considéré comme faible pour la détermination macroscopique des phases qui ne requiert pas un temps ni un coût important. Mais, compte tenu de l'objectif final de cette thèse qui est de développer une méthode plus précise et fiable basée sur l'utilisation de coupes histologiques (beaucoup plus lourde à mettre en oeuvre) et de la comparer à la méthode macroscopique appliquée aux mêmes échantillons, nous sommes limités à cet effectif de 15 individus par prélèvement.

Par ailleurs, cette étude a aussi souligné l'importance de commencer l'échantillonnage en amont de la période du frai pour encadrer au mieux cet événement. Cela est d'autant plus vrai pour les espèces présentant un seul événement de ponte massive ou plusieurs événements regroupés sur une courte période temporelle. Cette étude a également mis en évidence l'importance d'échantillonner des individus à travers une large gamme de

longueurs pour assurer le prélèvement d'individus de toutes les phases de maturité. C'est particulièrement vrai pour les espèces peu étudiées et dont les longueurs à maturité sont peu décrites.

Toutefois, il est important de noter que la réalisation d'un plan d'échantillonnage, notamment lors des campagnes halieutiques, conserve une part de hasard. Ainsi, le nombre d'individus femelles et la longueur de ces individus sont le plus souvent contraints par les captures ou les débarquements. Les campagnes scientifiques permettent d'obtenir des individus frais et surtout de longueur inférieure aux [Longueurs Minimales de Captures](#), assurant l'échantillonnage d'individus immatures. En contre partie, la pesée d'organes de faibles masses n'est pas toujours précise malgré l'utilisation de balances amariniées. Ces campagnes se déroulent chaque année, mais restent ponctuelles et ne suffisent pas pour couvrir le cycle de reproduction. Malgré le recours à l'achat d'individus commerciaux auprès de mareyeurs, l'échantillonnage mensuel peut rester incomplet : ainsi par exemple, pour le rouget barbet de roche en zone Manche Est, les débarques ne sont pas assurées tout au long de l'année : elles ont été interrompues pendant les mois de juin et juillet (vacances du pêcheur), au moment de la période du frai, ce qui a mené à un manque de données pour la caractérisation de cette phase pour ce stock. De plus, pour la cardine à quatre taches, il n'a pas été possible de trouver un mareyeur garantissant une débarque d'individus frais (non congelés) et non-vidés et le suivi a montré que les prélèvements réalisés au cours de la campagne [EValuation Halieutique Ouest de l'Europe \(EVHOE\)](#) n'avaient pas suffi à caractériser les différentes phases de maturité.

4.3 Détermination de la phase de maturité

Le pourcentage d'accord entre les trois agents ayant participé à la détermination des phases de maturité des 25 individus *L. bosci* n'était que de 20% pour des individus immatures (A) ou en développement (B). Cet exercice de calibration a permis de mettre en évidence une réelle difficulté d'utilisation de l'échelle [CIEM](#). En effet, les sous-phases Ba et Bb sont utilisées pour les espèces ayant un cycle de développement de plus d'un an (ICES, 2014). La phase Ba qualifie un individu qui a commencé un développement gonadique mais ne participera pas à l'effort de reproduction pour la saison de reproduction en cours, alors que Bb qualifie un individu en développement qui participera à l'effort de reproduction pour la saison en cours. La cardine à quatre-tâche ne fait pas partie des espèces ayant un cycle de reproduction de plus d'un an, or les lecteurs ont tous identifié des stades Ba parmi les 25 individus analysés, ce qui montre la difficulté d'interprétation de l'échelle de maturité.

Ces éléments ont donc souligné l'importance de la mise en place de fiches d'aide à l'identification des phases de maturité, avec des critères d'identification clairs, spécifiques

à chaque espèce, s'appuyant sur des images photographiques de qualité et représentatives de la réalité du terrain. Le protocole de lecture (**Publication 1** du **Volume II**) a permis à de nombreux agents de réaliser des photographies d'ovaires de qualité pour une utilisation dans des fiches d'aide à l'identification. Ces fiches sont maintenant disponibles pour un grand nombre d'espèces récoltées en Atlantique Nord, Manche, Mer du Nord, Méditerranée, Martinique et Guadeloupe (LE MELEDER et al., 2022), et sont utilisées sur les campagnes [EVHOE](#), [CGFS](#) et [IBTS](#) depuis 2022.

Une autre difficulté rencontrée lors de la détermination de la phase de maturité sexuelle a été l'impossibilité d'identifier de façon fiable certaines phases (comme les phases E ou F) qui par définition ne peuvent être caractérisées qu'avec l'appui d'observations microscopiques. En effet, certaines structures caractéristiques de ces phases ne sont identifiables qu'à l'échelle cellulaire, et donc seulement observables sur des coupes histologiques (présence de cellules en atresie ou [follicules post-ovulatoires \(POF\)](#) ou cellules anormales). C'est pour cette raison que le stade E n'a jamais été identifié et il est possible que cela ait conduit à des erreurs de classification. Ainsi par exemple, des individus ayant pondu pourraient être classés dans la phase immature (A) en absence d'observation de [POF](#). De la même façon, des individus en omission de ponte (E), qui se caractérisent par la présence d'ovocytes en atresie, peuvent être classés de façon erronée en ponte (C). Ceci montre les limites de cette approche visuelle (TOMKIEWICZ et al., 2003; VITALE et al., 2006; WEST, 1990).

4.4 Indices de maturité

4.4.1 Longueur et âge auxquels 50% de la population est sexuellement mature

Les longueurs (L_{50}) et âges (A_{50}), calculés sur la base des stades identifiés macroscopiquement, sont en accord avec les valeurs retrouvées dans la littérature pour les espèces à l'étude. En effet, pour le rouget barbet de roche (*M. surmuletus*), une L_{50} de 18 cm a été calculée, en accord avec des travaux anciens sur cette espèce DESBROSSES (1933). Plus récemment, MAHÉ et al. (2013) ont estimé la L_{50} à 16.9 cm en Manche, avec comme objectif la mise en place d'une longueur minimale de capture pour le stock de *M. surmuletus*. Pour l' A_{50} , nous avons estimé que la moitié de la population se reproduit dans sa première année, et là encore, ces résultats corroborent ceux de MAHÉ et al. (2005), alors que DESBROSSES (1933) avait calculé une première participation à la ponte vers 2 ans en Atlantique Nord.

Pour *P. platessa*, nous avons estimé que les femelles se reproduisent dans leur quatrième année en Manche Est, estimation retrouvée par ICES (2019) et IFREMER (2011). Dans la littérature plus ancienne pour la plie de la Mer du Nord, RIJNSDORP (1993) avait

décrit une première reproduction vers 2-3 ans et BROMLEY (2000) entre 6 ans et 8 ans. La seule donnée d'ogive de maturité disponible pour la plie du stock 7d, estimant un A_{50} à 3 ans, est une ogive fixe donnée par l'ICES (2019) et estimée d'après les paramètres biologiques récoltés (ICES, 2023c). Cela souligne l'importance des travaux sur la plie, pour apporter des informations complémentaires sur ce stock.

Pour ce qui est de la longueur à maturité, les données indiquent une L_{50} de 28.6 cm pour des femelles du stock de Manche Est, ce qui ne semble pas compatible avec la longueur minimale de capture qui est à 27 cm. Il n'y a pas eu d'étude pour le stock de Manche Est, toutefois, on peut noter qu'une étude de WALRAVEN et al. (2010) sur le stock de Mer du Nord a montré que la L_{50} des femelles de 4 ans est en diminution depuis les années 2000, avec une valeur de 41.6 cm dans les années 1900, 33.3 cm dans les années 1980 et de 22.9 cm pour les années 2000. Ces diminutions indiqueraient un changement induit par la pêche, et l'accélération de ce changement sur les 20 dernières années de l'étude pourrait être reliée à l'augmentation des températures environnementales.

Les données de L_{50} et A_{50} sur critères macroscopiques pour les deux espèces de cardines sont rares dans la littérature. Pour la cardine franche (*L. whiffiagonis*), nous avons estimé une L_{50} de 24.1 cm et un A_{50} à 3 ans, valeurs compatibles avec les données de PEREDA et al. (1998) (entre 19 et 25 cm et un A_{50} à 3-4 ans), mais supérieure à la L_{50} de 20.9 cm calculée par l'ICES (2012a).

Pour *L. boscii* d'Atlantique Nord-Est, des études sur les relations longueur/âge ont été réalisées (CASTILHO et al., 1993 ; CENGIZ et al., 2013 ; LANDA et al., 2016, 2002 ; SANTOS, 1994), mais ni L_{50} ni A_{50} n'ont été déterminés auparavant chez les femelles sur critères macroscopiques. En revanche, UGRIN et al. (2023) ont calculé une longueur à première maturité de 19.2 cm pour les femelles du stock de la Mer Adriatique et DOMINGUEZ-PETIT et al. (2022) une L_{50} de 16.7 cm et un A_{50} de 2.3 ans, par méthode histologique, pour les individus du stock 27.7b-k d'atlantique Nord-Est. De plus, comme l'échantillonnage est resté incomplet pour la cardine à quatre taches, les résultats ($L_{50} = 19.7$ cm et $A_{50} = 3$ ans) devront être réévalués sur un prélèvement d'individus plus complet.

Au vu de ces résultats pour ces deux espèces de cardines, même si leur première participation à la ponte a lieu vers 3 ans, les L_{50} estimées montrent une différence de 4.4 cm entre les espèces (sous réserve de vérification sur un échantillonnage complet). Si une L_{50} plus petite est bien confirmée pour *L. boscii*, alors cela montre la nécessité de séparer les deux espèces lors de la mise en place de règles de gestions qui imposent actuellement une même longueur minimale de capture de 20 cm.

4.4.2 Indice gonado-somatique

Les estimations de l'**Indice Gonado-Somatique (IGS)** des femelles échantillonnées montrent que cet indice n'est pas discriminant pour déterminer la phase de maturité, en dehors de la ponte (C). En effet, un **IGS** plus élevé n'a été observé qu'en phase C pour *P. platessa*, *M. surmuletus* et *L. whiffiagonis*. Des résultats similaires sont aussi retrouvés dans la littérature pour la plie (WINGFIELD et al., 1977), le rouget (MAHÉ et al., 2013) et la cardine franche (GERRITSEN et al., 2010). Cet indice permet donc de repérer les périodes du frai, mais les faibles différences et les fortes variations des **IGS** pour les phases autres que C ne permettent pas d'utiliser cet indice comme critère discriminant des phases de maturité. La forte variabilité de l'**Indice Gonado-Somatique** des individus classés en phase B (individus en développement) suggère de probables erreurs de classification, comme il a été décrit dans dans l'[Article 1](#) (*cf.* page 132).

L'**IGS** exprime le changement mensuel du poids moyen des ovaires et a déjà été utilisé comme outil pour une meilleure détermination de la phase de maturité chez les téléostéens (FLORES et al., 2015; VITALE et al., 2006). Malgré son utilisation dans de nombreuses études, sa validité a été remise en question par plusieurs auteurs (DE VLAMING et al., 1982; WEST, 1990), soulignant que cet indice devrait être utilisé après une validation préalable pour l'espèce. L'**IGS** est corrélé à la longueur chez plusieurs espèces, ce qui pourrait entraîner un biais si les individus échantillonnés sont de longueurs différentes (WEST, 1990). Les éléments susceptibles d'influer sur l'**IGS** sont la taille moyennes des ovocytes et la fécondité de l'individu (DE VLAMING et al., 1982), le type de stockage des réserves allouées à la reproduction, dans le foie ou les gonades ou le schéma de croissance de l'ovaire (isométrique ou non au poids de l'individu) (SOMARAKIS et al., 2004).

Tous les éléments présentés au travers de ce [Chapitre 2](#) soulignent l'importance d'une estimation fiable des phases de maturité, et la nécessité d'apporter des données jusqu'ici manquantes sur la maturité de ces espèces afin d'assurer une meilleure estimation des indices (tels que la L_{50} et A_{50}) pour la gestion des stocks. Comme nous l'avons démontré, la détermination macroscopique n'est pas optimale pour certaines espèces et l'amélioration de cette méthodologie de détermination des phases apparaît cruciale. Ainsi, nous avons souhaité mettre en oeuvre une méthodologie plus discriminante et plus objective de détermination de la maturité sexuelle, et nous avons opté pour l'histologie quantitative.

5 Bilan

Le *Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM)* a proposé une méthodologie pour l'obtention des données de paramètres biologiques qui servent à l'évaluation des stocks exploités, sur laquelle nous nous sommes appuyés.

En ce qui concerne la prise de données pour la maturité sexuelle, la méthode d'identification repose sur l'appréciation de critères macroscopiques des gonades. Afin de faciliter et d'harmoniser cette identification, le *CIEM* a mis en place une échelle standardisée. Néanmoins, cette échelle doit être adaptée pour chaque espèce à l'étude et malgré cela, elle ne permet pas d'identifier de façon fiable certaines phases (omission de ponte par exemple).

Un exercice de détermination de la phase de maturité par critères macroscopiques chez *L. boscii* impliquant 3 agents a montré que le pourcentage d'accord est seulement de 20% pour cette espèce. Cette première observation a souligné la nécessité de développer des approches complémentaires pour faciliter la détermination des phases de maturité des espèces récoltées lors des campagnes halieutiques.

L'*Indice Gonado-Somatique (IGS)* n'est pas un paramètre efficace pour améliorer l'identification des phases de maturité : cet indice n'a pas pu être relié avec certitude aux phases de maturité, mis à part une tendance d'un *IGS* plus élevé en phase C pour certaines espèces (plie, cardines).

Les longueurs (L_{50}) et âges (A_{50}) pour lesquelles 50% de la population a atteint la maturité sexuelle, ont été calculées après une estimation des phases de maturité par critères macroscopique et ont montré que la longueur minimale de capture semblait adaptée pour la plie et la cardine franche, mais pas pour la cardine à quatre taches (L_{50} à 19.7 cm pour une longueur minimale de capture à 20 cm) ni pour le rouget barbet de roche (L_{50} de 18 cm pour une longueur minimale de capture 15 cm uniquement en France).

La production d'un protocole de standardisation de prises photographiques d'ovaires a permis de recueillir dans une base de données des images de gonades de poissons de qualité homogène. Cette base est utilisée pour la mise en place de fiches d'aide à l'identification des phases de maturité par espèce, actuellement utilisées lors des campagnes halieutiques.

15 femelles / mois sur 1 an pour chaque espèce

Échantillonnage : Campagne en mer ou criée

Paramètres biologiques :

- Masse totale
- Longueur totale
- Otolithe (âge)
- Maturité macroscopique



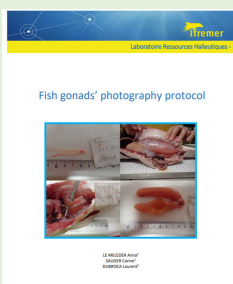
En complément :

- Masse des gonades
- 3 images standardisées des ovaires



Protocole de photographies :

- Règle graduée
- Fond couleur uniforme
- Étiquette ID (sexe, esp., maturité)
- Cavité ouverte + ovaire dedans
- Cavité ouverte + ovaire dehors
- Gros plan sur ovaire



Protocole
(Publication 1, Volume II)

+

Fiches d'identification

(<https://lm-anna.github.io/MaturityScaleTools/>)

Résultats :

- GSI %
- A₅₀ et L₅₀

FIGURE 2.22 – Schéma de synthèse des méthodologies utilisées pour l'échantillonnage des paramètres biologiques et l'estimation de la phase de maturité par critères macroscopiques chez les téléostéens

Chapitre 3

Détermination objective de la maturité : l'histologie quantitative

Publications avec comité de lecture associées au Chapitre :

- ✧ **Article 1** : A Quantitative Histologic Analysis of Oogenesis in the Flatfish Species *Pleuronectes platessa* as a Tool for Fisheries Management. Publié dans la revue *Animals* (DOI : [10.3390/ani13152506](https://doi.org/10.3390/ani13152506))
- ✧ **Article 2** : Sexual maturity determination for the female European plaice, *Pleuronectes platessa* Linnaeus, 1758, through quantitative histology. *En préparation*, sera soumis dans *Animals*
- ✧ **Article 3** : Stereology as a method for maturity phase determination in fisheries stock assessments : An example with a batch spawner species the Striped red mullet (*Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758). *En préparation*, sera soumis dans *ICES Journal of Marine Science*

Publications sans comité de lecture et présentées dans le Volume II :

- ✧ Recueil des protocoles pour le traitement histologique des sections ovariennes. Disponible sous [Archimer](#)
- ✧ Article sur les méthodes utilisées dans un cadre halieutique pour le traitement histologique des sections ovariennes *En préparation*, sera soumis dans *Nature Protocols*
- ✧ Protocole de lecture stéréologique. Disponible sous [Archimer](#)
- ✧ Quatre lexiques décrivant les structures cellulaires retrouvées dans les ovaires de *Mullus surmuletus*, *Lepidorhombus whiffiagonis*, *Lepidorhombus boscii* et *Pleuronectes platessa*. Disponibles sous [Archimer](#)

«[...] le passage de toute science naturelle doit accomplir un jour ou l'autre et qui indique la transformation d'une science dans l'enfance en une science adulte, à savoir le passage du qualitatif au quantitatif.»

LISON (1960)

1 Introduction

Le travail présenté dans ce chapitre a pour but la mise en place d'outils permettant de relier le morphologique au fonctionnel. Dans le contexte de l'ovogenèse de poissons, il s'agit d'associer le schéma organisationnel de la gonade de chaque individu à sa phase de maturité sexuelle. Il importe donc de décrire précisément l'organisation cellulaire de l'ovaire des espèces suivies afin de pouvoir attribuer une phase de maturité à la présence ou absence de certains types cellulaires. Pour prévenir des biais humains et statistiques impactant les résultats lors des estimations macroscopiques des phases de maturité, il est apparu qu'une quantification précise des structures s'appuyant sur une approche **stéréologique** était nécessaire pour déterminer objectivement la maturité tout au long du cycle d'ovogenèse, et ce pour chaque espèce suivie. En vue de classer les individus dans leur phase de maturité respective, il convient d'établir des **règles de classement** pour chaque phase, en s'appuyant sur les données quantitatives. La validation de cette approche stéréologique passe par une étape de comparaison des profils de **maturité visuelle et histologique**. Cette analyse quantitative doit permettre de lever les difficultés rencontrées lors de l'analyse macroscopique, et améliore donc la description du cycle biologique de chaque espèce.

1.1 Échelle de maturité WKASMSFM

Comme vu dans le [Chapitre 2](#), afin de standardiser les échelles de maturité le *Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM)* a défini les phases de maturité en associant des critères microscopiques (stades cellulaires) aux critères macroscopiques. Ces critères cellulaires associés aux différentes phases de maturité sexuelle chez les téléostéens ont été plus spécifiquement détaillés dans [BROWN-PETERSON et al. \(2011\)](#). Le [Tableau 3.1](#) reprend ces descriptions macroscopiques et les associe aux critères histologiques, en s'appuyant toujours sur un découpage en 6 phases de maturités : Immature (A), Développement (B), Ponte/Frai (C), Régression / Régénération (D), Omission de ponte (E) et Anormal (F). comme indiqué dans les chapitres précédents, des sous-phases peuvent être présentes en fonction de l'espèce à l'étude.

TABLEAU 3.1 – Tableau récapitulatif décrivant les aspects macroscopiques et histologiques des ovaires aux différentes phases de maturité sexuelle chez les téléostéens. Tableau traduit de SAUGER et al. (2023d) et adapté de BROWN-PETERSON et al. (2011) et ICES (2014, 2018). Avec : ovocytes à alvéoles corticales (**cao**), ovocytes en vitellogenèse (**vtg**), ovocytes en cours d’hydratation (**oih**), ovocytes hydratés (**ho**), follicules post-ovulatoires (**POF**), migration de la vésicule germinale (GVM), rupture de la vésicule germinale (GVBD)

Etat de maturité	Phases		Terminologies (CIEM 2018)		Critères macroscopiques		Caractéristiques histologiques		
		Sous-phases possibles		Sous-phases possibles		Sous-phases possibles		Sous-phases possibles	
SI : Sexuellement immature (sans développement gonadique)	Immature		A		Ovaires petits rosâtres et translucides (souvent clairs), ovaires ne dépassant pas 1/3 de la cavité abdominale. Vaisseaux sanguins indistincts et absence d’ovocytes matures			Seules les ovogonies et ovocytes primaires présents, sans gouttelettes lipidiques, atrésie rare, pas de masses musculaires. Paroi ovarienne fine, tissu conjonctif en faible quantité autour des follicules et peu d’espace entre les ovocytes	
SM : Sexuellement mature (avec développement gonadique)		En développement	En développement mais fonctionnellement immature (développement pour la première fois)	Ba	Croissance des ovaires, vaisseaux sanguins plus distincts	Petit rosâtre/rouge, ovaires ne dépassant pas 1/2 de la cavité abdominale. Ovocytes non visibles à l’œil nu		Augmentation marquée de la taille des ovocytes, vaisseaux sanguins plus distincts, ovocytes primaires et cao présents. Ovocytes vtg peuvent être présents. Pas de oih , oh ou POF . Un peu d’atrésie peut être présent	
		En développement mais fonctionnellement mature	Bb	Rosâtre-rougeâtre/rougeâtre-orange et translucide, ovaires d’une longueur d’environ 1/2 de la cavité abdominale. Vaisseaux sanguins visibles, pas d’ovocytes matures visibles					
	Ponte/Frai	En ponte/frai	Ca	Ovaires larges, vaisseaux sanguins importants, ovocytes individuels visibles à l’œil nu	Rosâtre-jaune, ovaires avec un aspect granuleux et une longueur d’environ 2/3 de la cavité abdominale. Ovocytes matures visibles à l’œil nu à travers la paroi gonadique qui n’est pas encore translucide. Pas d’émission des ovocytes en appliquant une légère pression			Ovocytes à la fin du GVM, GVBD. Stades en hydratation ou ovulation présents. POF récemment affaiblis peuvent être présents	
		En capacité de ponte	Cb		Orange-rose, ovaires avec des vaisseaux sanguins visibles et une longueur dépassant 2/3 de la cavité abdominale. Ovocytes matures larges, transparents, et parfaitement visibles. Ils sont émis sous une légère pression de l’ovaire, ou spontanément			Ovocytes oih présents, oh peut être présent. Pas de POF . Atrésie d’ovocytes en vitellogenèse ou hydratés possibles	

SM : Sexuellement mature (avec développement gonadique)		Régression	Da		Ovaires rougeâtres d'une longueur environ la moitié de la cavité abdominale. Paroi ovarienne flasque, vaisseaux sanguins abondants et possibilité d'observer des reliquats d'ovocytes matures translucides/opaque en dégénération		Atrésie (tous les stades) et POF présents. Quelques cao et/ou vtg présents et sains
	Régression / Régénération		D				Seuls des ovogonies et ovocytes primaires présents. Goutelettes lipidiques dans les ovocytes primaires (dépend de l'espèce). Masses muculaires, vaisseaux sanguins élargis, paroi ovarienne épaisse et/ou atrésie ou vieux POF en dégénérescence peuvent être présents. Espace et tissus interstitiels plus importants autour des ovocytes primaires
		Régénération	Db			Ovaires petits et rosâtres, translucides d'une longueur d'environ 1/3 de la cavité abdominale, avec vaisseaux sanguins présents mais réduits. Aucun ovocyte mature n'est observé dans la gonade	
	Omission de pont		E		Indiscernable à l'œil nu		Pas de POF et au moins 50% des ovocytes vitéllogéniques en atrésie
Anormal			F		Problèmes dans le développement de la gonade (nécrose, sclérose, intersexe chez espèces gonochoriques, majorité de la gonade montrant des signes de pathologies)		

1.2 L'histologie

Au début du XVIII^{ème} siècle, Xavier Bichat définit l'histologie comme la science de l'étude morphologique des tissus et de leurs éléments constitutifs (BICHAT, 1801). Ce n'est qu'en couplant cette nouvelle science à la microscopie que l'histologie a pris de l'ampleur avec l'observation de tissus de plus en plus petits.

En histologie, la plupart des pièces n'étant pas assez petites pour les observer dans leur ensemble entre lame et lamelle, il est nécessaire de les débiter en tranches très fines. Pour faciliter la découpe à l'aide d'un microtome, le tissu frais doit être durci par congélation ou par inclusion de la pièce dans un milieu présentant des caractéristiques de dureté satisfaisante tel que la gélatine, la gélose, la nitrocellulose ou la paraffine. Une fois les pièces incluses dans ces milieux, elles présentent aussi l'avantage de pouvoir être conservées sur un temps long (GABE, 1968).

L'observation des tissus ovariens n'est possible qu'après plusieurs étapes de traitements des ovaires disséqués. La première étape est la fixation, qui permet l'immobilisation des structures « dans un état aussi proche que possible de l'état vivant » (MARTOJA et al.,

1967), en conservant la morphologie et les propriétés chimiques des échantillons (GABE, 1968).

La deuxième étape est la déshydratation par des bains d'alcools de concentrations croissantes permettant l'élimination de l'eau contenue dans les échantillons. S'ensuit l'inclusion des pièces, par une succession de bains favorisant la pénétration d'une substance le plus souvent hydrophobe dans les tissus hydratés, tout en assurant la tenue des éléments de la pièce lors de la découpe. Le principe de la manipulation est que chaque milieu d'imprégnation doit remplacer le précédent de manière totale (MARTOJA et al., 1967). La méthode d'inclusion utilisée dans cette thèse est une méthode très répandue : il s'agit de l'inclusion en paraffine, développée par KLEBS en 1869. La paraffine est chimiquement neutre, soluble dans de nombreux solvants, elle se coupe aisément au microtome et possède un point de fusion compris entre 56 et 58°C, facile à atteindre en laboratoire (GABE, 1968).

L'étape suivante est la coloration des sections ovariennes. Cette dernière est généralement réalisée sur les coupes déparaffinées à l'aide d'un solvant puis réhydratées pour permettre aux colorants de pénétrer dans les tissus lors de la coloration (GABE, 1968). Différentes colorations sont utilisées pour identifier les types cellulaires, dont le trichrome de Prenant-Gabe et la coloration au bleu alcian qui permettent la mise en évidence de structures cellulaires clés, ou illustrer avec des contrastes de couleurs l'organisation générale de l'organe (GABE, 1968 ; MARTOJA et al., 1967).

La dernière étape est le montage de la section qui protège physiquement les tissus sous une lamelle de verre et assure la préservation de la coloration de l'objet. Le milieu de montage utilisé doit permettre une bonne fixation de la lamelle sur la lame, mais aussi posséder une transparence permettant l'observation au microscope.

«Ce serait une erreur que de s'extasier devant un
bariolage multicolore, si plaisant fût-il, sans en rechercher
la signification.»

GABE (1968)

1.3 La stéréologie

1.3.1 Généralités sur la stéréologie

En 1777, le Comte de Buffon s'interroge sur la probabilité P qu'une aiguille de longueur l , lancée au hasard, intersecte avec une grille de lignes parallèles d'écart d (WEIBEL,

1974). Il définit cette probabilité par la formule :

$$P = 2l/\pi d \tag{3.1}$$

Le terme stéréologie n'est pas encore employé, mais on retrouve dans cette question un objet (l'aiguille), caractérisé par sa dimension (longueur l connue), un référentiel géométrique défini (la grille de lignes parallèles d'écart d), l'interaction aléatoire entre les deux (résultat observable = intersection) et la probabilité d'occurrence P . Cette formule pose ainsi les bases mathématiques de la stéréologie.

Il faudra attendre 1847 pour qu'une première définition de la stéréologie soit proposée dans un écrit du géologue DELESSE (1847) intitulé *Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches*, montrant que la fraction moyenne de la surface (A_A) qu'occupe un élément sur une section plane est égale à la fraction moyenne du volume (V_V) qu'occupe l'élément dans la totalité de l'objet étudié. Ce n'est qu'en 1961 que la stéréologie est reconnue comme une science à part entière (ELIAS et al., 1980), définie comme «un ensemble de méthodes mathématiques reliant les paramètres de structures tridimensionnelles à des mesures faites sur des sections bidimensionnelles» (WEIBEL, 1974).

De multiples relations vont être décrites à l'aide de sondes (Figure 3.1), des formes virtuelles superposées à la surface plane jouant le rôle de système de référence géométrique. Par exemple, il sera démontré que le volume peut être retrouvé en utilisant des transects linéaires recoupant les profils des éléments à estimer (ROSIWAL, 1898), méthode utilisée notamment sur des sections planes contenant de multiples éléments de petites longueurs (ELIAS et al., 1980). Une autre technique consiste à superposer une grille de points pour obtenir la proportion de la présence des éléments recherchés sur cette grille, pour ensuite rapporter cette proportion à leur volume dans l'objet (CHALKLEY, 1943; GLAGOLEV, 1934). Ces différentes méthodologies ont été proposées dans le cadre d'applications variées (métallurgie, biologie, géologie et médecine) avec l'amélioration de certains principes déjà existants (WEIBEL, 1974) ou pour calculer différents paramètres tels que le ratio volume-surface (%) du noyau par rapport au volume de la cellule (CHALKLEY et al., 1949), ou encore l'épaisseur moyenne de parois fines, tels que la membrane alvéolocapillaire pour étudier la diffusion des gaz au niveau du poumon (WEIBEL et al., 1964).

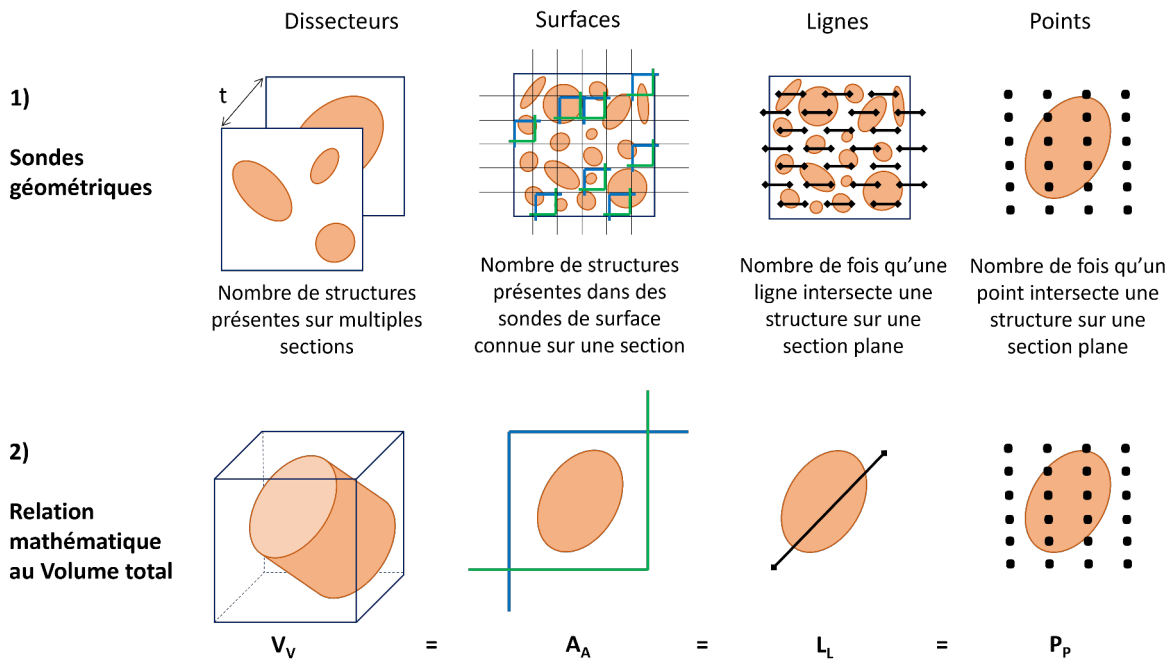


FIGURE 3.1 – 1) Représentation des différentes sondes géométriques utilisées en stéréologie, avec de gauche à droite : deux sections de distance t entre elles qui définissent une sonde de volume, des sondes de surfaces qui peuvent aussi recouvrir la section entière, des transects linéaires sur une section, une grille de points sur une section. 2) Relations d'égalité entre les sondes stéréologiques de dimensions différentes et un profil sur une section plane, pour l'estimation du volume total de l'objet. Figure adaptée de WEST (2001 ; 2012)

Ces méthodes stéréologiques mises en place avant les années 1980 sont basées sur des modèles (HOWARD et al., 2010) et exigent une connaissance préalable de l'organisation structurale du volume à l'étude, telle que la longueur moyenne des éléments mesurés orthogonalement à une section plane. Elles prennent en compte la relation entre le nombre d'éléments dans l'objet et le nombre de fois qu'une sonde intersecte les profils des éléments, éléments dont les longueurs, formes et orientations sont des paramètres connus (WEST, 2001). Or, comme la vérification de ces paramètres est complexe, ces méthodes présupposent donc que la répartition des éléments à quantifier est aléatoire, et que leurs distributions sur la section plane ne changeront pas par rotation ou translation de l'objet (KIDERLEN, 2016).

Par la suite, de nouvelles méthodes stéréologiques reposant sur un plan d'échantillonnage (*designed based sampling* en anglais) ont été développées en prenant en compte une grille d'échantillonnage à point de départ aléatoire et une stratégie de coupe de la section qui assure l'indépendance des variables que sont la longueur, la forme, l'orientation et la distribution des différents éléments (HOWARD et al., 2010 ; WEST, 2012). Ces techniques stéréologiques sont utilisées en routine (BOYCE et al., 2010 ; CRUZ-ORIVE, 2017 ;

HOWARD et al., 2010 ; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003 ; ROYET, 1991 ; WEST, 2012) dans de nombreuses disciplines : anatomie, neurosciences, pathologie, médecine, biologie végétale, géologie, science des matériaux, industrie alimentaire, médecine, *etc.* (BADDELEY et al., 2004).

L'ovaire de poissons représente un volume constitué de multiples éléments de volumes variables. La gonade (dont la longueur est de l'ordre du cm) est sectionnée transversalement sur une épaisseur de 3 μm , si bien que ses structures tridimensionnelles peuvent être considérées comme des profils bidimensionnels sur une section plane. La position et l'orientation de ces sections planes dans le volume à l'étude auront un effet sur la longueur, la forme et la fréquence des structures sur ces profils. En théorie, étudier les volumes des différentes structures en effectuant une reconstruction de l'ensemble de l'ovaire en trois dimensions d'après des coupes de lames histologiques en série est possible mais reste très lourd, compte tenu de l'épaisseur des coupes *versus* la longueur de la gonade (BOYCE et al., 2010) : il faudrait 3333 coupes pour reconstituer une section d'un centimètre par exemple. L'analyse stéréologique permet l'interprétation tridimensionnelle de ces images bidimensionnelles (telles que des sections ou projections) en utilisant des règles de probabilités géométriques (ELIAS et al., 1980). Pour cette étude, la méthode de GLAGOLEV, 1934 a été retenue. Cette méthode consiste à superposer une grille de points régulière sur la zone étudiée afin de quantifier les différentes structures cellulaires présentes.

1.3.2 Méthode stéréologique d'après Glagolev (1934)

Comme il a été dit plus haut, DELESSE a montré que la fraction moyenne de la surface qu'occupe un élément sur une section plane est égale à la fraction moyenne du volume qu'occupe l'élément dans la totalité de l'objet étudié ($V_V = A_A$). GLAGOLEV a défini une surface comme étant le nombre moyen de points qui intersectent avec un profil dans un système de référence uniforme et aléatoire, multiplié par l'aire de la zone d'intérêt (CRUZ-ORIVE, 2017 ; WEST, 2012). Cet auteur a montré que la fraction moyenne de la surface qu'occupe un élément sur une section plane (A_A) peut être estimée en comptant le nombre de fois qu'une grille de points intersecte ce même élément (P_P), donnant ainsi :

$$V_V = A_A = P_P \quad (3.2)$$

avec V_V la fraction moyenne du volume qu'occupe l'élément dans la totalité de l'objet étudié. Ainsi, en prenant la fraction des points comptés pour chaque élément (P_P), il est possible de calculer la proportion des différents types cellulaires :

$$P_P(\%) = \frac{P_i}{P_n} * 100 \quad (3.3)$$

avec P_i le nombre de fois où l'élément i a été compté et P_n le nombre total de points comptés sur la zone d'intérêt. Les éléments quantifiés seront ici les structures cellulaires qui peuvent être retrouvées dans les sections ovariennes ([Tableau 3.3](#)). En utilisant des points, on s'affranchit du biais que pourrait apporter une sonde avec une dimension (lignes, surfaces, *etc.*) dont l'orientation du volume pourrait biaiser le décompte des structures si une méthode *model-based* est utilisée (MOUTON, 2011). Par ailleurs, afin d'assurer l'impartialité lors de l'identification des éléments, l'emplacement de la grille uniforme d'échantillonnage recouvrant la zone d'intérêt est aléatoire (GUNDERSEN et al., 1987). De plus, l'utilisation de points pour le décompte des structures ne nécessite que l'identification de la structure pointée. Couplés à l'utilisation de "lames virtuelles" (donc au travail sur ordinateur de la section histologique scannée préalablement), les logiciels de lecture assurent un passage automatique d'un point à l'autre, et permettent au lecteur de se concentrer sur un seul point à la fois, sans avoir besoin de chercher manuellement le suivant, rendant cette méthode plus efficace (car plus rapide pour un même effort d'échantillonnage) par rapport à d'autres méthodes quantitatives (MATHIEU et al., 1981 ; MOUTON, 2011).

1.4 La stéréologie en halieutique

La stéréologie est une approche ancienne dans son élaboration, et qui a connu une utilisation croissante progressive, avec un regain d'intérêt marqué depuis 2005 : 5732 publications utilisant la stéréologie comme méthode quantitative sont parues entre 1966 et 2016, dont plus de la moitié dans les 15 dernières années (KIPANYULA et al., 2018). L'utilisation de la stéréologie en halieutique, notamment sur des coupes histologiques d'ovaires de téléostéens, n'est pas nouvelle. En effet, les premières tentatives remontent à 1987, comme le montre le [tableau 3.2](#), mais les références dans ce domaine restent rares avant 2010.

La majorité des publications utilisant la stéréologie en halieutique porte sur l'estimation d'indices de fécondité de différentes espèces, basée sur les quantifications des différents stades d'ovocytes présents, comme indiqué dans le [Tableau 3.2](#). Cette approche permet d'estimer l'effort de reproduction avec une précision plus grande que les méthodes de gravimétrie ou de volumétrie, car elle prend en compte l'atrésie (EMERSON et al., 1990 ; GOODALL et al., 1987 ; KJESBU et al., 2010 ; MEDINA et al., 2007), les diamètres limites des différentes cellules de la lignée germinale, les cohortes d'ovocytes qui ne seront pas pondus lors de la saison de reproduction en cours, et la présence de [follicules post-ovulatoires](#) (BUCHOLTZ et al., 2013 ; COOPER et al., 2005 ; KJESBU et al., 2010). Quantifier les différentes cellules de la lignée germinale dans le temps permet également l'étude de leur dynamique de développement (FEIDANTISIS et al., 2020 ; KORTA et al., 2010 ; KORTNER et al., 2008), ainsi que le suivi à très fine échelle des cohortes, notamment chez les espèces possédant un développement gonadique indéterminé (COSTA et al., 2016 ; SCHISMENOU

et al., 2012; SERVOU et al., 2023). En dehors des études de fécondité, la stéréologie est également utilisée pour compléter les résultats des lectures macroscopiques d'ovaires (BUCHOLTZ et al., 2013) ou bien estimer la longueur à maturité des espèces (MEDINA et al., 2002; SAUGER et al., 2023d). Enfin, la précision qu'apporte la stéréologie en fait un outil particulièrement adapté à la compréhension des mécanismes physiologiques associés à la reproduction, permettant par exemple d'étudier l'impact de traitements hormonaux sur le développement de la lignée germinale (ARANDA et al., 2011; KORTNER et al., 2008; LUZIO et al., 2015; SILVA HENRIQUES, 2016).

TABLEAU 3.2 – Articles utilisant la stéréologie sur des lames histologiques ovariennes de téléostéens

Espèces	Information obtenue	Épaisseur sections	Coloration histologique	Mesure des ovocytes	Méthode stéréologique	Paramètres stéréologiques	Autres paramètres	Auteurs
<i>Silugo ciliana</i> (Femelle et Mâle)	Score moyen de reproduction, proportion moyenne d'atrésie, proportion moyenne d'ovocytes en vitellogénèse	5-7µm	Hématoxyline et éosine	NA	Méthode de WEIBEL et al., 1966)	Champs sur lesquels sont superposés des points-transsects. Proportions de points comptabilisées rapportées au volume	Graticule de 42 points	GOODALL et al., 1987
<i>Clupea harengus</i> , <i>Solea solea</i> , <i>Scomber scombrus</i> (Femelle)	Estimation du nombre d'ovocytes en fonction du volume total de l'ovaire (Fécondité). Relation longueur/fécondité	4µm	Réactif de Schiff (PAS) et trichrome de Mallory	Ovocyte fixé au Gilson sous micromètre oculaire. Sur lames histologiques. Formule de WILLIAMS (1977)	Grille M 168 de WEIBEL (1979). Méthode de WEIBEL et al. (1962)	Champs sur lesquels sont superposés des points-transsects. Proportions de points comptabilisées rapportées au volume	27 individus. 2 sections en position médiane de l'ovaire/ind. 20 à 40 champs/section	EMERSON et al., 1990
<i>Tilapia zillii</i> (Femelle)	Vérification de l'homogénéité cellulaire à travers 3 coupes d'ovaires (postérieur, médiane, antérieure). Estimation du nombre d'ovocytes par volume d'ovaire, histomorphométrie des ovocytes dans le temps	3µm	Hématoxyline et éosine	30 ovocytes sectionnés par le nucléus mesurés à la loupe binoculaire graduée	Méthode de WEIBEL (1979)	Champs sur lesquels sont superposés des points-transsects. Proportions de points comptabilisées rapportées au volume de l'ovaire	10 champs/4 section ovariennes pour 10 ind. adultes. Graticule de 42 points (objectif x4x2,5)	COWARD et al., 1998, 2001, 2002a,b
<i>Thunnus thynnus</i> (Femelle)	Nombre moyen d'ovocytes en fonction de la masse de l'individu. Corroboie les résultats avec la longueur à maturité	6µm	Hématoxyline et éosine	Mesures moyennes de l'axe le plus long et le plus court pour 50 ovocytes/stade. Sur lames histologiques. Formule de WILLIAMS (1977)	Méthode de WEIBEL et al. (1962)	Champs sur lesquels sont superposés des points-transsects. Proportions de points comptabilisées rapportées au volume	60 individus. 1 section/ind. (du lumen à la paroi gonadique de la partie la plus épaisse de l'ovaire). 8 champs/section, objectif x10	MEDINA et al., 2002

<i>Sebastolobus alascanus</i> , <i>Sebastolobus altrivellus</i> (Femelle)	Fécondité. Relation longueur/fécondité. Densité d'ovocytes dans les sections antérieure, médiane et postérieure	4 μ m	Hématoxyline et éosine	NA	Graticule de WEIBEL et al. (1966) simplifié	Champs sur lesquels sont superposés des points-transsects. Nombre de points-transsects par ovaire dépendant de la longueur de la section ovarienne. Proportions de points comptabilisées rapportées au volume	6 individus. 2 sections ovariennes entière/ovaire (position médiane ou médiane postérieure) ou 2 sections/ovaire avec la paroi gonadique + centre de l'ovaire. Objectif x25 et x50	COOPER et al., 2005
<i>Thunnus thynnus</i> (Femelles et Mâles)	Estimation du potentiel de reproduction (fécondité)	6 μ m	Hématoxyline VOF	Méthode de MEDINA et al. (2002)	Méthodes de WEIBEL et al. (1962) et WEIBEL et al. (1966)	Champs sur lesquels sont superposés des points-transsects. Proportions de points comptabilisées rapportées au volume de l'ovaire	10 images par section ovarienne pour 168 femelles et 49 mâles. Plusieurs lames histologiques d'une section médiane de gonade/ind.	MEDINA et al., 2007
<i>Gadus morhua</i> (Femelles juvéniles)	Suivi de la dynamique d'ovogenèse. Quantifier la fraction des stades d'ovocytes en prévitellogénèse	4 μ m	Hématoxyline et éosine	NA	Méthode de FREERER et al. (1967) avec une double grille de ratios 1 :4 pour comptage d'ovocytes primaires et 1 :6 pour comptage des autres stades	Fractions des volumes des structures après comptage d'environ 300 points	Observation d'un triplicata de lames de tissu gonadique en culture au microscope x20	KORTNER et al., 2008
<i>Thunnus thynnus</i> (Femelle)	Quantification des cellules de la lignée germinale, comparaison de deux méthodes	10 μ m	Hématoxyline VOF	Méthode de MEDINA et al. (2002)	Deux méthodes comparées : WEIBEL et al. (1966) et méthode de dissecteurs de STERIO (1984)	Dénombrement des différents types cellulaires	10 micrographies sur 1 section centrale d'un ovaire pour 9 ind. pour estimer le Volume total. 12 zones de comptage sur 1 ovaire pour 9 ind.	ARAGÓN et al., 2010
<i>Gadus morhua</i> , <i>Clupea harengus</i> (Femelle)	Présentation d'une nouvelle méthode (stereo-profile method). Proportion d'atrésie	4 μ m	Bleu de toluidine et tétraborate	Analyse d'image automatique d'après THORSEN et al. (2001) sous ImageJ (objectif x200)	Méthode de profils et dissecteurs repris de STERIO (1984)	Comptage des cellules présentes dans les dissecteurs. Arrêt du comptage à 150 cellules	11 sections en séries pour 112 femelles, avec un écart de 1/3 du diamètre du follicule le plus petit. Objectif x7	KJESBU et al., 2010

TABLEAU 3.2 – Articles utilisant la stéréologie sur des lames histologiques ovariennes de téléostéens (suite)

Espèces	Information obtenue	Épaisseur sections	Coloration histologique	Mesure des ovocytes	Méthode stéréologique	Paramètres stéréologiques	Autres paramètres	Auteurs
<i>Merluccius merluccius</i> (Femelle)	Suivi de la dynamique de l'ovogenèse à des stades différents	NA	NA	Mesure manuelle ou automatique (logiciel d'analyse d'image)	Rapport surface-volume d'après EMERSON et al. (1990) et WEIBEL et al. (1966). Version plus élaborée de la méthode auto-diamétrique de KURITA et al. (2009)	Rapport entre le nombre d'ovocytes par gramme d'ovaire et le volume de l'ovaire. Volume obtenu par le comptage de points ($75\mu\text{m}$)	62 Ovaires. Comptage de points : Grille de 256 sondes linéaires de longueurs égales ($75\mu\text{m}$)	KORTA et al., 2010
<i>Danio rerio</i> (Femelles et Mâles adultes)	Dynamique de la gamétogenèse suite à une exposition à des substances non-stéroïdiennes	$5\mu\text{m}$	Hématoxyline et éosine	NA	Méthode de WEIBEL (1979) avec une double grille de points de ratios de 1 :9 pour les femelles (9 et 81 points) et 1 :4 pour les mâles (16 et 64 points)	Volume des différentes structures dans les gonades quantifiées par comptage de points (grille recouvrant toute la section gonadique) sous logiciel CAST-Grid	Pour 30 femelles et 45 mâles, en moyenne 20 sections et 100 zones de comptages par animal. Objectif x40 gonade mâle et x10 gonade femelle	MADUREIRA et al., 2011
<i>Thunnus thynnus</i> (Femelle adulte)	Quantifier l'effet d'implants stimulant la ponte en quantifiant les follicules post-ovulatoires	$10\mu\text{m}$	Hématoxyline VOF	NA	Méthode de dissecteurs de STERIO (1984)	Dissecteurs séparés de $50\mu\text{m}$, deux zones de comptages de 9.6571mm^2 par paire de dissecteurs	12 zones de comptage par ovaire. Une section médiane d'ovaire pour 35 ind.	ARANDA et al., 2011
<i>Danio rerio</i> (Femelles et Mâles adultes)	Impact d'hormones sur la dynamique de la gamétogenèse	$4\mu\text{m}$	Hématoxyline et éosine	NA	Double grille de points de ratios 1 :4 et 1 :1 pour les mâles et 1 :9 pour les femelles présentée par HOWARD et al. (2005)	Volume des différentes structures dans les gonades par comptage de points sous logiciel CAST-Grid	10 sections/ind. pour 16 mâles et 16 femelles. Objectif x100 gonade mâle et x10 gonade femelle	SILVA et al., 2012
<i>Engraulis encrasicolus</i> (Femelle)	Analyse de la dynamique de l'ovogenèse et recrutement des ovocytes	$4\mu\text{m}$	Bleu de toluidine et tétraborate	Mesure manuelle ou automatique sous ImageJ	Rapport entre le nombre d'ovocytes par gramme d'ovaire et le volume de l'ovaire (KURITA et al., 2009) couplé à la méthode de KORTA et al. (2010)	Rapport entre le nombre d'ovocytes par gramme d'ovaire et le volume de l'ovaire. Volume obtenu par le comptage de points	116 individus. 5 champs/ind. Une grille de 58 à 256 points superposée par-dessus chaque champ	SCHISMENOU et al., 2012
<i>Clupea harengus</i> (Femelles)	Nombre d'ovocytes. Dynamique de l'ovogenèse. Fécondité. Validation maturité macroscopique	$5\mu\text{m}$	Hématoxyline et éosine	Méthode de <i>2D nucleator</i> de GUNDERSEN et al. (1988) sous le logiciel newCAST (Visiopharm)	Dissecteur de STERIO (1984) et GUNDERSEN (1989)	Comptage des cellules présentes dans les dissections	Échantillonnage systématique, uniforme et aléatoire (BOYCE et al., 2010) avec 3 sections (écarts à $5\mu\text{m}$, $30\mu\text{m}$ et $60\mu\text{m}$) dans 8 échantillons d'ovaires pour 28 ovaires	BUCHOLTZ et al., 2013

<i>Thunnus thynnus</i> (Femelles)	Dynamique de l'ovogenèse dans le temps et fécondité moyenne de deux stocks	5-6µm	Hématoxyline VOF ou Hématoxyline et éosine	NA	Méthode <i>model based</i>	Nombre d'ovocytes par gramme d'ovaire	10 micrographies/section médiane d'un ovaire pour 179 individus. Sous Image.J	KNAPP et al., 2014
<i>Mertuaccius hubbsi</i> (Femelles)	Estimation du nombre d'ovocytes en fonction du volume total de l'ovaire	5µm	Hématoxyline et éosine	Logiciel d'analyse d'image (Sgmascan Pro 5)	Principe de Cavalieri (GUNDERSEN et al., 1988) pour estimer le volume. Dissecteur de STERIO (1984) pour déterminer le nombre d'ovocytes	Comptage de points sur une section ovarienne entière. Comptage des cellules présentes dans les dissecteurs	Ovaire droit de 3 individus. 10 sections équidistantes et parallèles (5 mm)/ovaire	ALVAREZ-FARIÑA et al., 2015
<i>Danio rerio</i> (Femelles et Mâles adultes)	Impact d'hormones sexuelles sur la différenciation sexuelle et le développement gonadique	3µm	Hématoxyline et éosine	NA	Reprise de la méthodologie utilisée par MADUREIRA et al. (2011) : Méthode de WEIBEL (1979) avec une double grille de points de ratios de 1 :9 pour les femelles (9 et 81 points) et 1 :4 pour les mâles (16 et 64 points)	Volume des différentes structures dans les gonades quantifié par comptage de points (1ère zone de comptage aléatoire, les suivantes équidistantes en fonction de la longueur de la section gonadique)	Section ovarienne : 430µm x 330µm et section testis : 220µm x 170µm. Sous logiciel Olympus Cell 2.6	LUZIO et al., 2015
<i>Thunnus alalunga</i> (Femelles)	Effet de l'utilisation de paraffine ou résine pour quantifier les structures ovariennes sur lames histologiques	4µm	Bleu de toluidine et tétrabrate	10 ovocytes/stades sur 10 micrographies de chaque milieu d'inclusion/ovaire pour 15 ind. Sous Image.J	Méthodes de KORTA et al. (2010) et SCHISMENOU et al. (2012)	Rapport entre le nombre d'ovocytes par gramme d'ovaire et le volume de l'ovaire. 5 zones de comptages de 5.020 mm ² avec 256 points	Section médiane de l'ovaire. 2 à 4 sections utilisées sur 10 micrographie/milieu d'inclusion pour chaque ovaire de 15 ind.	SABER et al., 2015
<i>Stellifer brasiliensis</i> et <i>Stellifer rastriifer</i> (Femelles)	Comparaison des diamètres et volumes des différents ovocytes entre deux espèces pour l'estimation du recrutement et production des follicules	5µm	Hématoxyline et éosine et hématoxyline au réactif de Schiff's (PAS) avec du jaune métanile pour l'identification d'alvéoles corticales	50 ovocytes mesurés avec la méthode de KORTA et al. (2010) sous Image.J	Méthodologie d'EMERSON et al. (1990)	Comptage de points-transects dans plusieurs champs de 0,05cm ² contenant 256 sondes (ou 3200 pour les ovocytes primaires)	10 ind. en capacité de ponte / espèce. 4 à 10 champs de comptages par section ovarienne. Objectif x40	COSTA et al., 2016

TABLEAU 3.2 – Articles utilisant la stéréologie sur des lames histologiques ovariennes de téléostéens (suite)

Espèces	Information obtenue	Épaisseur sections	Coloration histologique	Mesure des ovocytes	Méthode stéréologique	Paramètres stéréologiques	Autres paramètres	Auteurs
<i>Carassius auratus</i> (Femelles et Mâles)	Validation stéréologique des phases de maturité suite à la méthode histologique de JOHNSON et al. (2009)	4µm	Hématoxyline et éosine	NA	Double grille de points d'après WEIBEL (1979) avec une grille de 1 :1 et 1 :16 pour les structures rares/de petites longueurs (troisième grille de 1 :4 pour gonade mâle)	Volume des différentes cellules de la lignée germinale des gonades	Effort d'échantillonnage dépendant de la longueur des gonades, >30 zones échantillonnées par ind. Objectif x33	SILVA HENRIQUES, 2016
<i>Sparus aurata</i> et (Femelles Mâles)	Dynamique de l'ovogenèse. Nombre d'ovocytes en fonction du poids de l'individu. Nombre d'ovocytes par ovaire (fécondité)	NA	NA	Mesures manuelles des ovocytes sous ImageJ. Formule de WILLIAMS (1977)	Principe de DELESSE (1847). Nombre d'ovocytes par unité de volume (WEIBEL et al., 1966)	Estimation de la surface occupée par des ovocytes sous ImageJ	40 gonades. ≥30 sections/gonades	FEIDANTISIS et al., 2020
<i>Sardina pilchardus</i> (Femelles)	Recrutement des ovocytes et dynamique du développement des cohortes à différentes phases	4µm	Bleu de méthylène-azure II - fuschine basique	Mesure des diamètres des ovocytes manuellement ou automatiquement. 1 échantillon d'ovaire/phase et par mois	Méthode de (WEIBEL et al., 1966) (Graticule de 256 points) et KORTA et al. (2010)	Comptage de points pour obtenir le nombre d'ovocytes par gramme d'ovaire	Un lobe échantillonné pour 770 ovaires, avec 6 zones de comptage (3.402mm ²) par individus. Sous ImageJ	SERVOU et al., 2023
<i>Thunnus thynnus</i> (Femelles)	Dynamique de l'ovogenèse de deux stocks dans le temps, avec fécondités moyennes	10µm	Trichrome de Mallory	10 ovocytes/stades sur 10 micrographies pour chaque ovaire. Sous ImageJ	Deux méthodes utilisées : (WEIBEL et al., 1962) (compter le nombre de structures dans une surface) et KURITA et al. (2009)	Nombre d'ovocyte par gramme d'ovaire	10 sections distantes de 400µm/ovaire. 64 ind. Objectif x4.	CRUZ-CASTÁN et al., 2023
<i>Pleuronectes platessa</i> (Femelles)	Dynamique de l'ovogenèse. Proportions d'ovocytes pour en déduire la phase de maturité	5µm	Trichrome de Prenant-Gabe et Bleu alcian pour identification des alvéoles corticales	Longueur moyenne de 20 ovocytes/stade. Sous microscope Olympus AX70	Méthode de GLAGOLEV (1934)	Proportions de structures par comptage de points équilibrés sur une section ovarienne entière	151 individus. 1 section médiane avec grille de 500 à 600 points de comptage. Objectif x20	SAUGER et al., 2023d

Objectifs

Les méthodologies présentées dans ce [Chapitre 3](#) ont pour objectif l'identification et la quantification des structures cellulaires ovariennes pour assurer une estimation fiable des phases de maturité des espèces suivies. Pour cela, plusieurs étapes ont été envisagées :

- ✧ Produire et mettre en ligne un protocole de récolte d'échantillons frais, applicable dans un cadre halieutique décrivant le prélèvement des ovaires et leur traitement jusqu'à l'obtention de lames histologiques.
- ✧ Acquérir des connaissances fondamentales sur le développement de la lignée germinale femelle pour les quatre espèces étudiées (*Mullus surmuletus*, *Pleuronectes platessa*, *Lepidorhombus whiffiagonis* et *Lepidorhombus boscii*). La description des critères d'identification des stades cellulaires retrouvés lors de l'ovogenèse est un préalable à la quantification des structures ovariennes par analyse stéréologique.
- ✧ Produire un protocole d'histologie quantitative basé sur la méthode stéréologique de GLAGOLEV (1934) pour quantifier la proportion des différentes structures cellulaires ovariennes.
- ✧ Vérifier l'homogénéité cellulaire, en appréciant l'effet de la position de la coupe histologique dans les 2 gonades sur les pourcentages des structures quantifiées.
- ✧ Standardiser les lectures stéréologiques *via* une calibration entre agents lecteurs, avec production et mise en ligne d'un protocole de lecture stéréologique qui, au delà de ce travail, posera les bases d'un protocole générique utilisable pour d'autres espèces.
- ✧ Analyser les données résultantes pour classer les individus dans une phase de maturité en suivant les critères définis par le [CIEM](#).
- ✧ Comparer des phases de maturité macroscopiques et stéréologiques, en calculant les ogives de maturité selon ces deux approches.
- ✧ Suivre le déroulement de l'ovogenèse de chaque espèce dans le temps.

2 Matériel et Méthodes

2.1 Préparation des lames histologiques

Les traitements histologiques effectués sur les pièces ovariennes sont détaillés dans la **Publication 2** du **Volume II**.

Pour chaque individu, une section médiane de 5mm d'épaisseur, perpendiculaire à l'axe horizontal de l'ovaire, a été récoltée. Ces sections ovariennes ont été placées dans un fixateur de Davidson pendant 24h à 48h, avant d'être déshydratées par bains successifs d'éthanol à degrés croissants (70°, 95° et 100°), puis dans des bains de butanol (100°) avant l'inclusion des pièces dans des blocs de paraffine à l'aide de barres de Leuckart (Figure 3.2). Finalement, des sections de 3 μm d'épaisseur ont été coupées à l'aide d'un microtome manuel (Leica RM 2135).



FIGURE 3.2 – Plan de travail pour l'inclusion des pièces en paraffine avec 1) panier chauffant contenant les cassettes histologiques avec les pièces ovariennes dans le bain final de paraffine, 2) distributeur de paraffine liquide, 3) deux barres de Leuckart positionnées pour accueillir le prochain échantillon, 4) barres de Leuckart avec échantillon inclus en paraffine et son étiquette d'identification

Les sections ovariennes ont ensuite été déparaffinées *via* un solvant de paraffine à base de limonène (Roti-histol®), colorées au trichrome de Prenant-Gabe (GABE, 1968) et montées entre lame et lamelle au Roti-histol kit®. Deux colorations ont été utilisées :

- ✧ Le trichrome de Prenant-Gabe, une coloration polychrome à 3 teintes réalisée par trempage selon le protocole décrit en **Publication 2 (Volume II)** : l'hématoxyline de Groat permet la coloration des noyaux en gris. L'éosine colore les cytoplasmes en rose et les fibres dans une gamme de colorations de rose plus ou moins vives selon l'acidophilie des différents éléments. Le vert lumière teint les tissus conjonctifs en vert (GABE, 1968 ; MARTOJA et al., 1967).
- ✧ La coloration au bleu alcian et à l'acide périodique de Schiff (bleu alcian - PAS), décrit en **Publication 2 (Volume II)**, permet la mise en évidence des alvéoles corticales (Figure 3.3). Elle a été appliquée sur 5 lames pour chaque espèce, sur des échantillons d'individus récoltés à différentes périodes (un individu en vitellogénèse, deux individus sexuellement matures avant la ponte et deux individus immatures) (MARTOJA et al., 1967).

Les coupes ont été réalisées en série, avec trois coupes colorées au trichrome de Pernant-Gabe et 3 autres consécutives colorées au bleu alcian.

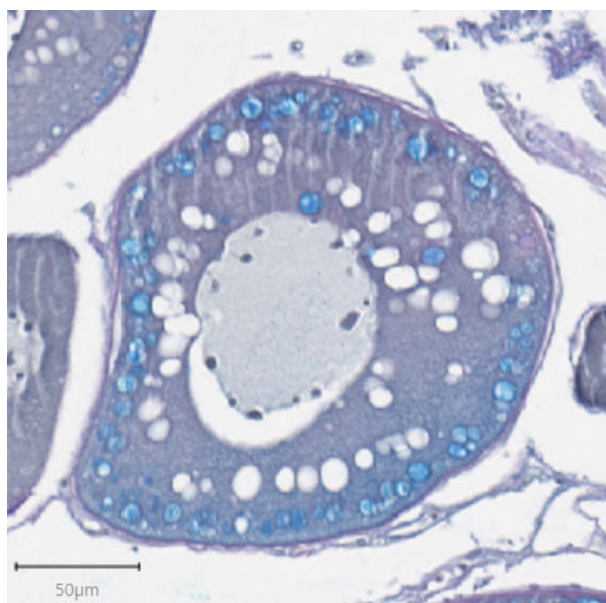


FIGURE 3.3 – Coloration d'un ovocyte à alvéoles corticales **cao** de cardine franche (*L. whiffiagonis*) au bleu alcian et à l'acide périodique de Schiff (bleu alcian PAS), avec teinte des alvéoles corticales en bleu

Publications 2 et 3 Volume II

Titres :

- ✧ Protocoles pour l'étude histologique de gonades de poissons marins. **Publication 2**
- ✧ Sample collection protocol for maturity staging of marine fish through histology. **Publication 3**

Résumé : Recueil de protocoles utilisés pour la conception de lames histologiques ovariennes de poissons marins lors de cette thèse. Les étapes présentes vont de la dissection de l'individu frais au stockage des échantillons, en passant par la fixation, la déshydratation, la mise sous paraffine, la coupe au microtome, la coloration et le montage entre lames et lamelles. Avec **Publication 2** : recueil des protocoles utilisés lors de cette thèse ; **Publication 3** : recueil en anglais des protocoles utilisés dans un cadre halieutique au laboratoire d'**Ifremer** de Port-en-Bessin. Ce document sera soumis à être revu par les pairs dans *Nature Protocols*.

Contribution : Création, conception et rédaction du document français avec prise des photos. Correction linguistique pour la version anglaise.

The cover features a vertical yellow bar on the left with the word 'Ifremer' written vertically in black. To the right of this bar, the title 'Protocoles pour l'étude histologique de gonades de poissons marins' is centered at the bottom. Above the title, there is a header section containing the following information:

Système d'Informations Halieutiques
Action Paramètres biologiques

Carine Sauger¹
Sophie Parrad¹
Laurent Dubroca¹
Kristell Kellner²
Nadège Villain-Naud²

SIH
Système
d'Informations
Halieutiques

Janvier 2023 – V.1.0

1 : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, IFREMER, Laboratoire Ressources Halieutiques de Port-en-Bessin, 14520 Port-en-Bessin-Huppain, France.
2 : Université de Caen Normandie, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (UMR 8067 BOREA) MNHN, Sorbonne Université, UCN, CNRS-7208, IRD, UA, équipe EMERGE, Esplanade de la Paix 14032 Caen, France

2.2 Vérification de l'homogénéité cellulaire

En plus de l'utilisation d'une méthode minimisant le biais tout en maximisant la précision, il a été nécessaire de s'assurer de la représentativité de la coupe par rapport à l'ensemble de la gonade. Pour cela, des méthodes d'échantillonnage aléatoire peuvent être effectuées à travers l'organe à l'étude (BOYCE et al., 2010). La méthode de vérification de l'homogénéité cellulaire présentée dans ce manuscrit a consisté en l'échantillonnage de trois sections transversales à 3 niveaux de chaque ovaire (Figure 3.4) pour une quinzaine d'individus *P. platessa*, *M. surmuletus* et *L. whiffiagonis*.

Les 15 individus ont été récoltés lors d'un même évènement d'échantillonnage, avant la période du frai. Ce choix permis de comparer des individus dans une même phase de maturité avec un maximum de types cellulaires de la lignée germinale, en évitant les individus en régression/régénération (phase D) qui peuvent présenter de grandes différences au niveau des proportions d'atrésie. Pour chaque individu, une section transversale de 1 cm a été extraite en positions antérieure (1), médiane (2) et postérieure (3) des deux ovaires. Pour les poissons plats, les 6 sections perpendiculaires à l'axe horizontale de l'ovaire ont été notées D1 (ovaire Dorsale position antérieure), D2 (Dorsale médiane), D3 (Dorsale postérieure), V1 (Ventrale antérieure), V2 (Ventrale médiane), V3 (Ventrale postérieure). Pour les poissons ronds, les 6 sections perpendiculaires à l'axe horizontal de l'ovaire étaient notées D1 (ovaire Droit position antérieure), D2 (Droit médiane), D3 (Droit postérieure), G1 (Gauche antérieure), G2 (Gauche médiane), G3 (Gauche postérieure).

Les proportions cellulaires ont été quantifiées d'après la méthode de GLAGOLEV (1934) et des modèles linéaires généralisés (ou GLM pour *Generalized Linear Model*) ont été établis sur chaque type cellulaire identifié. La variable réponse est le nombre de fois qu'une structure a été comptabilisée pour chaque lame divisé par le nombre total de structures comptées par lame. Ainsi, l'expression de la variable réponse en pourcentage induit l'utilisation d'un GLM de type binomial. Afin de compléter cette analyse, une **Analyse en Composantes Principales (ACP)** a été utilisée pour représenter les variations et les corrélations entre les variables, et le positionnement des différents contenus histologiques en fonction de l'origine de la coupe.

2.3 Lexiques descriptifs de l'ovogenèse

L'observation des lames histologiques au microscope Olympus AX70 (logiciel Olympus CellSens©) a permis la mise en place de lexiques décrivant les différents stades cellulaires retrouvés lors de l'ovogenèse des quatre espèces suivies (*M. surmuletus*, *L. whiffiagonis*, *L. boscii* et *P. platessa*). Les diamètres moyens des différentes cellules de la lignée germinale femelle, ainsi que les épaisseurs moyennes de leurs *zona radiata* ont été mesurées sur 20 follicules échantillonnés sur différentes lames. Dix-huit structures cellulaires ont été identi-

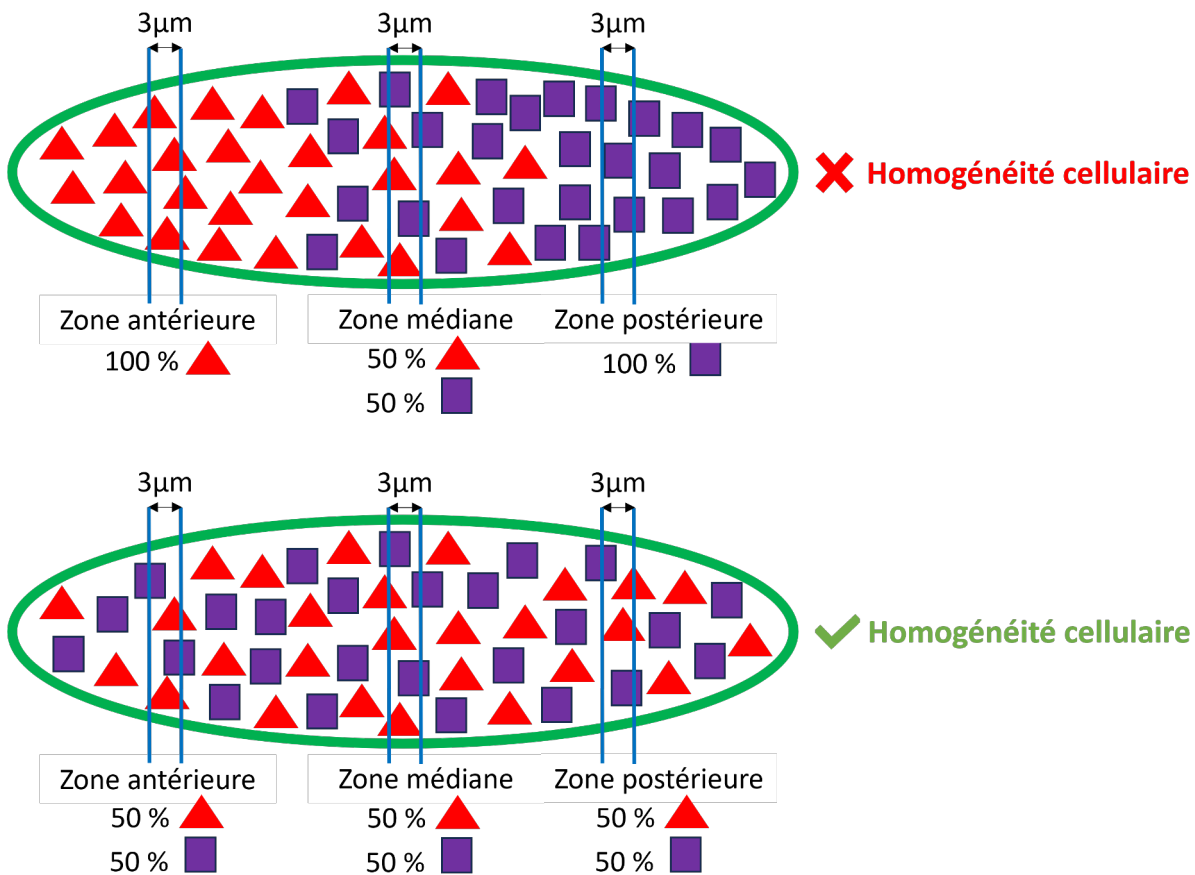


FIGURE 3.4 – Schéma d'un ovaire dans lequel différentes structures sont présentes (carrés rouges et triangles violets), avec le pourcentage des différentes structures présentes en fonction de l'emplacement dans la coupe (zone antérieure, médiane et postérieure) pour un ovaire hétérogène (haut) et un ovaire homogène (bas)

fiées et décrites à travers les coupes ovariennes des différentes espèces (Tableau 3.3), dont 11 stades folliculaires. Chacune des 18 structures a été détaillée et afin de faciliter l'identification des cellules de la lignée germinale, un arbre de décision a été mis en place. Cet arbre reprend les critères d'identification clés de chaque stade cellulaire, avec identification de la structure par élimination des critères observés à chaque embranchement.

TABLEAU 3.3 – Liste des 18 structures cellulaires retrouvées dans des sections ovariennes des téléostéens avec leurs abréviations

Abréviation	Nom
og	ovogonie
po1	ovocytes primaires stade 1
po2	ovocytes primaires stade 2
ldo	ovocytes avec gouttelettes lipidiques
cao	ovocytes à alvéoles corticales
vtg	ovocytes en vitellogenèse
oih	ovocytes en cours d'hydratation
ho	ovocytes hydratés
POF	follicules post-ovulatoires
aoA	ovocyte en atresie α
aoB	ovocyte en atresie β
L	lyse
bv	vaisseaux sanguins
Is	espace intercellulaire
gw	paroi gonadique
ct	tissu conjonctif
E	espace non naturel
U	indéterminées

2.4 Quantification stéréologique

Les lames histologiques ont été numérisées à l'aide d'un scanner de lames histologiques. Pour la plie (*P. platessa*), la cardine franche (*L. whiffiagonis*) et la cardine à quatre taches (*L. boscii*), un scanner Aperio CS a été utilisé (logiciel Scan Scope Console v.10.2.0.2352, Leica Biosystems), avec un grossissement au x20 (ouverture numérique 0.75). Pour le rouget barbet de roche (*M. surmuletus*) un scanner VS120 Olympus (logiciel Olympus VS-ASW) a permis la numérisation des lames au grossissement x20. De plus, pour ce dernier scanner, l'acquisition des images a été faite à 3 profondeurs de champs sur les 3 μm d'épaisseur de coupe, pour optimiser la netteté des images. Le changement de scanner est lié à la mise à disposition d'un scanner plus performant par le *Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie (CMAbio3)* durant le temps de la thèse. Lors de la numérisation, si plusieurs sections ovariennes se trouvent sur la même lame, la section la plus complète est sélectionnée et numérisée (paroi gonadique entière et fermée, cellules non arrachées, pas de plis ou déchirures).

Les sections ovariennes numérisées ont été analysées sous le logiciel QuPath version 3.2 (BANKHEAD et al., 2017). Pour chaque coupe histologique numérisée, une zone d'intérêt a été délimitée pour la lecture stéréologique (Figure 3.5). Cette zone d'intérêt est définie comme la section ovarienne entière délimitée par la paroi gonadique. Une grille d'échantillonnage a été superposée à l'image, recouvrant la zone d'intérêt. En se basant sur la méthode de GLAGOLEV, des points ont été utilisés comme sondes (MOUTON, 2011). La grille est composée de 500 à 600 points équidistants entre eux avec un premier point de position aléatoire. Les points sont équidistants mais l'écartement entre eux varie d'une lame à l'autre afin d'assurer un effort d'échantillonnage identique, indépendamment des variations en longueur et forme des sections ovariennes, avec un recouvrement maximum de la surface d'intérêt (SAUGER et al., 2020).

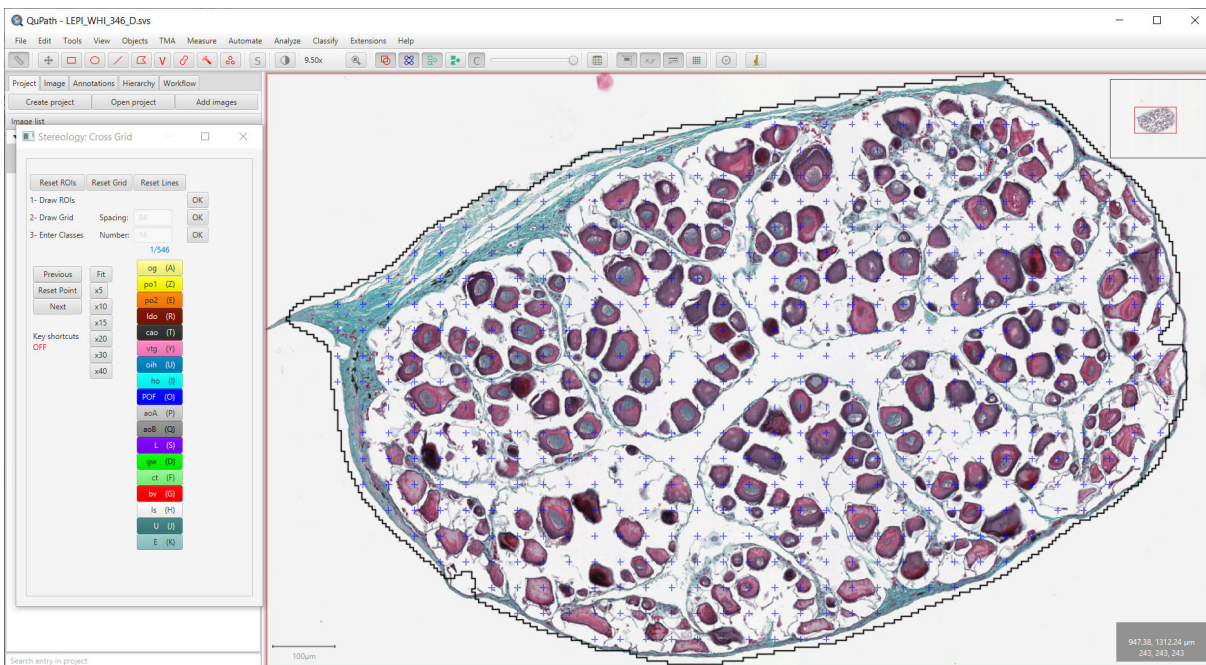


FIGURE 3.5 – Fenêtre d'interface du logiciel QuPath avec une section ovarienne d'une femelle cardine franche (*L. whiffiagonis*). La surface d'échantillonnage est la section ovarienne entière délimitée par le trait noir. Les sondes (croix bleues) sont superposées à la section et forment une grille de 500 à 600 points équidistants entre eux. La fenêtre de gauche présente les 18 structures cellulaires identifiables, avec : ovogonie (**og**), ovocytes primaires stade 1 (**po1**), ovocytes primaires stade 2 (**po2**), ovocytes avec gouttelettes lipidiques (**ldo**), ovocytes à alvéoles corticales (**cao**), ovocytes en vitellogenèse (**vtg**), ovocytes en cours d'hydratation (**oih**), ovocytes hydratés (**ho**), follicules post-ovulatoires (**POF**), ovocyte en atrophie α (**aoA**), ovocyte en atrophie β (**aoB**), lyse (**L**), paroi gonadique (**gw**), tissu conjonctif (**ct**), vaisseaux sanguins (**bv**), espace intercellulaire (**Is**), indéterminées (**U**) et espace non naturel (**E**)

2.5 Calibration inter-agents

En amont des lectures stéréologiques, des exercices de calibration ont été réalisés entre les lecteurs afin de mettre en place un ensemble de règles permettant d'éliminer au maximum la subjectivité des lectures, tout en assurant la reproductibilité. La Figure 3.6 récapitule les différentes étapes de ce processus de calibration. Ainsi, pour chaque espèce, quinze lames histologiques de 15 individus de longueurs et phases différentes ont été choisies aléatoirement parmi l'ensemble des lames disponibles.

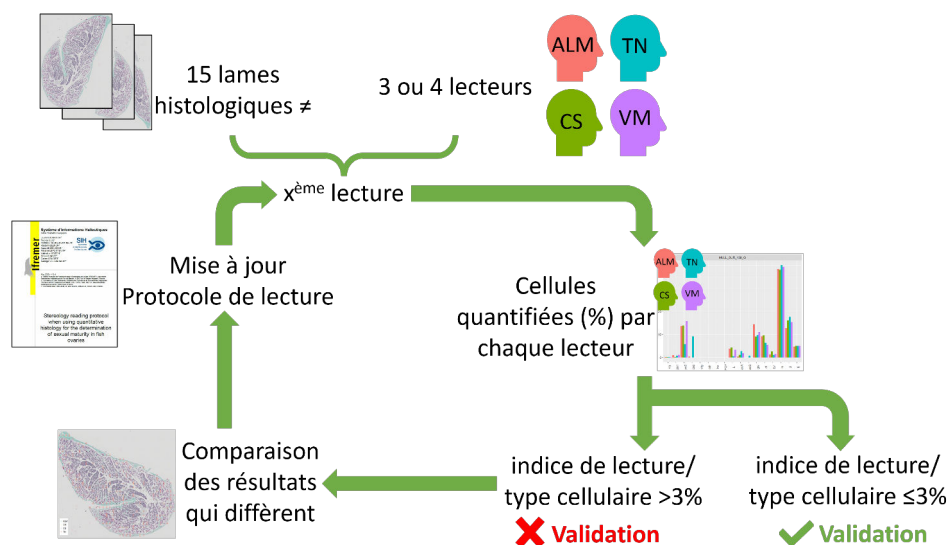


FIGURE 3.6 – Schéma récapitulatif des étapes effectuées lors des exercices de calibration entre plusieurs agents lors de la lecture des lames stéréologiques et la mise en place du protocole de lecture des lames

Ces quinze lames ont été lues par au moins trois agents en utilisant la même grille d'identification cellulaire (lexique) pour tous les agents. Suite à cette première lecture, les identifications sont comparées point par point (Figure 3.7) et des règles de lectures sont mises en place sous la forme d'un **protocole de lecture**. Ces règles permettent de clarifier les critères d'identification et encadrent les cas ambivalents liés au placement des points de lecture : point entre deux structures, point entre la paroi gonadique et la ligne de contour de la zone d'intérêt, point sur un ovocyte dont le noyau n'est pas apparent, *etc.*

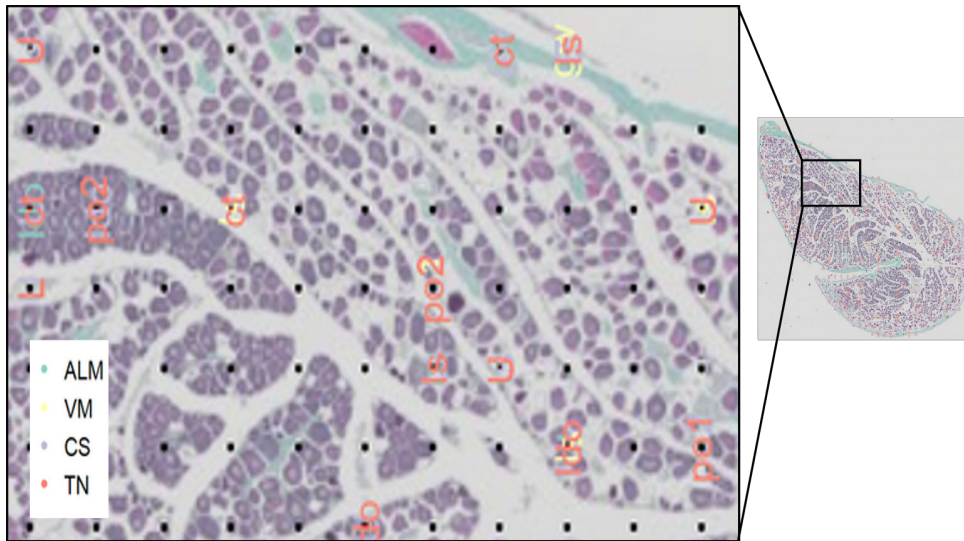


FIGURE 3.7 – Visualisation des résultats de quatre lecteurs sur les points où des structures différentes ont été identifiées lors de l'exercice de calibration pour une section d'ovaire gauche de rouget barbet de roche (*M. surmuletus*), individus 139

Un indice de lecture (%) a été calculé pour chaque type cellulaire identifié sur les lames de calibration. Cet indice correspond à la différence entre la proportion la plus élevée et la proportion la plus basse, comptabilisée entre agents. En prenant le quantile à 90% des distributions de l'indice de lecture (%), un seuil maximal de 3% a été déterminé. Ce seuil correspond à un compromis entre l'adéquation des identifications entre les différents lecteurs (faible taux d'erreur de lecture de 3% ou moins) et l'identification des structures difficiles à catégoriser objectivement (indice de lecture de plus de 3%). Une fois les règles et le protocole de lecture mis en place, une autre lecture de calibration est effectuée et les résultats comparés. Ce processus est répété jusqu'à ce que l'indice de lecture entre les agents soit inférieur à 3% (SAUGER et al., 2020).

Ce seuil de 3% n'inclut pas la catégorie **indéterminées (U)** car cette catégorie reflète l'expérience du lecteur à identifier les structures cellulaires. Il a donc été accepté qu'un agent favorise la structure **U** quand il y avait un doute d'identification, tant que ce dernier ne comptabilisait pas un type cellulaire qui n'était pas retrouvé par les autres agents. En effectuant cet exercice de calibration pour chaque espèce, les lexiques ont été validés, assurant que les cellules de la lignée germinale femelle étaient décrites avec suffisamment de détails pour leurs identifications, limitant ainsi les trop grands écarts pour la catégorie **U**.

Pour visualiser la progression entre la première et la dernière lecture de calibration entre agents, le pourcentage d'accord moyen (*agreement percentage* et Kappa de Fleiss') a été utilisé (CONGER, 1980 ; HALLGREN, 2012 ; MCHUGH, 2012).

2.6 Classification des phases de maturité

Les structures ovariennes ont été quantifiées sur une section médiane d'ovaire pour chaque individu. Ces proportions cellulaires ont ensuite été ramenées à des pourcentages. Le classement dans une phase de maturité est réalisé en accord avec les définitions instaurées par le CIEM (Tableau 3.1), en se basant sur la présence ou l'absence de stades cellulaires clés. Un script a été mis en place sous RStudio (v. 2022.12.0.353) pour classer chaque individu dans une phase de maturité (Tableau 3.4). Une première version de ce classement a été adapté chez la plie (*P. platessa*) et est détaillé dans l'Article 2 (p. 154).

TABLEAU 3.4 – Règles pour la classification des individus téléostéens en fonction des structures histologiques quantifiées. Ces règles ont été mises en place sur la base des définitions discutées lors des *Workshop for Maturity Staging Chairs (WKMATCH)* (ICES, 2014), *Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF)* (ICES, 2018) et des critères discutés par BROWN-PETERSON et al. (2011). En vert les stades cellulaires qui peuvent être présents et en rouge les stades cellulaires qui doivent être absents. Phases de maturité : Immature (A), Développement (B), Frai (C), En ponte (Ca), En capacité de ponte (Cb), Régression / Régénération (D) et Omission de ponte (E). Cellules de la lignée germinale : ovogonie (**og**), ovocytes primaires stade 1 (**po1**), ovocytes primaires stade 2 (**po2**), ovocytes avec gouttelettes lipidiques (**ldo**), ovocytes à alvéoles corticales (**cao**), ovocytes en vitellogenèse (**vtg**), ovocytes en cours d'hydratation (**oih**), ovocytes hydratés (**ho**), follicules post-ovulatoires (**POF**), ovocyte en atrophie α (**oaA**), ovocyte en atrophie β (**oaB**)

	og	po1	po2	ldo	cao	vtg	oih	ho	POF	oaA	oaB	
A	Green				Red						<50%	Red
B	Green				Red						<50%	Red
C	Ca	Green					Red				<50%	Green
	Cb	Green					Red				<50%	Red
D	Classification des lames restantes en D											
E	Red									>50%	Green	

Individus immatures (A) Ces individus ont des pourcentages de **og** ou **po1** ou **po2** ou **ldo** non nuls et sont caractérisés par une absence de **cao**, **vtg**, **oih**, **ho**, **POF** et **oaB**. Les (**oaA**) représentent moins de 50% de l'ensemble des cellules de la lignée germinale comptées.

Individus en développement (B) Ces individus ont un pourcentage de **cao** ou **vtg** non nul et ne présentent pas de **oih**, **ho**, **POF** et **oaB**. Les **oaA** représentent moins de 50% de l'ensemble des cellules de la lignée germinale comptées.

Individus en ponté (Ca) Ces individus présentent des **POF** et des pourcentages de **vtg**, des **oih**, des **ho** ou des **aoB** non nuls. Les **aoA** représentent moins de 50% de l'ensemble des cellules de la lignée germinale comptées.

Individus en capacité de ponté (Cb) Ces individus ont un pourcentage de **oih** ou **ho** non nul, et ne présentent pas de **POF** ni **aoB**. Les **aoA** représentent moins de 50% de l'ensemble des cellules de la lignée germinale comptées.

Individus en omission de ponté (E) Ces individus présentent un pourcentage de **aoA** de plus de 50% sur l'ensemble des cellules de la lignée germinale comptées, et pas de **POF**.

Individus en régression / régénération (D). Comme il est difficile de mettre en place des règles fixes pour cette phase de maturité de par la grande diversité de profils possibles, les individus classés en D seront ceux qui ne pourront être classés dans aucune des autres phases, les critères du [Tableau 3.2](#) étant exhaustifs pour les phases A, B, C et E.

2.6.1 Analyses complémentaires - *Clustering*

Dans l'étude du rouget barbet de roche (*M. surmuletus*), un regroupement hiérarchique par apprentissage non supervisé (*hierarchical Clustering*) a été effectué sur tous les individus classés dans la catégorie A (immature) par la méthode stéréologique, indépendamment de leur stock d'origine et en n'utilisant que les données des pourcentages de cellules de la lignée germinale.

2.7 Longueur et âge à première maturité

Pour chaque espèce, la longueur (L_{50}) et l'âge (A_{50}) auxquels 50% de la population est sexuellement mature ont été calculés sous RStudio avec le *package* *sizeMat* (TORREJON-MAGALLANES, 2018), en prenant les données de maturité individuelles issues des lectures stéréologiques et de leurs classification.

3 Résultats

3.1 Lexiques pour les lectures stéréologiques

Le détail descriptif des stades cellulaires de la lignée germinale femelle, ainsi que toutes autres structures pouvant être retrouvées dans les ovaires des quatre espèces étudiées, est donné dans les **Publications 5 à 8** du **Volume II** sous forme de lexiques. En plus des descriptions cellulaires retrouvées dans ces lexiques, des arbres de décision ([Figure 3.8](#))

ont été mis en place dans ces documents pour accompagner l'identification des structures cellulaires ovariennes, ils sont couplés à une fiche récapitulative d'identification des différents stades cellulaires (Figures 3.11, 3.13 et 3.15).

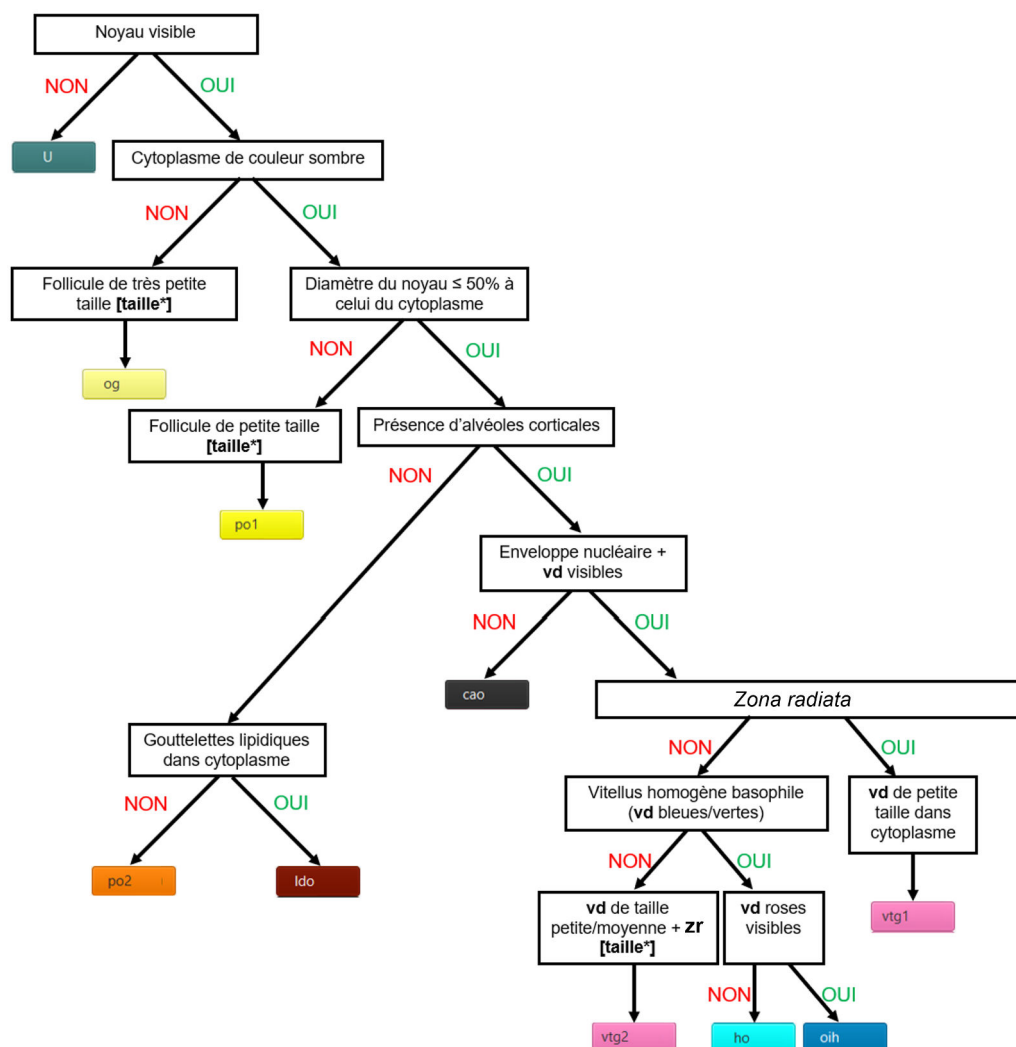


FIGURE 3.8 – Arbre de décision général pour l'identification des différents stades cellulaires de la lignée germinale femelle chez les téléostéens étudiés. [taille*] se référer au lexique de l'espèce pour les diamètres des follicules. Avec : ovogenèse (**og**), ovocytes primaires stade 1 (**po1**), ovocytes primaires stade 2 (**po2**), ovocytes avec gouttelettes lipidiques (**ldo**), ovocytes à alvéoles corticales (**cao**), ovocytes en vitellogenèse (**vtg**), ovocytes en cours d'hydratation (**oih**), ovocytes hydratés (**ho**), follicules post-ovulatoires (**POF**) et indéterminées (**U**)

3.1.1 Ovogenèse de la plie, *Pleuronectes platessa* Linnaeus, 1758

Les cellules de la lignée germinale lors de l'ovogenèse de la plie (*P. platessa*) sont décrites en détail dans l'Article 1 (p. 132), ainsi que dans le lexique en Publication 4 du

Volume II.

L'ovaire présente une organisation concentrique en lamelles, contenant des cellules germinales (ovogonie (**og**) ou ovocytes à différents stades de maturation). Les cellules identifiées en microscopie sont illustrées en Figure 3.9. Leur diamètre moyen varie de 14.28 μm pour les **og**, jusqu'à 958.66 μm pour les ovocytes en cours d'hydratation (**oih**).

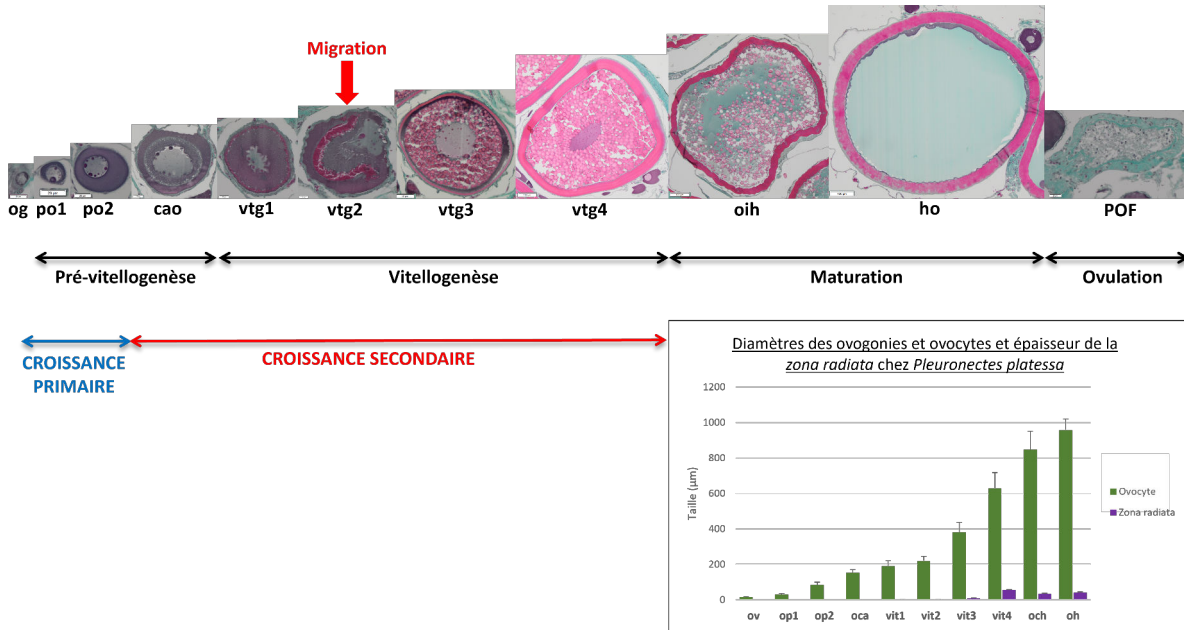


FIGURE 3.9 – Cellules de la lignée germinale femelle de la plie (*P. platessa*) avec leur diamètre moyen (μm) et l'épaisseur moyenne de la *zona radiata*. Avec : ovogonie (**og**), ovocytes primaires stade 1 (**po1**), ovocytes primaires stade 2 (**po2**), ovocytes avec gouttelettes lipidiques (**ldo**), ovocytes à alvéoles corticales (**cao**), ovocytes en vitellogenèse (**vtg**), ovocytes en cours d'hydratation (**oih**), ovocytes hydratés (**ho**) et follicules post-ovulatoires (**POF**)

3.1.2 Ovogenèse du rouget barbet de roche, *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758

Les cellules de la lignée germinale de l'ovogenèse du rouget barbet de roche (*M. surmuletus*) sont décrites en détail dans le lexique en **Publication 5** du **Volume II**.

L'ovaire présente une organisation concentrique en lamelles, contenant des cellules germinales illustrées en Figure 3.10. Leur diamètre moyen varie de 6.20 μm pour les **og** jusqu'à 579.77 μm pour les ovocytes en cours d'hydratation (**oih**).

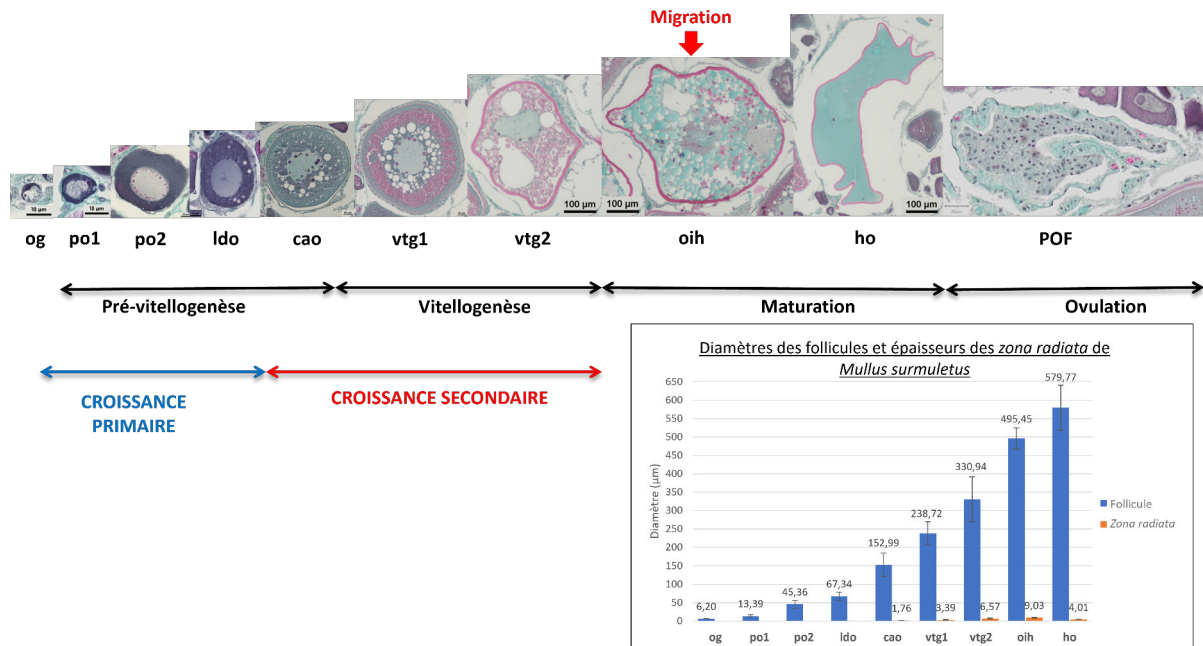


FIGURE 3.10 – Cellules de la lignée germinale femelle du rouget barbet de roche (*M. surmuletus*) avec leur diamètre moyen (μm) et l'épaisseur moyenne de la *zona radiata*. Avec : ovogonie (**og**), ovocytes primaires stade 1 (**po1**), ovocytes primaires stade 2 (**po2**), ovocytes avec gouttelettes lipidiques (**ldo**), ovocytes à alvéoles corticales (**cao**), ovocytes en vitellogenèse (**vtg**), ovocytes en cours d'hydratation (**oih**), ovocytes hydratés (**ho**) et follicules post-ovulatoires (**POF**)

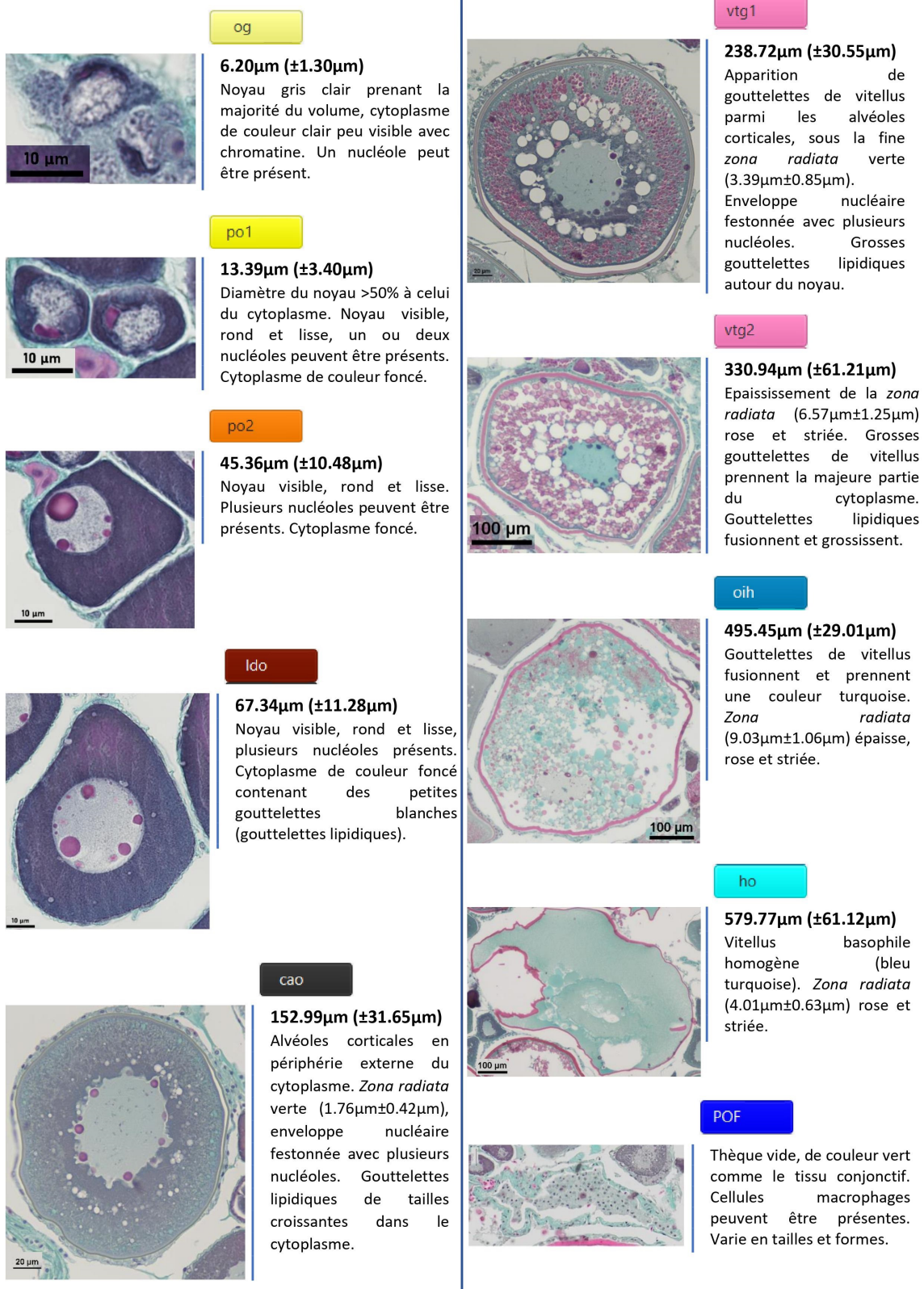


FIGURE 3.11 – Fiche résumant les critères d'identification des stades cellulaires de la lignée germinale femelle du rouget barbet de roche (*M. surmuletus*). Avec : ovogonie (og), ovocytes primaires stade 1 (po1), ovocytes primaires stade 2 (po2), ovocytes avec gouttelettes lipidiques (ldo), ovocytes à alvéoles corticales (cao), ovocytes en vitellogenèse (vtg), ovocytes en cours d'hydratation (oih), ovocytes hydratés (ho) et follicules post-ovulatoires (POF)

3.1.3 Ovogenèse de la cardine franche, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792)

Les cellules de la lignée germinale de l'ovogenèse de la cardine franche (*L. whiffiagonis*) sont décrites en détail dans le lexique en **Publication 6** du **Volume II**.

L'ovaire présente une organisation concentrique en lamelles, contenant des cellules germinales illustrées en **Figure 3.12**. Leur diamètre moyen varie de 6.20 μm pour les **og** jusqu'à 579.77 μm pour les ovocytes en cours d'hydratation (**oih**).

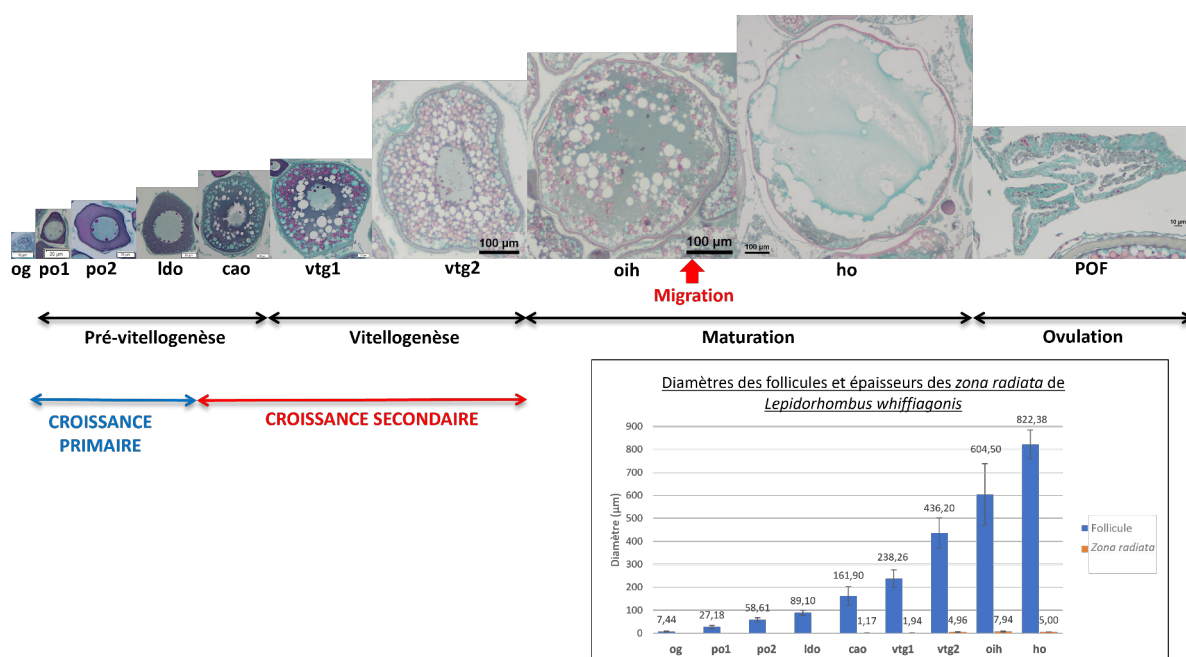


FIGURE 3.12 – Cellules de la lignée germinale femelle de la cardine franche (*L. whiffiagonis*) avec leur diamètre moyen (μm) et l'épaisseur moyenne de la *zona radiata*. Avec : ovogonie (**og**), ovocytes primaires stade 1 (**po1**), ovocytes primaires stade 2 (**po2**), ovocytes avec gouttelettes lipidiques (**ldo**), ovocytes à alvéoles corticales (**cao**), ovocytes en vitellogenèse (**vtg**), ovocytes en cours d'hydratation (**oih**), ovocytes hydratés (**ho**) et follicules post-ovulatoires (**POF**)

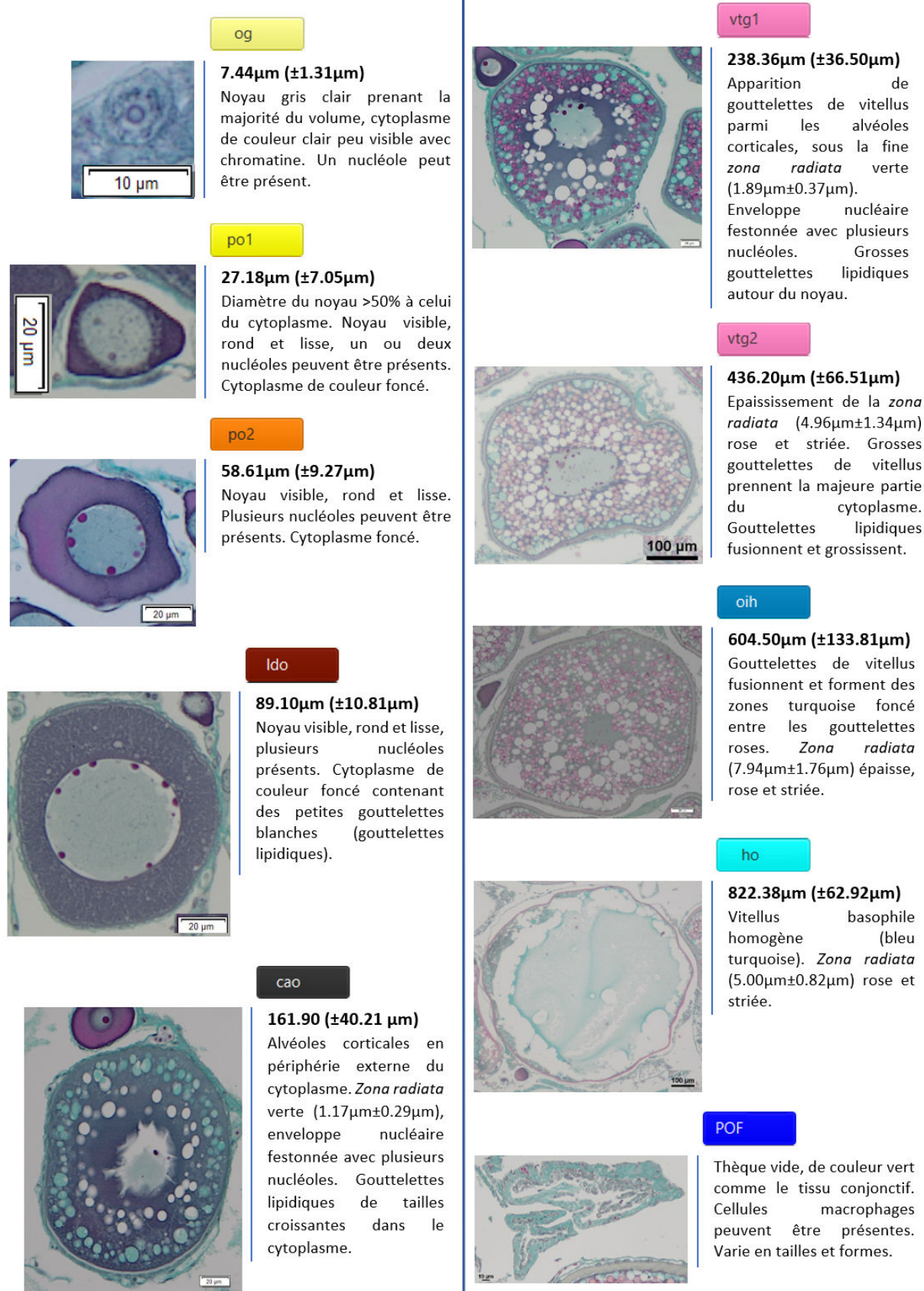


FIGURE 3.13 – Fiche résumant les critères d'identification des stades cellulaires de la lignée germinale femelle de la cardine franche (*L. whiffiagonis*). Avec : ovogonie (**og**), ovocytes primaires stade 1 (**po1**), ovocytes primaires stade 2 (**po2**), ovocytes avec gouttelettes lipidiques (**ldo**), ovocytes à alvéoles corticales (**cao**), ovocytes en vitellogenèse (**vtg**), ovocytes en cours d'hydratation (**oih**), ovocytes hydratés (**ho**) et follicules post-ovulatoires (**POF**)

3.1.4 Ovogenèse de la cardine à quatre taches, *Lepidorhombus boscii* (Risso, 1810)

Pour la cardine à quatre taches (*L. boscii*), les ovaires ont été récoltés lors de la campagne EVHOE ayant lieu d'octobre à novembre. Seuls les stades cellulaires en pré-vitellogenèse et en début de vitellogenèse ont pu être identifiés et décrits dans le lexique en **Publication 7** du **Volume II**.

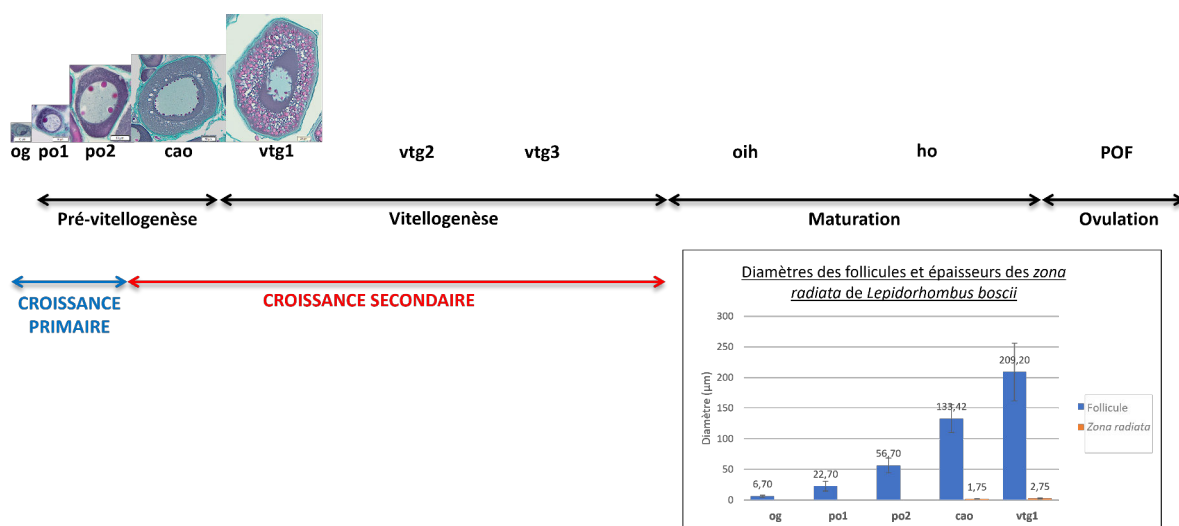


FIGURE 3.14 – Cellules de la lignée germinale femelle de la cardine à quatre taches (*L. boscii*) avec leur diamètre moyen (μm) et l'épaisseur moyenne de la *zona radiata*. Avec : ovogonie (**og**), ovocytes primaires stade 1 (**po1**), ovocytes primaires stade 2 (**po2**), ovocytes à alvéoles corticales (**cao**) et ovocytes en vitellogenèse (**vtg**)

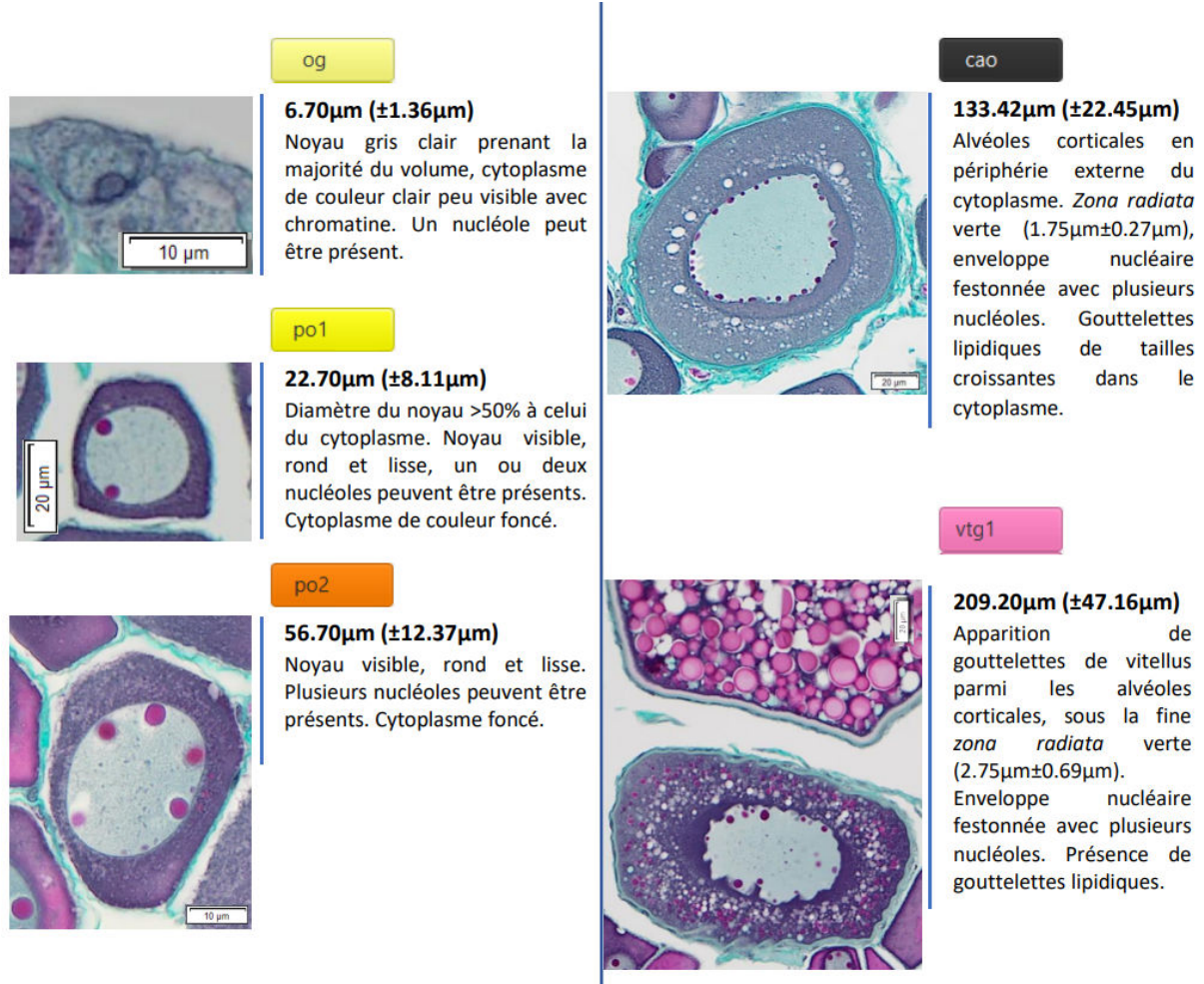


FIGURE 3.15 – Fiche résumant les critères d'identification des stades cellulaires de la lignée germinale femelle de la cardine à quatre taches (*L. boscii*). Avec : ovogonie (**og**), ovocytes primaires stade 1 (**po1**), ovocytes primaires stade 2 (**po2**), ovocytes à alvéoles corticales (**cao**) et ovocytes en vitellogenèse (**vtg**)

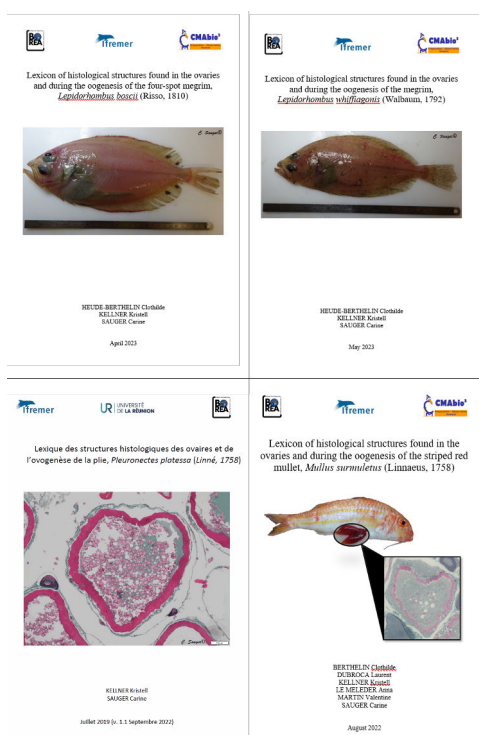
Publications 4 à 7 Volume II

Titres :

- ✧ Lexique des structures histologiques des ovaires et de l'ovogenèse de la plie, *Pleuronectes platessa* Linnaeus, 1758. **Publication 4**
- ✧ Lexique des structures histologiques retrouvées dans les ovaires et lors de l'ovogenèse du rouget barbet de roche, *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758. **Publication 5**
- ✧ Lexique des structures histologiques retrouvées chez la cardine franche, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792). **Publication 6**
- ✧ Lexique des structures histologiques retrouvées chez la cardine à quatre taches, *Lepidorhombus boscii* (Risso, 1810). **Publication 7**

Résumé : Lexiques décrivant les différentes structures et stades cellulaires des lignées germinales retrouvées dans les ovaires des quatre espèces suivies : rouget barbet de roche (*Mullus surmuletus*), cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*), cardine à quatre taches (*Lepidorhombus boscii*) et plie (*Pleuronectes platessa*). Ces documents sont les référentiels pour l'identification des cellules des lignées germinales lors des lectures stéréologiques des lames ovariennes de chaque espèce.

Contribution : Création, conception et rédaction des documents avec prise des photos et mesures des cellules. Mises à jour et publication des différentes versions.



3.2 Validation de l’utilisation de l’histologie quantitative

3.2.1 Calibration inter-agents

Les résultats des calibrations entre agents lecteurs sont présentés dans l’Article 2 (Table 5, cf. page 154) pour la plie, l’Article 3 (Table 4, cf. page 184) pour le rouget barbet de roche et l’Article 4 (Table 5, cf. page 248) pour la cardine franche.

Les pourcentages d’accords des lames lues individuellement, pour la première lecture pour toutes les espèces, s’étendaient de 34.8% à 82.7% (ou un kappa de Fleiss allant de 50.2% à 83.3%). Pour la dernière lecture des 50 lames de calibration lues à travers les 3 espèces, le pourcentage d’accord entre agents s’étendaient de 57.6% à 95.8% (ou un kappa de Fleiss allant de 67.1% à 94.6%). Les valeurs plus basses retrouvées pour le rouget (première et dernière lectures comprises) par rapport aux résultats de calibration des deux autres espèces s’expliquent par la présence d’un lecteur novice peu familier des structures histologiques.

3.2.2 Homogénéité cellulaire

Les résultats vérifiant l’homogénéité cellulaire inter et intra-gonades sont présentés dans l’Article 2 (Figure 2 et Table A, cf. page 154) pour la plie, l’Article 3 (Tables 7-8 et Figures 8-9, cf. page 184) pour le rouget barbet de roche et l’Article 4 (Table 3 et Figure 1, cf. page 248) pour la cardine franche.

Pour *P. platessa*, les mêmes structures cellulaires ont été quantifiées entre les individus et entre les coupes ovariennes, sauf pour les ovogonies (**og**) et les follicules post-ovulatoires (**POF**).

Les pourcentages des structures cellulaires quantifiées dans les ovaires de *M. surmuletus* étaient les mêmes entre les individus échantillonnés, sauf pour la catégorie ovocyte en atresie α (**aoA**) et la lyse (**L**). Seuls les pourcentages de la paroi gonadique (**gw**) et les structures indéterminées (**U**) varient selon la position de la coupe dans l’ovaire alors que les **og**, **po1** et **aoA** ne varient pas.

Pour la cardine franche, les pourcentages des structures cellulaires quantifiées par la stéréologie étaient les mêmes entre les individus échantillonnés, sauf pour l’ovocyte en atresie β (**aoB**) et la lyse (**L**) qui n’étaient pas présents chez tous les individus. Les pourcentages d’ovocytes primaires stade 1 (**po1**) et d’ovocytes à alvéoles corticales (**cao**) ont montré des différences entre la position des sections.

3.3 Dynamique cellulaire de l'ovogenèse

3.3.1 La plie, *Pleuronectes platessa* Linnaeus, 1758

La dynamique cellulaire annuelle de la plie a été décrite dans l'Article 1 (p. 132) (SAUGER et al., 2023d). Les individus présentent des **ovocytes à alvéoles corticales (cao)** à partir de 19 cm, le **cao** étant la cellule germinale clé qui permet de classer les individus dans l'état sexuellement mature. Les individus échantillonnés de novembre à mars (Figure 3.16) présentent des **ovocytes en vitellogenèse (vtg)** en novembre, avec un début d'hydratation des ovocytes (**oih**) chez 15% des individus. En décembre, le pourcentage moyen d'**oih** augmente (35%), et la ponte a lieu entre décembre et janvier, signalée par la présence de **follicules post-ovulatoires (POF)** (38%) et le faible pourcentage d'**ovocytes en cours d'hydratation** et d'**ovocytes hydratés (ho)**. Le pourcentage de **POF** diminue de janvier à mars, et en mars une recrudescence d'**ovocytes en cours d'hydratation** et **ovocytes hydratés** est observée. On note également que sur l'ensemble de l'échantillonnage, les cellules précoces (**og, po1, po2**) sont présentes tout au long de l'année, leurs pourcentages moyens variant de 30% (décembre) à 60% (mars) sur l'ensemble des cellules germinales; les **cao** également sont observés toute l'année, leur pourcentage moyen variant de 10% (janvier) à 20% selon le mois.

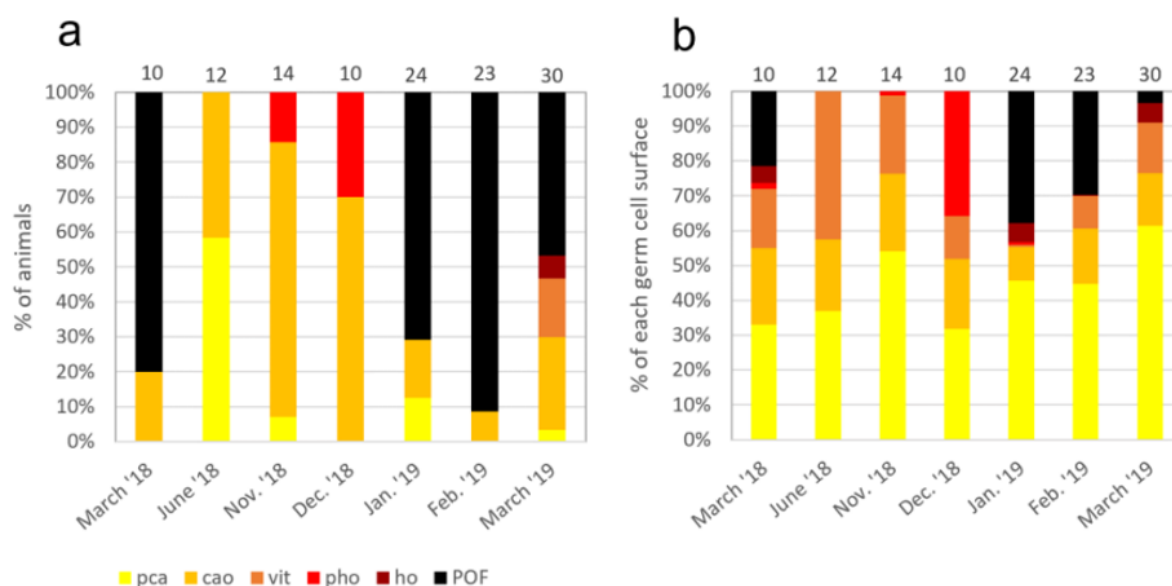


FIGURE 3.16 – **a** : Pour chaque mois échantillonné, pourcentages d'individus classés en fonction de la cellule germinale la plus avancée dans l'ovogenèse. **b** : Pour chaque mois, pourcentage moyen de surface des cellules de la lignée germinale retrouvées dans les ovaires de *P. platessa*. Avec **pca** les ovocytes primaires (**og, po1, po2**), **cao** les ovocytes à alvéoles corticales, **vit** les ovocytes en vitellogenèse, **pho** les ovocytes en cours d'hydratation, **ho** les ovocytes hydratés et **POF** les follicules post-ovulatoires. Figure tirée de SAUGER et al. (2023d)

3.3.2 Le rouget barbet de roche, *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758

Le cycle d'ovogenèse a été décrit en détail dans l'Article 3 (p. 184) pour le rouget barbet de roche provenant de deux stocks différents en Manche Est et dans le Golfe de Gascogne).

Dans les deux stocks, les ovogonies (**og**) et les ovocytes primaires (**po1** et **po2**) sont présents sur toute la période d'échantillonnage. Ils sont majoritaires en février, mars et de septembre jusqu'au début de la saison de reproduction suivante. Le pourcentage des ovocytes à alvéoles corticales (**cao**) augmente de janvier (17%) à avril (74%), un début de vitellogenèse (**vtg** = 6%) est observé à cette date. En mai et juillet, les **vtg** sont majoritaires. On observe également des ovocytes en cours d'hydratation et des ovocytes hydratés et un faible pourcentage de **POF** (<5%). Des signes d'atrésie sont également visibles, avec un pourcentage moyen d'ovocyte en atrésie α (**aoA**) entre 1 et 14%.

Avant avril, la majorité des individus récoltés a été classée en A (immature); ils mesuraient entre 20 et 33 cm (Figure 3.17). En avril, les individus entre 20 et 24 cm ont tous été classés en B (développement) et en mai 100% des individus entre 24 et 30 cm étaient en ponte dans le Golfe de Gascogne contre 21% des individus en Manche Est. L'échantillonnage de juin était constitué uniquement d'individus immatures de petites tailles (entre 15 et 21 cm de longueur). Après un deuxième événement de ponte en juillet, 136/140 poissons échantillonnés entre août et décembre, mesurant entre 12 et 36 cm, ont été classés en phase A.

Ces résultats ont mis en avant la problématique du cycle de reproduction rapide de *M. surmuletus* : juste après la ponte, les **POF** ne sont plus visibles et les individus ne sont donc pas classés comme ils devraient l'être, en phase de Régression/Régénération (D).

Une méthode d'apprentissage non supervisé par *Clustering* hiérarchique a été appliquée sur les données stéréologiques, afin de déterminer des critères de différenciation des individus classés en A en dehors de la période du frai (n=216). Cette analyse a montré que les **ldo** sont les types cellulaires permettant de différencier les individus immatures (phase A) des individus qui seraient potentiellement en développement pour la prochaine saison de reproduction (phase dénommée ici pfB).

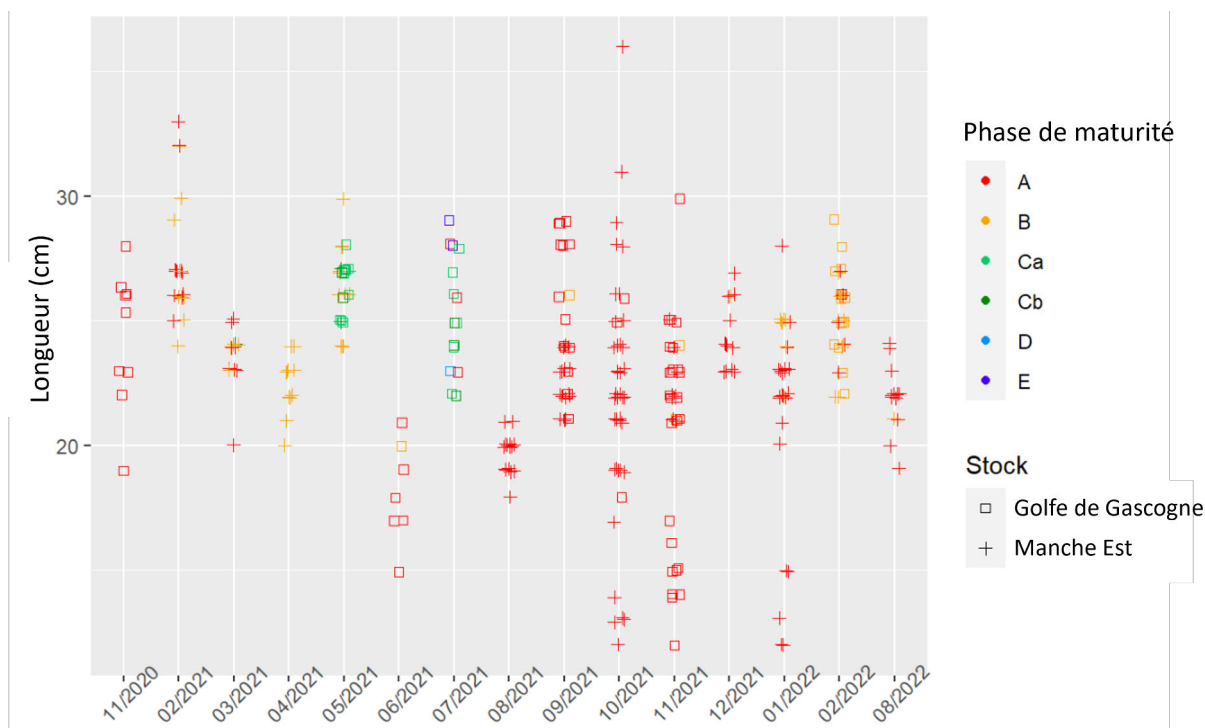


FIGURE 3.17 – Femelles rouget barbet de roche (*M. surmuletus*) classées en fonction de la date d'échantillonnage et de la longueur (cm). Les ronds indiquent les individus provenant du stock de Manche Est et les carrés symbolisent les individus du stock Golfe de Gascogne. Le code couleur indique les phases de maturité sexuelle déterminées par analyse stéréologique, avec : Immature (A), Développement (B), En ponte (Ca), En capacité de ponte (Cb), Régression / Régénération (D) et Omission de ponte (E). Figure tirée de [Article 3](#) (Figure 3, p. 184)

3.3.3 La cardine franche, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792)

La [Figure 3.18](#) présente les pourcentages moyens des différentes cellules de la lignée germinale retrouvées chez les femelles *L. whiffiagonis*, échantillonnées lors de cette étude. Les prélèvements de novembre à décembre 2021 montrent une diminution des **cao** et une augmentation des **vtg**, avec en moyenne 74% de la surface des gonades occupée par des **vtg**. En janvier ces **vtg** ont mûri en ovocytes en cours d'hydratation (**oih**). La présence de **POF** et d'ovocytes hydratés (**ho**) pour les mois de février et mars signale des événements de ponte. Ces **POF** sont présents de février à juin en pourcentages variables d'une année à l'autre. En mars, le pourcentage de **POF** diminue à moins de 1%, alors que les ovocytes primaires (**po1**, **po2** et **ldo**) sont majoritaires dans l'ovaire et le resteront jusqu'au début de la saison de reproduction suivante. La présence d'atrésie a aussi été notée dès le mois de janvier, avec les pourcentages d'ovocyte en atrésie α maximaux en février et mars (>10%), sans que les individus n'aient été classés en omission de ponte (E). Le pourcentage d'atrésie diminue ensuite jusqu'en juillet.

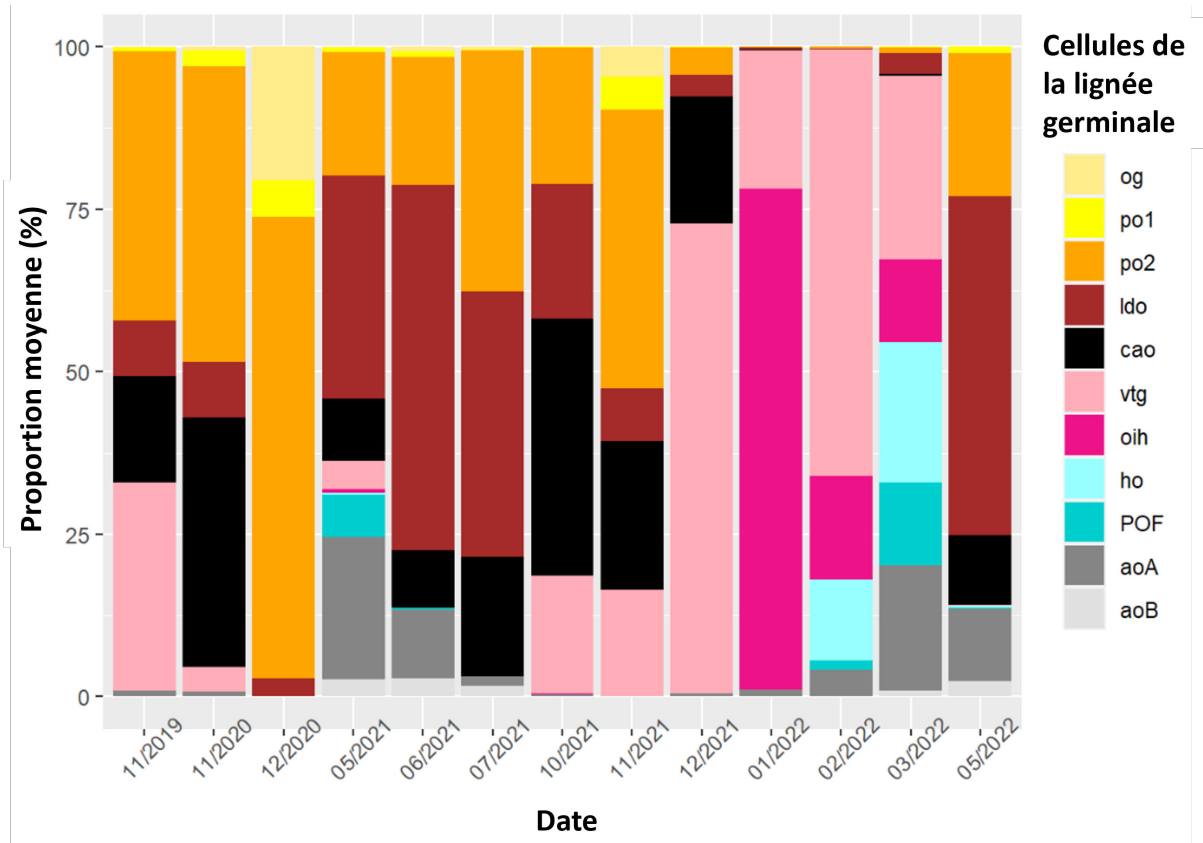


FIGURE 3.18 – Pourcentages moyens (%) des structures cellulaires de la lignée germinale retrouvées dans les sections ovariennes médianes de cardine franche (*L. whiffiagonis*) échantillonnées mensuellement, avec : ovogonie (og), ovocytes primaires stade 1 (po1), ovocytes primaires stade 2 (po2), ovocytes avec gouttelettes lipidiques (ldo), ovocytes à alvéoles corticales (cao), ovocytes en vitellogenèse (vtg), ovocytes en cours d'hydratation (oih), ovocytes hydratés (ho), follicules post-ovulatoires (POF), ovocyte en atresie α (aoA), ovocyte en atresie β (aoB)

Les individus *L. whiffiagonis* (classés par phases de maturité en stéréologie) sont présentés en Figure 3.19 en fonction de leur longueur pour chaque mois d'échantillonnage. Trois périodes ont été identifiées sur la Figure 3.18 à la Figure 3.19 : 1- La période du frai, de janvier à mars, concerne des femelles de longueurs comprises entre 28 et 52 cm. Tous les individus échantillonnés en janvier ont été classés en capacité de ponte (Cb), de par la présence d'ovocytes en cours d'hydratation bien qu'ils n'aient pas encore émis leurs ovocytes (absence de POF). Au moins un évènement de ponte a eu lieu en février, avec 87% des individus classés en Ca (individus en ponte). Dès mars, les individus sont classés soit en Ca soit en phase de régression/régénération (D). 2- La période pré-ponte, d'octobre à décembre, inclut des individus de 10 à 64 cm qui ont été classés soit en phase (A) immature, soit en phase B (développement), avec la présence d'ovocytes en vitellogenèse signalant le début de la saison de reproduction. 3- Après la période du frai,

soit de mai à juillet, les poissons récoltés mesuraient entre 30 et 56 cm. Cette période est une période de transition durant laquelle les individus sont majoritairement classés en régression/régénération (D). Toutefois, certains spécimens ont été classés en Ca, B et A.

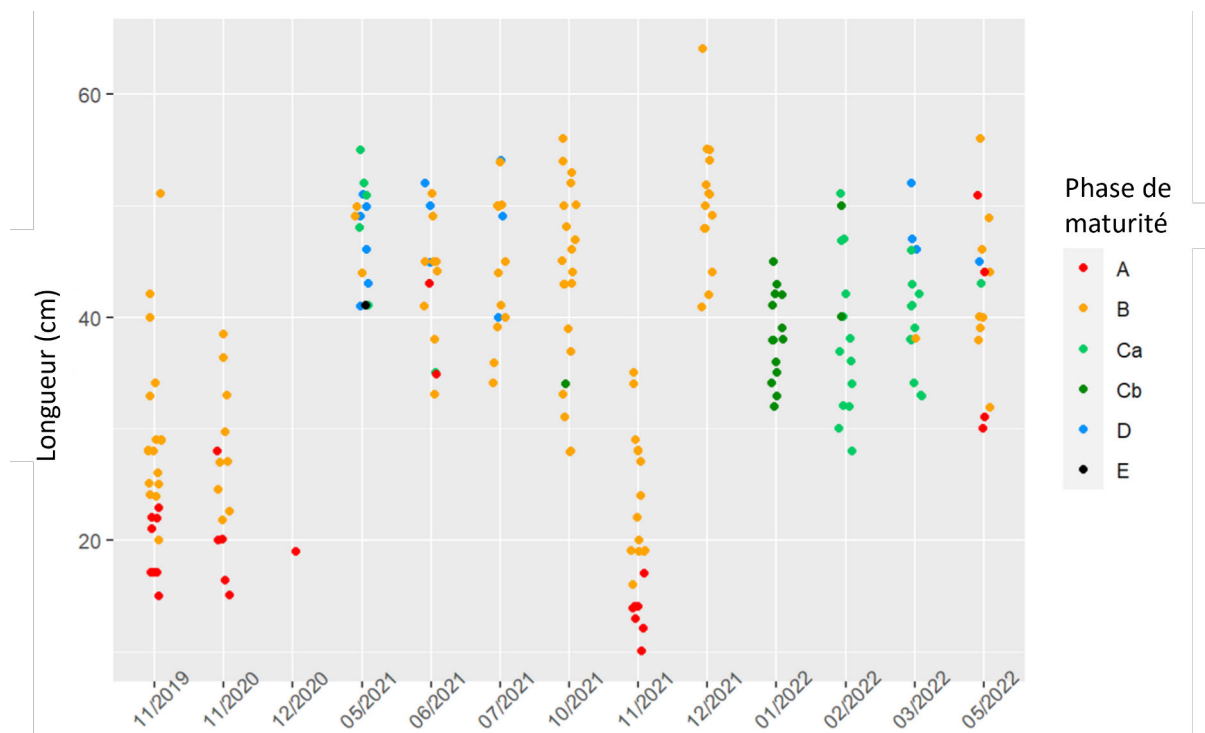


FIGURE 3.19 – Femelles cardines franches (*L. whiffiagonis*, $n = 202$) classées en fonction de leur date d'échantillonnage et de leur longueur (cm). Le code couleur indique leurs phases de maturité sexuelle déterminées par la stéréologie, avec : Immature (A), Développement (B), En ponte (Ca), En capacité de ponte (Cb), Régression / Régénération (D) et Omission de ponte (E)

3.4 Comparaison des méthodes

3.4.1 La plie, *Pleuronectes platessa* Linnaeus, 1758

En associant les photographies d'ovaires à leur section histologique, il a été possible d'affiner les critères macroscopiques pour l'identification des phases de maturité, et surtout de valider ces dernières. La Figure 3.20 permet de visualiser l'aspect macroscopique des ovaires en s'appuyant sur des phases de maturité validées par l'observation des coupes histologiques chez la plie. Dans l'Article 2 (Table 6, p. 154), les stades déterminés en stéréologie ont été utilisés comme références et il apparaît que les individus classés sur la base des critères macroscopiques étaient correctement classés pour 34.6% des immatures (A), 32% des individus en développement (B), 66.6% des individus en ponte (C) et 80.4% des individus en régression/régénération (D). De plus, 57.1% des individus classés en A

étaient sexuellement matures (B) et 45.2% des individus classés en développement (B) avaient déjà pondu (D). Enfin, un individu en omission de ponte a pu être identifié.

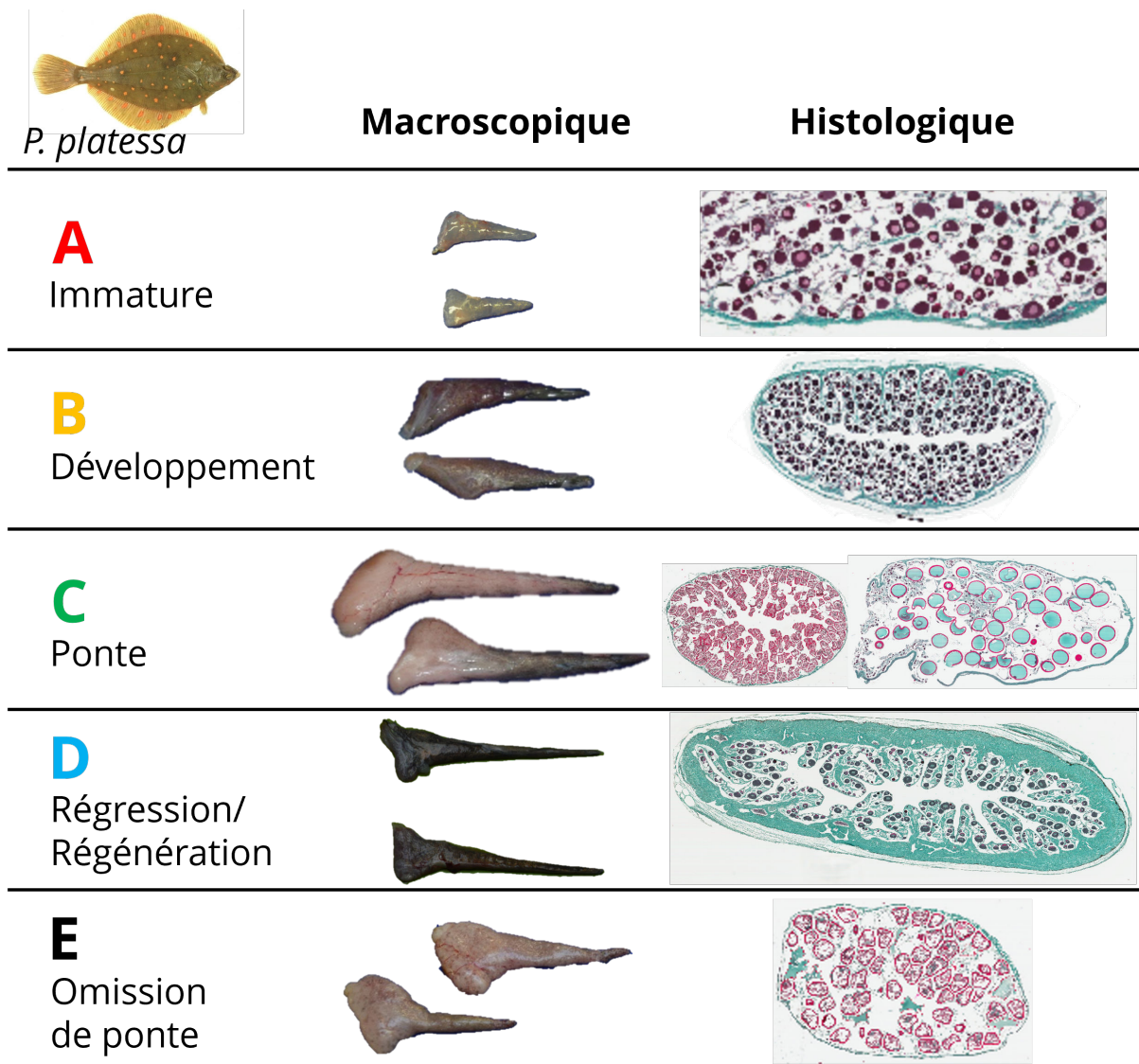


FIGURE 3.20 – Morphologie et histologie de l’ovaire de la plie (*P. platessa*) à différentes phases de maturité avec : Immature (A), Développement (B), En ponte (Ca), En capacité de ponte (Cb), Régression / Régénération (D) et Omission de ponte (E)

Ces erreurs de classement par l’approche macroscopique ont eu inévitablement un impact sur le calcul des L_{50} et A_{50} , comme le montre le [Tableau 3.5](#).

TABLEAU 3.5 – Comparaison de la longueur (L_{50}) et l'âge (A_{50}) des individus *P. platessa* échantillonnés pendant toute la durée de l'étude ($n=151$) en prenant en compte la méthode macroscopique (Macroscopie) ou les comptages stéréologiques (Stéréologie). Avec r^2 le coefficient de détermination

	L_{50}	A_{50}
Macroscopie	28.6 cm ($r^2=0.18$)	3.7 ans ($r^2=0.2$)
Stéréologie	20.6 cm ($r^2=0.70$)	1.3 ans ($r^2=0.48$)

3.4.2 Le rouget barbet de roche, *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758

La mise en parallèle des images d'ovaires de *M. surmuletus* et des coupes histologiques (Figure 3.21) a permis de valider le classement par la méthode stéréologique des phases B, C et E. Le rouget barbet de roche étant une espèce qui présente des pontes successives lors d'une même saison de reproduction, les sous-stades Ca (individus encore en capacité de pondre et ayant déjà participé à au moins un évènement de ponte) et Cb (individus en capacité de pondre mais n'ayant pas encore participé à un premier évènement de ponte) ont été pris en compte en stéréologie. Visuellement, aucun critère ne permet de séparer les deux sous-phases, donc seule l'information en ponte (C) est indiquée pour la méthode macroscopique. Pour les individus classés en A (immature) en dehors de la saison de reproduction, la vascularisation rapide des ovaires chez cette espèce ne permettait pas une identification assurée de la phase par critères macroscopiques. Cela a mené à l'application d'un *Clustering* sur les individus classés immatures en dehors de la saison de reproduction.

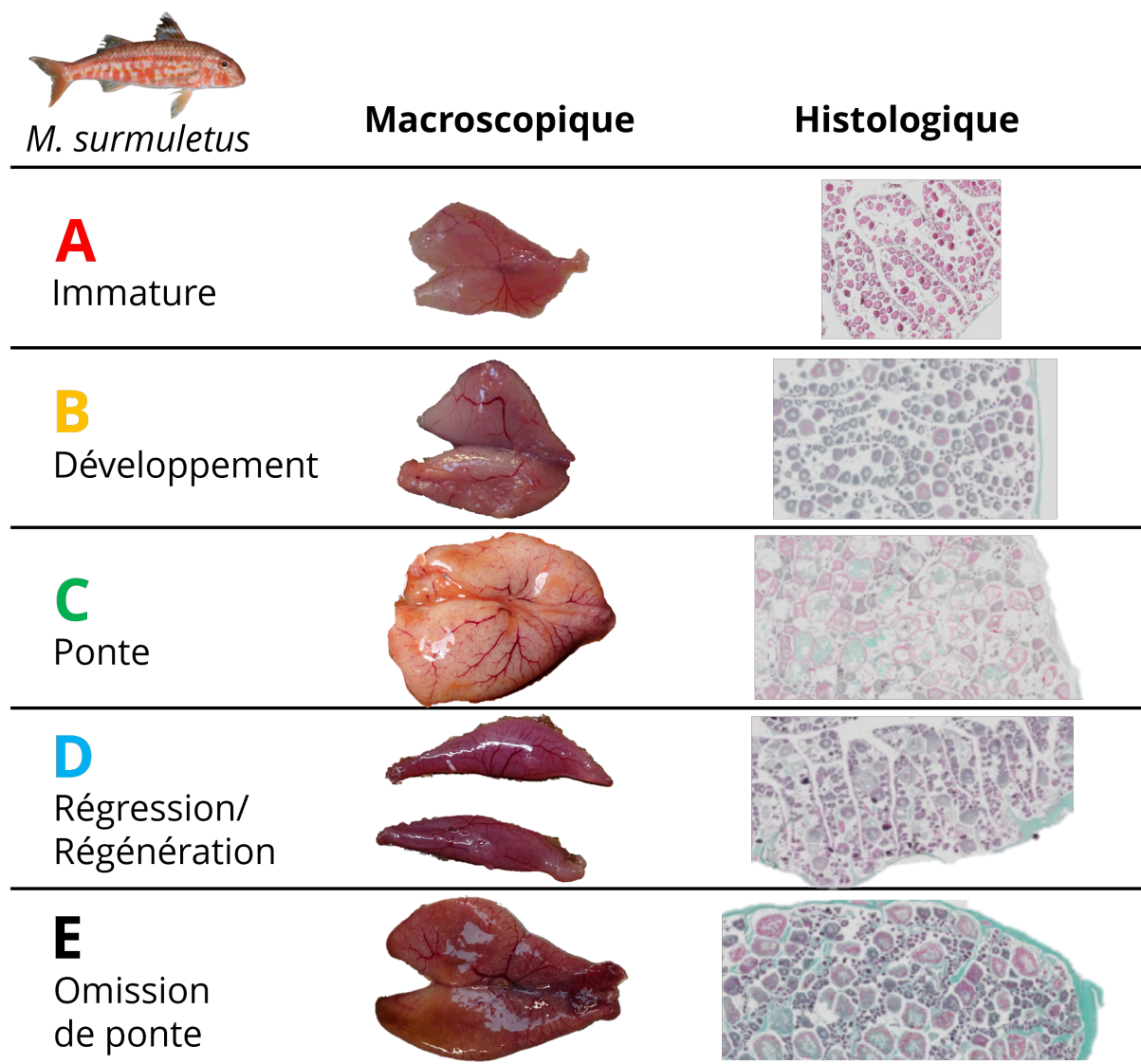


FIGURE 3.21 – Morphologie et histologie de l'ovaire du rouget barbet de roche (*M. surmuletus*) à différentes phases de maturité avec : Immature (A), Développement (B), En ponte (Ca), En capacité de ponte (Cb), Régression / Régénération (D) et Omission de ponte (E)

Le [Tableau 3.6](#) présente les L_{50} et A_{50} pour *M. surmuletus*, prenant en compte les données maturité en fonction des différentes méthodes. La méthode macroscopique suggère une valeur de L_{50} à 18 cm, avec une reproduction lors de la première année, alors que la méthode stéréologique estime une L_{50} de 26.7 cm avec une première reproduction à deux ans. En reprenant les données des individus immatures reclassés par *Clustering*, la L_{50} et l' A_{50} ont été recalculés en incluant les pFB parmi individus sexuellement matures. Une L_{50} de 22.9 cm a donc été estimée, avec une première reproduction lors de la deuxième année.

TABLEAU 3.6 – Comparaison de la longueur (L_{50}) et l'âge (A_{50}) auxquels 50% de la population est sexuellement mature pour les individus femelles rouget barbet de roche (*M. surmuletus*) échantillonnés pendant toute la durée de l'étude en prenant en compte les résultats obtenus avec la méthode macroscopique (Macroscopie), les comptages stéréologiques (Stéréologie), les individus reclassés en pfB (*Clustering* sans pfB) et en enlevant les individus reclassés en pfB (*Clustering* sans pfB). Avec r^2 le coefficient de détermination

	L_{50}	A_{50}
Macroscopie	18.0 cm ($r^2=0.3$)	0.3 ans ($r^2=0.2$)
Stéréologie	26.7 cm ($r^2=0.18$)	2.2 ans ($r^2=0.36$)
<i>Clustering</i> avec pfB	22.9 cm ($r^2=0.15$)	1.5 ans ($r^2=0.21$)
<i>Clustering</i> sans pfB	24.8 cm ($r^2=0.27$)	1.9 ans ($r^2=0.42$)

3.4.3 La cardine franche, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792)

L'histologie quantitative a permis de valider les images utilisées pour les fiches d'aide à l'identification macroscopique (Figure 3.22). En revanche, les critères préconisés par le CIEM n'ont pas permis de différencier correctement les deux sous-phases Ca et Cb qui ont donc été regroupées en C.

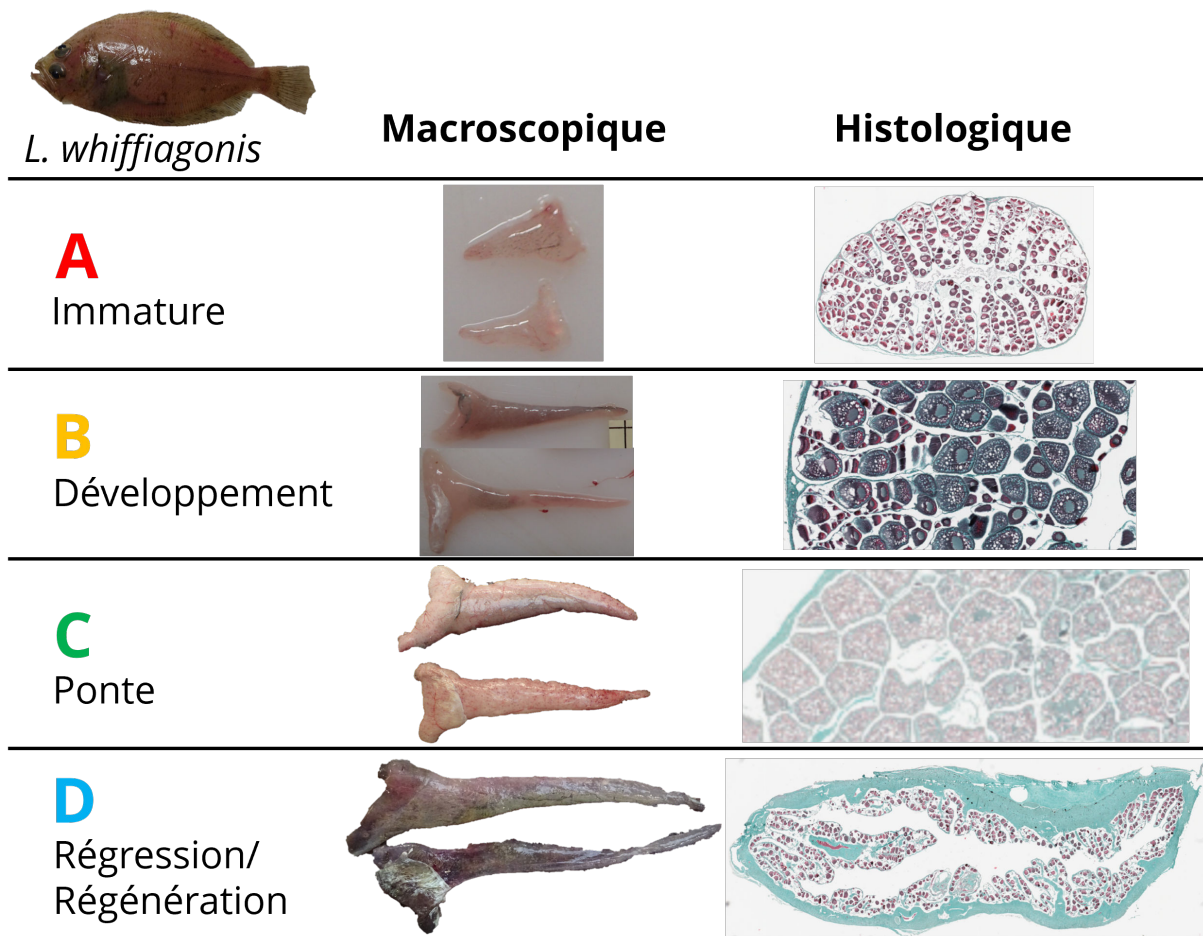


FIGURE 3.22 – Morphologie et histologie de l’ovaire de la cardine franche (*L. whiffiagonis*) à différentes phases de maturité avec : Immature (A), Développement (B), En ponte ou en capacité de ponte (C) et Régression / Régénération (D)

En comparant les phases de maturité déterminées par la méthode macroscopique ou stéréologique (Tableau 3.7), les mêmes résultats sont obtenus pour 74.1% des individus immatures (A), 40.3% des individus en développement (B), 42.9% des individus en ponte (Ca et Cb groupés) et 87.5% des individus ayant pondu (D). Le Tableau 3.7 souligne la difficulté à identifier les sous-phases, notamment pour 17 individus (sur 18) qui étaient en capacité de pondre qui n’avaient pas encore pondu (Cb). Ces poissons ont été classés en B par la méthode macroscopique, mettant en évidence la difficulté à distinguer les individus en transition entre la phase en développement (B) de ceux qui ont émis les gamètes au moins une fois (Ca). Un individu en omission de ponte (E) a été identifié par la stéréologie mais pas par la méthode macroscopique.

TABLEAU 3.7 – Matrice de confusion comparant les phases de maturité déterminées d’après la méthode macroscopique (ligne) et la méthode stéréologique (colonne). $n=202$ individus femelles cardine franche (*L. whiffiagonis*). Les Valeurs encadrées correspondent au nombre d’individus classés dans les mêmes phases par les deux méthodes, avec Immature (A), Développement (B), Ponte (C), Régression / Régénération (D) et Omission de ponte (E)

	A	B	C	D
A	20	1	0	6
B	14	44	0	51
Ca	0	1	20	10
Cb	0	17	1	0
D	0	0	2	14
E	0	0	0	1

Les longueurs (L_{50}) et âges (A_{50}) auxquels 50% de la population est sexuellement mature sont présentés en [Tableau 3.8](#) pour tous les individus échantillonnés lors de l’étude. Des L_{50} et A_{50} ont aussi été calculés pour les individus échantillonnés pendant la saison de reproduction (octobre à mars). Pour ces deux périodes, les données obtenues par la méthode macroscopique permet d’estimer une L_{50} à 24 cm pour une première participation à la ponte à 3 ans alors que la méthode stéréologique donne une L_{50} à 20 cm pour un A_{50} à deux ans. La prise en compte de la saison de reproduction (voir [Figure 3.24](#) en annexe) n’a pas eu d’effet sur l’estimation de ces deux indices.

TABLEAU 3.8 – Longueur (L_{50}) et âge (A_{50}) auxquels 50% de la population est sexuellement mature pour les femelles cardine franche (*L. whiffiagonis*) échantillonnés sur l’année ($n=202$) ou pendant la période du frai (octobre à mars, $n=142$), obtenus par méthode macroscopique (macro) ou stéréologique (stéreo). Avec r^2 le coefficient de détermination

	Toutes périodes (n=202)	Saison de reproduction (n=142)
L_{50} macro	24.1 cm ($r^2=0.74$)	24.2 cm ($r^2=0.71$)
L_{50} stéreo	19.8 cm ($r^2=0.47$)	20.0 cm ($r^2=0.73$)
A_{50} macro	3.0 ans ($r^2=0.74$)	3.0 ans ($r^2=0.72$)
A_{50} stéreo	2.2 ans ($r^2=0.46$)	2.1 ans ($r^2=0.76$)

3.5 Mise à disposition des données

La numérisation des sections ovariennes sur lames histologiques permet l'analyse d'images en s'appuyant sur des logiciels assurant une bonne précision de mesure des structures cellulaires au micromètres près. De plus, la numérisation des lames histologiques facilite leur partage *via* les plateformes de stockage de données :

- ✧ Données plie : <https://zenodo.org/records/3463296>
- ✧ Données rouget barbet de roche du Golfe de Gascogne : <https://zenodo.org/record/8060309>
- ✧ Données rouget barbet de roche de la Manche : <https://zenodo.org/record/8060356>
- ✧ Données cardine franche : <https://zenodo.org/records/10040995>
- ✧ Données cardine à quatre taches : *À venir*

Publication 8 Volume II

Titre : Protocole de lectures stéréologiques pour l'utilisation d'histologie quantitative dans la détermination des phases de maturité sexuelle chez les ovaires de poissons

Citation : Dubroca, L., Elie, N., Heude-Berthelin, C., Kellner, K., Le Meleder, A., Lepoittevin, M., Martin, V., Nivet, T., Sauger, C., Villain-Naud, N. (2023) «Stereology reading protocol when using quantitative histology for the determination of sexual maturity in fish ovaries». DOI : <https://doi.org/10.13155/75173>

Résumé : Protocole décrivant l'utilisation du logiciel QuPath et les règles à appliquer lors des lectures stéréologiques afin d'assurer la reproductibilité pour la calibration. Protocole en anglais disponible en accès libre sur [Archimer](#).

Contribution : Création, conception et rédaction du document avec prise des photos. Mises à jours et publication des différentes versions et participation à l'élaboration des règles de lectures.



Système d'Informations Halieutiques
Action Paramètres biologiques

Laurent DUBROCA¹
Nicolas ELIE³
Clothilde HEUDE-BERTHELIN²
Kristell KELLNER²
Anna LE MELEDER¹
Mélanie LEPOITTEVIN²
Valentine MARTIN¹
Timothé NIVET¹
Carine SAUGER¹
Nadège VILLAIN-NAUD²

SIH
Système
d'Informations
Halieutiques



May 2023 – V.3.4

1 : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, IFREMER, Laboratoire Ressources Halieutiques de Port-en-Bessin, 14520 Port-en-Bessin-Huppain, France.
2 : University of Caen Normandy, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) MNHN, Sorbonne Université, UCN, CNRS-7208, IRD, UA, team EMERGE, esplanade de la Paix 14032 Caen, France
3 : Normandie Univ, UNICAEN, SF 4206 ICORE, CMABIO3, 14000 Caen, France.

Stereology reading protocol
when using quantitative
histology for the determination
of sexual maturity in fish
ovaries

4 Discussion

4.1 Méthode macroscopique

Comme vu dans le [Chapitre 2](#), la phase de maturité est définie par l'observation de critères macroscopiques des gonades. L'[Article 1](#) (p. 132) met en parallèle les phases de maturité déterminées par les critères macroscopiques et par les critères histologiques sur la base des types cellulaires observés chez *P. platessa*. Cette étude comparative met en évidence de nombreuses erreurs de classements avec la détermination macroscopique et souligne la difficulté à classer certains individus. Cela est particulièrement vrai pour des individus classés en A qui relèvent pourtant de la classe B, ou des individus ayant déjà participé à la ponte (D) classés par erreur en phase B. Ce défaut de classement s'explique par la subjectivité des critères macroscopiques ou par l'impossibilité d'identifier certaines phases à l'œil nu. Ainsi, seule l'observation de [follicules post-ovulatoires \(POF\)](#) sur lames histologiques atteste de l'émission d'[ovocytes hydratés \(ho\)](#) et donc de la ponte. De la même façon, les 50% d'atrésie sur lesquels s'appuie l'identification de la phase omission de ponte (E) (BROWN-PETERSON et al., 2011 ; ICES, 2014) relèvent non seulement de l'observation cellulaire mais également de la quantification de ces structures, justifiant de l'apport de la méthode stéréologique.

Nous avons montré les disparités importantes entre agents au niveau de la lecture de ces phases. Pour *P. platessa*, GERRITSEN et al. (2006) avaient également montré de forts taux de désaccords entre agents pour l'identification des phases A et B (mais un taux d'accord plus élevé pour l'identification des individus ayant pondu) soulignant ainsi clairement les biais de lecture possibles dans cet exercice. Cette difficulté d'identification des phases a nécessairement un impact sur la fiabilité des données calculées, notamment sur les L_{50} et A_{50} et par conséquent les indicateurs utilisés pour la gestion des stocks, tels que la biomasse des reproducteurs ou la longueur minimale de capture, s'en trouvent affectés. L'approche stéréologique, permettant de quantifier les structures cellulaires ovariennes, a été développée pour produire un classement plus objectif des individus dans les phases de maturité.

4.2 L'histologie

Malgré le fait que l'histologie permette de garder l'organe dans un état aussi proche que possible de son aspect "vivant", les traitements chimiques ont un impact sur les tissus. Les étapes de déshydratation et d'inclusion des pièces dans la paraffine provoquent la rétractation des tissus (GABE, 1968), biaisant ainsi les mesures des diamètres d'ovocytes et d'épaisseurs de *zona radiata* par rapport aux échantillons frais. Par ailleurs, le choix d'utiliser un trichrome assure un contraste permettant l'examen précis des différentes

structures ovariennes. Cette coloration joue un rôle important dans l'identification des structures cellulaires lors des lectures stéréologiques et doit être mise en place avec rigueur pour assurer la reproductibilité de la coloration.

4.3 Description des phases cellulaires

La description des structures cellulaires ovariennes a été faite pour les quatre espèces au travers des lexiques (**Publications 4 à 7 du Volume II**). Ces lexiques répondent à 2 objectifs : une mise à jour des connaissances sur l'ovogenèse de ces espèces et la mise en place de critères objectifs d'identification des phases.

Pour *P. platessa*, dont les particularités de l'ovogenèse ont été décrites dans l'[Article 1](#) (p. 132), les gonades mâles et femelles avaient déjà fait l'objet de plusieurs études par BARR (1963a,b,c), MIOSSEC (1984) et BRULE (1987). Pour *M. surmuletus*, l'ovogenèse n'était pas documentée et pour les cardines, ROBSON (2004) avait déjà décrit l'ovogenèse de la cardine franche et UGRIN et al. (2023) celle de la cardine à quatre taches.

Une fois les stades cellulaires identifiés, il a été possible, de classer les individus dans une phase de maturité. L'identification des phases de maturité sur la base de critères histologiques portant sur la gonade femelle est basée sur le stade cellulaire le plus avancé identifié dans la coupe. L'identification de ce stade requiert un certain niveau d'expertise pour repérer et identifier les structures pertinentes en appréciant la section dans son ensemble. L'[Article 2](#) (p. 154) met en place chez la plie les outils de classement sur la base de l'analyse stéréologique (quantitative), et cette approche a été généralisée aux trois autres espèces dans cette thèse.

4.4 La méthode de stéréologie

L'analyse stéréologique assure une précision et une estimation non biaisée des structures quantifiées (BADDELEY et al., 2004). Toutefois, parce que cette méthode est chronophage (MATHIEU et al., 1981 ; WEST, 1990), un compromis doit être trouvé entre un temps d'observation acceptable (*i.e.* le temps passé sur un échantillon) et un niveau de précision satisfaisant. Afin de faciliter la mise en place de cette méthode, la numérisation des lames permet non seulement de s'affranchir de l'utilisation d'un microscope mais surtout de les analyser par un programme adapté. Le format choisi a permis le partage de ces données sous Zenodo. Alors que la majorité des études en stéréologie ovarienne effectue les comptages sur les portions de sections [tableau 3.2](#), nous avons fait le choix pour les espèces suivies de prendre en compte la totalité de la section, incluant la paroi gonadique ainsi que la lumière ovarienne. Le choix d'un grossissement x20, dépendant avant tout du matériel disponible au début de l'étude, a eu des conséquences sur l'identification des

structures de petits diamètres (notamment **og**) pour lesquelles la résolution n’était pas toujours suffisante pour une reconnaissance certaine.

Il existe de multiples programmes (payants ou gratuits) pour l’analyse d’images et de sections histologiques, y compris des logiciels permettant la mise en place de grilles stéréologiques ou encore le détournage automatique ou manuel des structures cellulaires pour l’estimation de leurs surfaces et leurs diamètres. Lors du projet *MATurité Objective des poissons par l’histologie quantitative* (MATO), le logiciel QuPath a été choisi pour sa facilité d’utilisation (il ne nécessite pas un matériel informatique lourd pour l’analyse des images), son accessibilité (*open source*) et surtout la flexibilité de ses outils d’analyse d’images (il permet de développer des scripts de traitement pour chaque espèce à l’étude). C’est un logiciel gratuit, *open source*, multi-plateforme, traitant les images de lames sous différents bio-formats (BANKHEAD et al., 2017).

Pour le choix des grilles de lecture, nous avons opté pour un échantillonnage régulier de 500 à 600 points (sondes). La règle de GUNDERSEN et al. (1987) stipule qu’il faut au moins 150 points par élément biologique pour garantir une incertitude relative (entre 3% et 10%) par élément permettant une estimation fiable de la fraction moyenne de l’élément. Au vu du nombre de structures à quantifier (plus de 5 structures cellulaires différentes sur les lames ovariennes), 500 à 600 points ne sont pas suffisants pour respecter cette règle, mais nous étions contraints de limiter le nombre de points pour que la lecture manuelle reste possible dans un temps raisonnable. En contre partie, cet effort d’échantillonnage permet tout de même de quantifier correctement la fraction occupée par chaque structure sur la lame histologique.

4.4.1 Calibration inter-agents

La méthodologie utilisée pour la calibration et la vérification de l’homogénéité cellulaire a été décrite dans SAUGER et al. (2020). Cet exercice entre agents possédant des niveaux d’expérience et de connaissance variables sur les structures histologiques ovariennes a permis de valider la qualité des lexiques descriptifs et du protocole de lecture stéréologique. Le même protocole a été utilisé pour les 4 espèces à l’étude, assurant ainsi la reproductibilité de la méthode de lecture. Les règles concernant l’utilisation de la catégorie **indéterminées (U)** permettent d’écarter les objets dont l’identification est incertaine. Une base de données de qualité est un des points clés pour le travail d’automatisation des lectures présenté dans le [Chapitre 4](#). Enfin, la calibration entre les agents qui effectueront les lectures permet le partage de cette tâche et améliore l’homogénéité des résultats.

4.4.2 Homogénéité

La vérification de l'homogénéité cellulaire avait pour objectif la validation de la représentativité de la section choisie par rapport à l'ovaire entier.

L'étude de la représentativité des types cellulaires sur la coupe a montré que les structures de petits diamètres (**og**) avaient tendance à être sous représentées, notamment en présence de structures plus grosses (tel qu'un ovocyte en fin de vitellogenèse par exemple chez la plie). Les trois espèces à l'étude présentant plusieurs cohortes d'ovocytes de diamètres différents quelle que soit la période, cette sous représentativité des petites structures est à prendre en considération. Pour pallier cela, il serait possible d'utiliser une double grille, la première pour quantifier les cellules de grands diamètres et la deuxième, avec une grille régulière de pas plus réduits, pour quantifier les cellules de petits diamètres (WEIBEL, 1979) mais cette démarche deviendrait nécessairement plus longue à mettre en oeuvre. Par ailleurs, après vérification pour les trois espèces (*P. platessa*, *M. surmuletus*, et *L. whiffiagonis*), **og** et **po1** étaient sous-représentés mais les structures **ldo** et **po2** ne l'étaient pas. Ainsi, la sous-représentativité sur les deux stades cellulaires précoces n'impacte pas le classement de l'individu dans une phase de maturité.

L'échantillonnage d'individus en ciblant la saison de reproduction (à partir du début de la vitellogenèse) permet de limiter la variabilité de la présence de structures rares au sein de l'ovaire ou pouvant être présentes sur de très courtes périodes chez quelques individus, comme observés chez la cardine franche avec des ovocytes émis en atrésie (**aoB**) et de la **L** ou la plie avec les **POF**. Par ailleurs, il a été observé que même en vérifiant l'homogénéité cellulaire chez des individus se trouvant dans des phases de maturité différentes, les pourcentages de cellules retrouvés entre individus n'ont pas été influencés.

Le nombre important de lames analysées (entre 90 et 180 en fonction de l'espèce) a permis d'obtenir des résultats montrant que les proportions cellulaires sont identiques pour des individus de mêmes phases de maturité, confirmant que le plan d'échantillonnage était adapté aux objectifs de l'étude : un échantillonnage de plus de 15 individus par mois n'aurait pas changé les pourcentages de structures cellulaires retrouvées mensuellement chez les trois espèces.

4.5 La dynamique cellulaire

4.5.1 La plie, *Pleuronectes platessa* Linnaeus, 1758

L'analyse des types cellulaires pour *P. platessa* a mis en évidence la présence de plusieurs cohortes d'ovocytes pour chaque mois échantillonné, avec en moyenne au moins 30% des cellules de la lignée germinale étant des ovocytes primaires. Cette organisation reflète le développement groupe synchrone de ce *batch spawner* (BARR, 1963a ; MURUA

et al., 2003 ; RIJNSDORP, 1989). En Manche Est, la vitellogenèse démarre dès novembre pour une ponte en décembre et janvier, de façon similaire aux plies de la Mer du Nord (BROMLEY, 2000). En mars, un nouvel évènement de maturation est initié, avec présence d'ovocytes hydratés (**ho**) laissant supposer une possible ponte en avril, comme l'avait suggéré RIJNSDORP (1989) pour la zone Mer du Nord. Un échantillonnage couvrant les périodes d'avril à juillet permettrait de statuer sur ce possible deuxième évènement et d'assurer une couverture complète des périodes du frai de la plie.

4.5.2 Le rouget barbet de roche, *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758

M. surmuletus est également un *batch spawner* avec une dynamique ovocytaire groupe synchrone. En effet, on observe plusieurs cohortes d'ovocytes de stades différents présents tout au long de la période d'échantillonnage. Cette espèce a une très courte période du frai avec au moins deux évènements d'émission d'ovocytes en mai et juillet, en accord avec les observations de N'DA et al. (1993) et DESBROSSES (1933). La comparaison des périodes du frai entre les deux stocks étudiés suggère que les individus de Manche-Est pondent 1 mois après ceux du Golfe de Gascogne (ponte en mai). Un échantillonnage plus conséquent dans cette période permettra de valider cette hypothèse également citée par MAHÉ et al. (2013, 2005).

La particularité du rouget est le fort taux d'atrésie constaté après la ponte, qui avait aussi été observé par N'DA et al. (1993), signalant une période de régression très courte avec la disparition des **POF** avant septembre. Par ailleurs, en dehors de la saison de reproduction, les grands individus (>20 cm) ne présentent que des ovocytes primaires, ce qui conduit à les classer en phase A (immature) alors qu'ils se sont déjà probablement reproduits. Cette classification présente donc des incohérences, avec des individus de 2 et 3 ans classés de façon erronée en A juste avant la saison de reproduction, qui doivent être reclassés.

Chez cette espèce, des ovocytes primaires présentant des gouttelettes lipidiques sont observés notamment chez des individus âgés de 2 ans et mesurant au moins 21 cm après la saison de ponte. Les lipides ovocytaires sont une source énergétique importante dans le vitellus mais ils jouent aussi un rôle dans la maturation ovocytaire (JOHNSON et al., 2009 ; WIEGAND, 1996). Ce résultat permet de mettre en évidence l'importance de la prise en compte des ovocytes avec gouttelettes lipidiques (**ldo**) dans les structures à identifier lors des comptages en stéréologie.

4.5.3 La cardine franche, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792)

La présence de plusieurs types d'ovocytes pendant les mois échantillonnés, avec une majorité d'ovocytes en vitellogenèse lors de la saison de reproduction, souligne le déve-

loppement asynchrone de ce *batch spawner* (NIELSEN, 1989). La vitellogenèse est active en novembre, avec présence d'**ho** en janvier et des signes de ponte aux mois de février et mars (DOMINGUEZ-PETIT et al., 2018). De forts taux d'atrésie sont observés en mars avec une résorption des **POF**. En dehors de la saison de reproduction, de grands individus ont été classés en phase A, alors qu'il s'agit plus probablement d'individus en régression/régénération (D). Là encore, ce résultat souligne l'intérêt d'un échantillonnage des cardines franches de novembre à mars (avant et pendant la ponte) pour l'estimation des phases de maturité.

4.6 Calculs des L_{50} et A_{50} basés sur la stéréologie

La régression et la disparition des ovocytes secondaires et follicules post-ovulatoires (**POF**) chez les individus ayant pondu fait place à un ovaire qui, en se tenant aux critères histologiques, est classé en phase immature (A). Une piste utilisée pour distinguer les individus immatures des individus ayant pondu mais ne présentant plus que des ovocytes primaires était de reprendre l'épaisseur de la **paroi gonadique (gw)** comme suggéré par BUCHOLTZ et al. (2013), les individus n'ayant jamais pondu présentent une **paroi gonadique** fine alors que les individus ayant déjà participé à la ponte présentent une **paroi gonadique** plus épaisse. Cette observation n'a pu être validée, ni pour la cardine franche (Figure 3.25) ni pour le rouget barbet de roche. L'Article 3 (p. 184) soulève aussi cette problématique chez le rouget barbet de roche, avec des individus classés en phase A de longueur et âge supérieurs à ceux d'individus ayant déjà participé à la ponte. Cela a aussi été noté chez la cardine franche (*L. whiffiagonis*) et questionne l'estimation de la phase de maturité par l'utilisation de la stéréologie seule en dehors de la période de reproduction. Cela remet aussi en question les calculs de métriques L_{50} et A_{50} établis à partir de données récoltées en dehors de la saison de reproduction.

La longueur à première maturité de la plie a été estimée à 20 cm. Compte tenu de la longueur minimale de capture à 27 cm, les individus pêchés devraient donc avoir participé à un ou plusieurs événements de ponte avant d'être capturés. Cependant, comme souligné dans le Chapitre 2, la plie fait l'objet d'importants rejets de pêche (prise accessoire des pêcheries mixtes visant principalement la sole *Solea solea*) (MILLNER et al., 2018). Ainsi, malgré une longueur minimale de capture qui semble être en dessous de la longueur à première maturité, des individus plus petits sont tout de même capturés et débarqués dans le cadre de l'obligation de débarquement des captures totales.

Pour le rouget barbet de roche, la L_{50} a été établie *via* les critères macroscopiques (18 cm pour cette étude et 16.9 cm par MAHÉ et al. (2013)) et par stéréologie en prenant en compte la problématique d'identification des femelles sexuellement matures en dehors de la saison de reproduction (22.9 cm pour une première participation à la ponte à deux

ans). Dans tous les cas, cette L_{50} reste au dessus de la longueur minimale de capture de 15 cm mise en place en France (FRANCE, 2013). La pêche prélève donc dans ces stocks des individus qui ne se sont pas encore reproduits. Ce résultat suggère que les règles de gestion actuelle de ces stocks doivent être reconsidérées dans le cadre d’une exploitation durable de la ressource, en imposant par exemple une longueur minimale de capture adaptée, et ce au niveau européen.

Finalement, pour *L. whiffiagonis* provenant du stock 27.7b-k la L_{50} basée sur la méthode stéréologique est de 20 cm pour une première reproduction à 2 ans. Vingt cm est aussi la longueur minimale de capture pour ce stock. Cette L_{50} est supérieure à celle établie par DOMINGUEZ-PETIT et al. (2022) ($L_{50} = 17.8$ cm et $A_{50} = 2.4$ ans) mais inférieure à celle établie par ROBSON (2004) ($L_{50} = 24.0$ cm et $A_{50} = 2$ ans) pour des individus provenant du stock 27.7b-c. Les A_{50} calculés estiment une première reproduction à 2 ans.

Ces différences de longueurs retrouvées par les deux auteurs qui ont échantillonné des individus sur les côtes ouest de l’Irlande pourraient signaler une décroissance de la L_{50} de la population en moins d’une quinzaine d’années, comme cela a été observé chez la plie (WALRAVEN et al., 2010). De plus, la différence entre la L_{50} estimée par DOMINGUEZ-PETIT et al. (2022) et celle de cette étude pourrait être reliée à la zone d’échantillonnage ; en effet, la majorité des individus récoltés pour ce travail provenaient des divisions CIEM 7g,h,j au sud de l’Irlande.

Les données bibliographiques indiquent qu’en se basant sur les critères morphologiques pour évaluer les phases de maturité, la longueur et l’âge à première maturité ont tendance à être surévalués (BURCHARD et al., 2013 ; LANG et al., 2013). C’est également ce que nous avons constaté chez la plie et la cardine franche. En utilisant la méthode stéréologique, en plus de prendre en compte le cycle d’ovogenèse pour distinguer les individus en phase de régression/régénération (D) des individus immatures (A), un nouveau biais apparaît : la maturité physiologique (*i.e.* capacité à produire des gamètes) n’est pas différenciée de la maturité fonctionnelle (*i.e.* contribution à la production de larves) (HUNTER et al., 1985a ; PRINCE et al., 2022). L’histologie permet de cibler la maturité physiologique (développement de la gonade en présence d’hormones gonadotropes, événement identifié par l’apparition d’ovocytes à alvéoles corticales (**cao**) (BROWN-PETERSON et al., 2011)). Mais cette maturité cellulaire basée sur des cellules germinales encore relativement précoces dans la lignée (**cao**) ne reflète pas strictement la maturité fonctionnelle et conduit probablement à une surestimation du potentiel de reproduction réel du stock (PRINCE et al., 2022). Or en gestion des pêches, la longueur estimée est celle à laquelle le poisson contribue à la biomasse du stock (*i.e.* la première ponte). Ainsi, pour rapprocher les deux définitions et éviter d’inclure les individus les plus petits présentant une capacité

physiologique à se reproduire (présence de **cao**) mais qui n'auraient pas encore participé à un événement de reproduction, une estimation de la phase de maturité par la stéréologie devrait être effectuée au plus proche de la période de ponte.

Article 1

Citation : Sauger, C., Quinquis, J., Berthelin, C., Lepoittevin, M., Elie, N., Dubroca, L., Kellner, K. (2023) «A Quantitative Histologic Analysis of Oogenesis in the Flatfish Species *Pleuronectes platessa* as a Tool for Fisheries Management». *Animals* 13, p. 1-21. DOI : [10.3390/ani13152506](https://doi.org/10.3390/ani13152506)

Résumé : «The following paper gives a detailed description of the oogenesis cycle for the European Plaice (*Pleuronectes platessa*), from oogonia to post-ovulatory follicle, including ovarian follicle and zona radiata sizes. Noteworthy particularities were the difficulty in identifying cortical alveoli due to their very small size. Quantitative histology (stereology) on histological slides was used to determine a first size at maturity for females from the English Channel, which was found to be smaller compared to the literature (19 cm). Stereology also determined a first spawning event starting in January, with a peak in February and ongoing until March. Moreover, the use of stereology showed misclassifications for individuals categorized into a maturity phase using a macroscopic visual method. Misclassifications were found with individuals that had spawned (D) but were put under the immature (A) phase, and individuals in development (B) classified under D.»

Contribution : Création, conception et rédaction de l'article, avec récolte et traitement des échantillons, lectures des lames histologiques en stéréologie et analyse des résultats

Article

A Quantitative Histologic Analysis of Oogenesis in the Flatfish Species *Pleuronectes platessa* as a Tool for Fisheries Management

Carine Sauger ^{1,2,*} , Jérôme Quinquis ², Clothilde Berthelin ¹, Mélanie Lepoittevin ¹, Nicolas Elie ³, Laurent Dubroca ²  and Kristell Kellner ^{1,*} 

¹ Unity Biology of Organisms and Aquatic Ecosystems (UMR 8067 BOREA), University of Caen-Normandie, Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne University, CNRS, IRD, Université des Antilles, Esplanade de la Paix, 14032 Caen, France; clothilde.berthelin@unicaen.fr (C.B.); melanie.lepoittevin@unicaen.fr (M.L.)

² Laboratoire Ressources Halieutiques de Port en Bessin, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Avenue du Général de Gaulle, 14520 Port en Bessin Huppain, France; laurent.dubroca@ifremer.fr (L.D.)

³ Service Unit PLATON, VIRTUAL/HIS, Federative Structure 4207 "Normandie Oncologie", Normandie University UNICAEN, 14000 Caen, France; nicolas.elie@unicaen.fr

* Correspondence: carine.sauger@gmail.com (C.S.); kristell.kellner@unicaen.fr (K.K.)

Simple Summary: Histology and stereology were used to estimate the sexual maturity phase for the European Plaice, as well as a description of the oogenesis cycle and size at first maturity. This study provides a method to accurately determine a key parameter for fisheries management that may be used for other species.

Abstract: The following paper gives a detailed description of the oogenesis cycle for the European Plaice (*Pleuronectes platessa*), from oogonia to post-ovulatory follicle, including ovarian follicle and zona pellucida sizes. Noteworthy particularities were the difficulty in identifying cortical alveoli due to their very small size. Quantitative histology (stereology) on histological slides was used to determine a first size at maturity for females from the English Channel, which was found to be smaller compared to the literature (19 cm). Stereology also determined a first spawning event starting in January, with a peak in February and ongoing until March. Moreover, the use of stereology showed misclassifications for individuals categorized into a maturity phase using a macroscopic visual method. Misclassifications were found with individuals that had spawned (D) but were put under the immature (A) phase, and individuals in development (B) classified under D.

Keywords: sexual maturity; histology; fish ovary



Citation: Sauger, C.; Quinquis, J.; Berthelin, C.; Lepoittevin, M.; Elie, N.; Dubroca, L.; Kellner, K. A Quantitative Histologic Analysis of Oogenesis in the Flatfish Species *Pleuronectes platessa* as a Tool for Fisheries Management. *Animals* **2023**, *13*, 2506. <https://doi.org/10.3390/ani13152506>

Academic Editors: Kenji Saitoh, Maria Cristina Follesa and Cristina Porcu

Received: 15 June 2023
Revised: 28 July 2023
Accepted: 30 July 2023
Published: 3 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The reproductive capacity, or more precisely, the capacity to produce viable eggs or larvae, is a key parameter for stock management of exploited fish species [1,2]. Subsequently, a fine appreciation of the reproductive biology of targeted species is of great importance when evaluating the productivity of exploited stocks. Regular sampling of these stocks and the determination of parameters linked to reproductive status, such as sex ratio, sexual maturity or fecundity, may contribute to the evaluation of their reproductive capacity. Usually, the reproductive success of a species is mainly attributed to females and is determined by the percentage of mature females (females showing gonad development) in the stock [3]. Estimating this reproductive success is one of the main objectives in fisheries management, with the generation of indicators such as the maturity ogive, the spawning potential ratio, or the spawning stock biomass.

Until recently, the description of maturity phases for fish species sampled during annual scientific campaigns was mainly based on macroscopic criteria: the gonads of fish were extracted to allow a visual appreciation of criteria linked to reproductive status. For

example, the length of the gonad, its color or global aspect, and texture were determining factors in maturity staging. Several National and European protocols were established by the International Council for the Exploration of the Sea (ICES) in order to harmonize this reading procedure. This harmonization led to the identification and description of six maturity phases named A to F (some of them subdivided into subphases): immature (A), developing (B), spawning (C), regressing/regenerating (D), omitted spawning (E), and abnormal (F) (Table 1). These phases, subphases, and their associated macroscopic criteria have been used since 2012 to homogenize the procedure of maturity evaluation for all teleost fish species regulated by European policies in stock management [4,5].

Table 1. Description of the maturity phases for female teleostean species adapted from the Workshop for Maturity Staging Chairs (WKMATCH), the Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF) [4,5] and Brown Peterson et al. (2011) [6].

State Description	Sexual Maturity Phase		Old Terminology (ICES 2012)		New Terminology (ICES 2018)		Macroscopic Criteria	Histological Features
		Possible Sub-Phase		Possible Sub-Phase		Possible Sub-Phase		
SI: Sexually immature (without gonad development)	Immature		I		A		Small, pinkish, and translucent (often clear) ovaries shorter than 1/3 of the body cavity. Indistinct blood vessels and no visible eggs	Only oogonia and primary growth oocytes were present, containing no oil droplets, rare atresia, and no muscle bundles. Thin ovarian wall, scarce connective tissue around follicles, and little space between oocytes
SM: Sexually mature (with gonad development)	Developing	Developing but functionally immature (first-time developer)	II	IIa	B	Ba	Enlarging ovaries, blood vessels become more distinct	Increase in oocyte size, blood vessels more distinct, primary growth, and cordical alveolar oocytes present. Early and mid-vitellogenesis oocytes and atresia may be present. No post-ovulatory oocytes nor late vitellogenic oocytes
		Developing but functionally mature		IIb		Bb		
	Spawning	Actively spawning	III	IIIa	C	Ca	Large ovaries, prominent blood vessels, and individual oocytes are visible macroscopically	Late vitellogenic oocytes are present. Early stage of oocyte maturation can be present. No post-ovulatory. Atresia of vitellogenic or hydrating oocytes may be present
		Spawning-capable		IIIb		Cb		Oocytes at the end of germinal vesicle migration, germinal vesicle breakdown, hydration, or ovulation are present. Recently collapsed post-ovulatory follicles can be present
	Regression/Regeneration	Regression	IV	VIa	D	Da	Reddish ovaries of about 1/2 of the body cavity length. Flaccid ovary walls, prominent blood vessels, and possible remnants of disintegrating opaque and/or translucent eggs	Atresia (any stage) and post-ovulatory oocytes are present. Some healthy cortical alveolar oocytes and/or early and mid-vitellogenic oocytes are present
		Regeneration		IVb		Db		

Table 1. Cont.

State Description	Sexual Maturity Phase		Old Terminology (ICES 2012)		New Terminology (ICES 2018)		Macroscopic Criteria	Histological Features
		Possible Sub-Phase		Possible Sub-Phase		Possible Sub-Phase		
SM: Sexually mature (with gonad development)	Omitted spawning		V		E			No post-ovulatory oocyte and at least 50% of the vitellogenic oocytes are atretic
	Abnormal		VI		F		Problems in development (necrosis, sclerosis, intersex; the majority are unhealthy)	

Even if this approach is simple and time-efficient, the results it yields are not entirely satisfactory. The assessment of visual criteria largely depends on the reader, which may lead to wide variability in the determination of the percentage of mature females. Indeed, the range of variability may reach 30% to 50% depending on the species and mainly concerns the first maturity phase (transition from immature A to first maturity B individuals) [5,7]. Subsequently, this variability affects the fine comprehension of the mechanisms controlling life history traits [8]. Moreover, the misvaluation of an individual's maturity phase questions the quality of fisheries management procedures, negatively affects the modeling of stocks, and subsequently impacts management policies at a European scale.

A previous study [6] suggested combining morphologic criteria with histological criteria to accurately determine the reproductive phase of fish. Moreover, they reviewed the definitions and terminologies used in the description of reproductive processes occurring at the gonad's level and at the cellular level. The different reproductive phases were associated with fine histological descriptions of the gonads. The classification of a female individual within a maturity phase relies on the identification of various stages of germinal cells, from oogonia to hydrated oocytes, but also the thickness of the ovarian wall, the occurrence of atresia, the number and aspect of blood vessels, and the presence of post-ovulatory follicles [9]. Indeed, a standardization of the histological description of each cell of the germ lineage was suggested so as to cover a large range of species based on the compilation of several terminologies [9]. For all species, the same cellular progression was observed during oogenesis: oogonia, primary growth oocytes, oocytes with cortical alveoli vesicles, vitellogenic oocytes, maturing oocytes, including the migration of the germinal vesicle and the hydration of the oocyte, and finally ovulation leading to the formation of post-ovulatory follicles. The histological approach, while expensive and time-consuming, is also considered to be the most accurate method to assess the reproductive phase of a species [10].

However, these descriptions are still based on a qualitative appreciation of histological structures, such as the presence of cortical alveoli oocytes or post-ovulatory follicles [11], the ovarian wall thickness, or even blood vessel abundance, and could greatly benefit from a quantitative approach. Moreover, since no norms are set concerning the studied surface of the histological section, observations may not be representative of the gonad section or of the whole gonad. In addition, if the course of gametogenesis is broadly unchanged in fish species, some species-specific features may be observed, such as the timing of certain cellular events or the morphology and proportions of each cell type. Therefore, a fine description of cellular characteristics for each species, combined with the use of a quantitative approach, would lead to a precise and accurate evaluation of microscopic criteria and subsequently the reproductive phase.

The pleuronectid *Pleuronectes platessa* is a Pleuronectiformes species intensively fished in the eastern English Channel, especially in ICES Area 27, and is subject to stock management procedures [12–14]. Indeed, the age and length at which 50% of females have reached sexual maturity have significantly shifted during the 20th century [15]. This further underlines the necessity to regularly monitor the evolution of maturity characteristics [16]. To complete the

already existing works investigating fecundity and sexual maturity on the basis of macroscopic parameters, we offer in this study a precise and comparative description of oogenesis processes using Brown Peterson et al.'s (2011) [6] terminologies. We then developed a quantitative approach based on stereology and image analysis of the whole transverse ovarian section as an objective method to define the various phases, from the early immature phase to mature spawning females.

2. Materials and Methods

2.1. Specimen Sampling

Specimens of European Plaice (*Pleuronectes platessa*) were fished in the Eastern English Channel (ICES division VIIId) (Figure 1) using a bottom trawl from either commercial fishing vessels or during the scientific campaign CGFS (Channel Ground Fish Survey). Individuals from campaigns were dead by the time of sampling, and all individuals from commercial catches were dead when received from the fish wholesaler. The sampling was opportunistic, depending on the monthly catches of commercial fishing vessels or the availability of scientific campaigns. This led to disparities in the number of fish sampled each month as well as gaps between sampled months. Moreover, commercial catches being under size regulations, small individuals could only be sampled during scientific campaigns that were themselves limited in time. The temporal frame for the samples was set following the reproductive cycle of the European Plaice in this area. Depending on commercial catch availabilities, a dozen fish were sampled per event, with double the samples taken during the spawning period. A total of 151 plaice were obtained from January 2017 to August 2019. All specimens sampled during the scientific campaign CGFS were treated immediately on board for biometric measurements (ungutted weight, total length, otolith extraction) [17]. All specimens from commercial vessels had been fished a day prior and were dissected as soon as they arrived on site. For each animal, the visceral cavity was opened to determine the sex, and the ovaries of females were carefully extracted, photographed, and weighted. From the gonadal weights, an individual gonadosomatic index (GSI) was computed using Equation (1).

$$\text{GSI} = (\text{weight of the ventral ovary} \div \text{ungutted ovary-free weight of the individual}) \times 100 \quad (1)$$

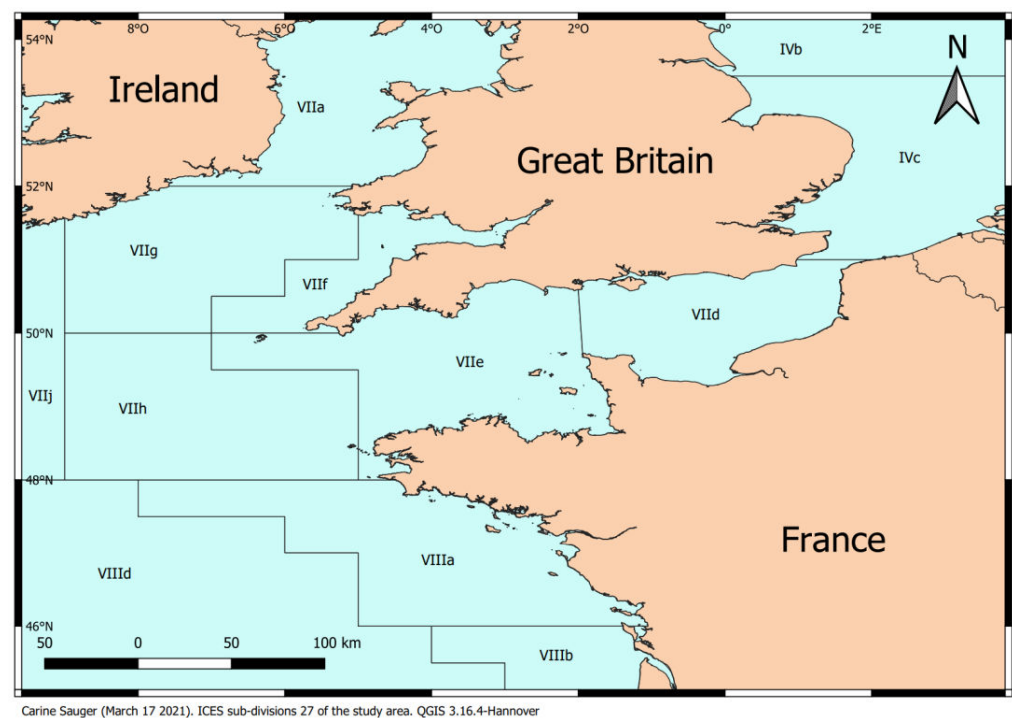


Figure 1. Map of ICES Area 27. The study took place in the VIIId division. (Carine Sauger-March 17 2021-QGIS 3.16.4-Hannover).

The reproductive phase was established according to the ICES scale [5] through the observation of macroscopic criteria (Table 1).

2.2. Light Microscopy

The ventral ovary was transversely cut in the median region to obtain 1 cm-thick pieces of gonad for each female. The tissue samples were fixed for histology in Davidson's fixative (10% glycerol, 20% formaldehyde, 30% ethanol 95°, 30% sterile seawater, 10% acetic acid) at 4 °C for 48 h. They were then dehydrated in successive ethanol dilution baths, transferred to butanol (Carlo Erba, Val-de-Reuil, France), and embedded in paraffin wax (Roth, Lagny-sur-Marne, France). Five micrometer sections were stained according to the Prenant Gabe trichrome protocol [18].

Microphotographs were taken with an Olympus AX70 microscope using the Olympus CellSens© software (v2.3). Various cell types of the female germline were identified, and measurements of cellular structure sizes (i.e., mean cell diameter and mean *zona pellucida* width) were made.

2.3. Quantitative Analysis of Ovarian Sections

The procedure for quantitative analysis was previously described [19]. Using a histology slide scanner (Aperio CS, Scan Scope Console software, v.10.2.0.2352), the slides were scanned and analyzed with the Aperio software (v12.1.0.5029). To quantify the cellular structures, a stereological analysis based on Glagolev's [20] method was used. After detecting the cross sections on the scanned histological slides through segmentation using a threshold applied to the gray level image to extract the tissue area [21], a grid of 500 to 600 equidistant points was layered over the ovarian section using a random starting point. Each sampling point was assigned a single structure. This allowed for the computation of a percentage of times a structure was counted on a single slide, leading to a surface percentage for all ovarian structures. In this study, only the percentage of germ cell surfaces (%GCS) was taken into account for **og**, **po1**, **po2**, **cap**, **vit**, **pho**, **ho**, and **POF** (for the acronyms' definitions see Table 2). To summarize the different follicle stages, **og**, **po1**, and **po2** were classified under **pca** (precortical alveoli), and all vitellogenic oocyte categories (**vit1**, **vit2**, and **vit3**) were classified under **vit**. With this data, information on the germ cells present in the ovaries of each individual, as well as the mean %GCS per month and for each maturity phase, was established. Inter-agent calibration with a reading protocol [22] was used to validate this stereological approach. Cellular homogeneity inter-gonad (ventral and dorsal) and intra-gonad (anterior median and posterior sections) was also checked [19]. Once cellular homogeneity was demonstrated, the reading results of the ventral ovary were used.

2.4. Size Class in Which 50% of Females are Mature (L_{50})

The size class in which 50% of the female population is considered mature (L_{50}) was computed using a logistic regression between the maturity phase and the size using the function `gonad_mature()` of the SizeMat R package [23]. The L_{50} median and confidence intervals were estimated using a non-parametric bootstrap method with 1000 replications. The goodness-of-fit for the regression was evaluated using Nagelkerke's R-squared coefficient of discrimination [24]. The L_{50} assumptions describe the range in which maturity onset occurs, represented by a logistic curve centered on length [25]. This curve indicates the point at which 50% of individuals start producing gametes relative to their body length, corresponding to the individuals presenting vitellogenesis. The data used to estimate this (L_{50}) was the maturity phase determined through stereology by implementing histological features previously described [4–6].

Table 2. Summary of used abbreviations, germline cell identification criteria, and mean cell size (μm) in *P. platessa*. **pca**: precortical alveoli; **vit**: vitellogenic oocyte categories.

Abbreviation	Name	Identification Criteria	Size (μm)	
	og	Oogonia	$N/C \approx 0.8$ Clear cytoplasm	14.3 ± 4.6
pca	po1	Primary oocyte, early stage	$N/C \geq 0.5$. Hematoxylin-stained cytoplasm. Smooth nuclear membrane. Less than 5 nucleoli	29.6 ± 5.4
	po2	Primary oocyte, late stage	$N/C < 0.5$. Hematoxylin-stained cytoplasm. Smooth nuclear membrane. More than 10 nucleoli. At the end of the stage, 2 distinct cytoplasmic areas.	82.7 ± 15.9
cao	Cortical alveoli oocyte	Scalloping of the nuclear membrane. Numerous nucleoli. Scarce lipidic droplets and cortical alveoli in the inner cytoplasm. Lampbrush chromosomes. <i>Zona pellucida</i> starts to form.	153.1 ± 17.8	
vit	vit1	Early vitellogenic oocyte	Ring of eosinophilic vesicles around the cytoplasm. Scarce lipidic droplets. Migration of the germinal vesicle. <i>Zona pellucida</i> thickness increases.	191.5 ± 29.1
	vit2	Mid vitellogenic oocyte	Progressive invasion of the whole cytoplasm with vitellus droplets. <i>Zona pellucida</i> becomes eosinophilic	380.0 ± 57.2
	vit3	Late vitellogenic oocyte	Cytoplasm completely filled with vitellus droplets. Polygonal in shape. Thick and fully eosinophilic <i>zona pellucida</i>	629.5 ± 88.5
pho	Partially hydrated oocyte	Presence of vitellus droplets and clear basophilic areas in the cytoplasm.	847.2 ± 104.0	
ho	Hydrated oocyte	Homogeneous cytoplasm with no visible vitellus droplets	958.7 ± 60.7	
POF	Post-ovulatory follicle	Theca and granulosa layers left behind after ovulation		

3. Results

Ovaries appeared as paired, elongated structures within the abdominal cavity (Figure 2a). The gonadal section presents a concentric organization of the folded germinal epithelium that constitutes the ovarian lamellae, connecting to the external ovarian wall. This germinal epithelium contains the oogonia, oocytes, and/or follicles, depending on the stages of gametogenesis, until the release of mature oocytes from their follicles into the ovarian cavity just before spawning (Figure 2b,c).

Oogenesis was divided into four instances: proliferation, previtellogenesis, vitellogenesis, and maturation.

3.1. Proliferation

Oogonia are nested in the germinal epithelium. They consist of small oval cells (mean diameter $14.3 \mu\text{m} \pm 4.6 \mu\text{m}$) with a large round nucleus containing a unique nucleolus (Figure 3a). The nucleus contains clumps of chromatin in its periphery, and the cytoplasm is clear. The nuclear cytoplasmic ratio of an oogonium, calculated with Equation (2), is elevated (approximately 0.8). The nest usually groups several oogonia, accompanied by their associated somatic cells (elongated nuclei). Mitotic cell divisions are sometimes observed.

$$N/C = \text{diameter of nucleus} \div \text{diameter of the follicle taken by the cytoplasm} \quad (2)$$

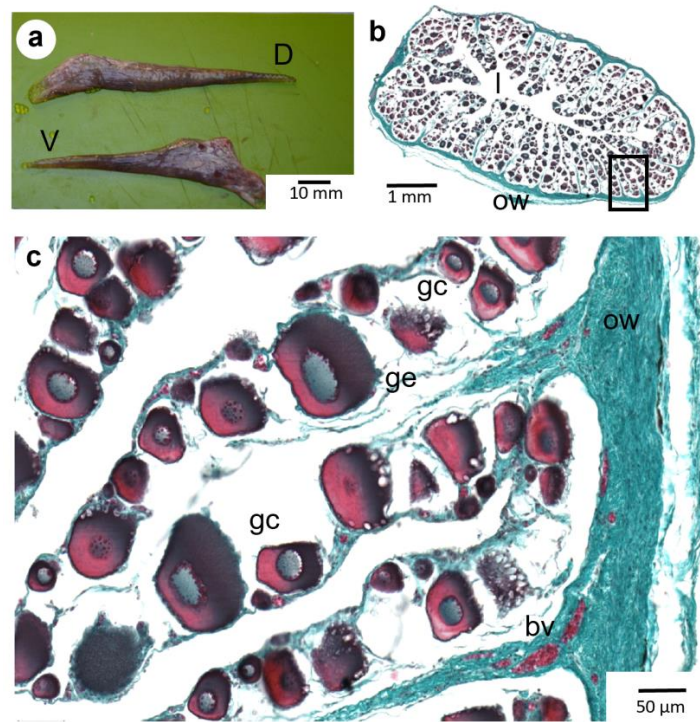


Figure 2. (a): Dorsal (D) and ventral (V) ovaries for *Pleuronectes platessa*. (b,c): Transverse histologic sections of *P. platessa* ovaries showing a concentric organization. Germinal cells (gc) at various stages of oogenesis are located between two successive germinal epithelium lamellae with (c): an enlargement of the insets in (b). ow: ovarian wall (ow); ge: germinative epithelium; l: lumen of the ovaries; bv: blood vessels.

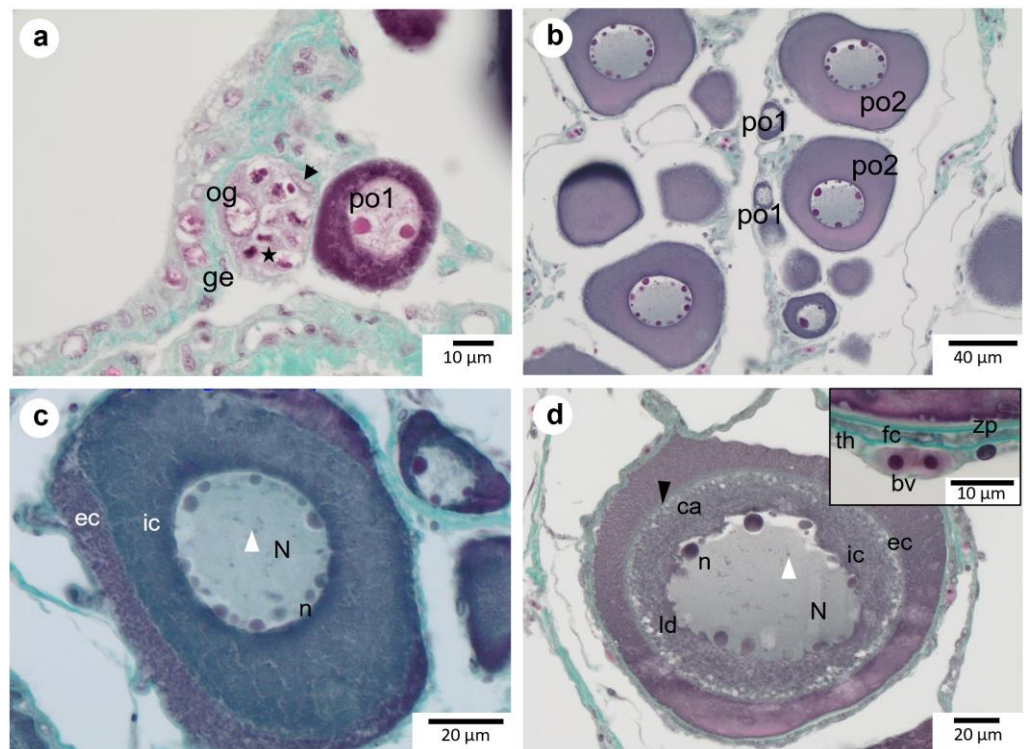


Figure 3. Oogonia, primary growth oocytes, and early vitellogenic oocytes (vit1) of *P. platessa*. (a): Oogonia (og) associated with somatic cells (black arrow) nested in germinative epithelium (ge). Note an oogonia nest with intense proliferative activity (★). (b): An early primary oocyte (po1) with

a low number of nucleoli and highly stained cytoplasm and more advanced primary oocytes (**po2**) with abundant nucleoli (**n**) along the periphery of the nucleus (**N**). The nuclear membrane is still smooth. (c): Precortical alveoli stage, classified under **po2**, with cleaved **ic** and **ec** (internal and external cytoplasm, respectively). Lampbrush chromosomes (the white arrowhead) may be observed. (d): Cortical alveoli oocytes (**cao**) with a scalloped nuclear membrane. Lipidic droplets (**ld**) are observed in the inner cytoplasm. Cortical alveoli (**ca**) can be seen along the junction between the inner and outer cytoplasm. The follicle envelope is composed of a thin *zona pellucida* (**zp**) encompassed between the oocyte membrane and the complex follicular cells (**fc**) and theca (**th**) containing blood vessels (**bv**).

3.2. Previtellogenesis

Oogonia become primary oocytes following an increase in size (Figure 3b) as their cytoplasm becomes intensively hematoxylin-stained. A primary growth oocyte's nucleus contains an increasing number of highly basophilic nucleoli, and their **N/C** decreases progressively. The nucleus of early-stage primary oocytes is spherical and surrounded by a smooth nuclear membrane. At this stage, the nucleus contains a few intensely red-stained nucleoli (less than 5 in general). Early-stage primary oocytes have a **N/C** of 0.5 or more and a mean size of 29.6 μm ($\pm 5.4 \mu\text{m}$). At the following stage, the cytoplasm of advanced primary oocytes enlarges considerably, reaching a **N/C** of less than 0.5, and the nuclear membrane is still smooth. The number of nucleoli increases to more than 10, and they are located on the external periphery of the nucleus. The mean size of **po2** is 82.7 μm ($\pm 15.9 \mu\text{m}$). At the end of this stage, it is sometimes possible to distinguish lampbrush chromosomes.

At the end of the primary oocyte growth stage (Figure 3c), while the nucleus membrane is still smooth, the cytoplasm appears divided into two distinct concentric areas: the inner cytoplasm and the outer cytoplasm. At this stage, both areas appeared homogeneously stained without any clear vesicles, and the nuclear membrane was smooth.

The cortical alveoli oocyte (**cao**) is characterized by the scalloping of the nuclear membrane and the presence of inclusions in the cytoplasm (Figure 3d). The number of nucleoli is still elevated, and they are niched into the folds of the scalloped nuclear membrane. Some scarce and small lipid droplets and cortical alveoli are restricted to the inner cytoplasm. Lampbrush chromosomes may be seen in the nucleus. During that stage, somatic cells forming the follicular cell layer and the theca, containing blood vessels, are clearly visible around the oocytes. The *zona pellucida* starts to form. The mean **cao** size is 153.1 μm ($\pm 17.8 \mu\text{m}$).

3.3. Vitellogenesis

This stage is characterized by a significant increase in oocyte size linked to the accumulation of vitellus in the cytoplasm (Figure 4). At the beginning of the vitellogenic stage (**vit1**) (Figure 4a), a ring of eosinophilic vesicles containing vitellus forms around the cytoplasm of the oocytes. Some scarce lipidic droplets are still present. The nucleus is central, and its membrane remains indented. The *zona pellucida* slightly increases in thickness but remains green-stained. The mean size of **vit1** is 191.5 μm ($\pm 29.1 \mu\text{m}$).

The stage named vitellogenic oocytes 2 (**vit2**) is characterized by the progressive invasion of the whole cytoplasm by vitellus droplets (Figure 4c). This progression starts from the external side of the oocyte until the vitellus occupies the whole cytoplasm. At this stage, the *zona pellucida* becomes eosinophilic as it progressively thickens, reaching a mean value of 9.2 μm ($\pm 1.6 \mu\text{m}$). The mean size of **vit2** is 380.0 μm ($\pm 57.2 \mu\text{m}$).

At the end of vitellogenesis, the oocytes (**vit3**) (Figure 4e) are completely filled with vitellus droplets. The follicles appear polygonal in shape, surrounded by a thick and fully eosinophilic *zona pellucida* (53.81 $\mu\text{m} \pm 5.10 \mu\text{m}$). Vitellogenic oocyte **vit3** size reaches 629.5 μm ($\pm 88.5 \mu\text{m}$).

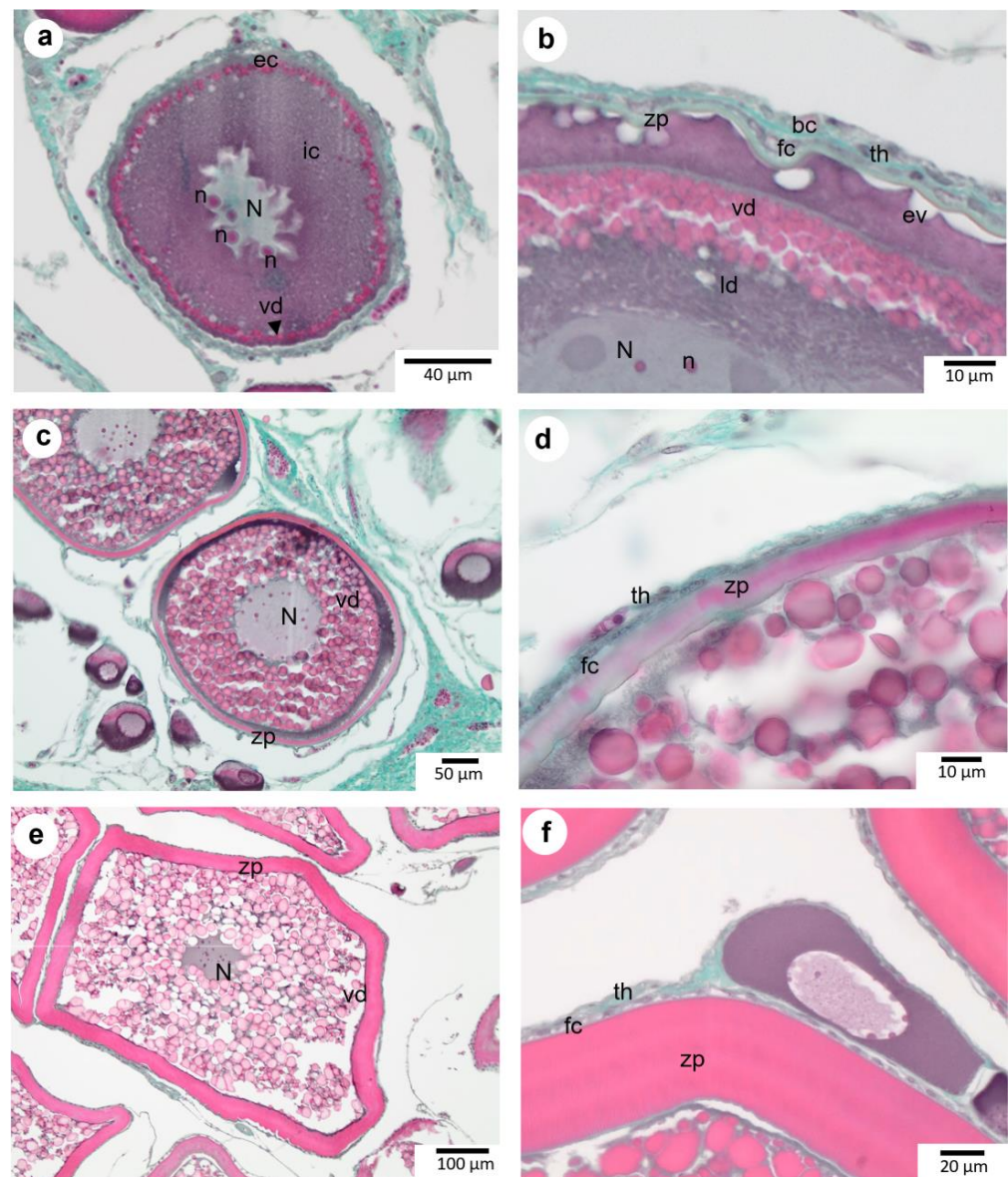


Figure 4. Vitellogenic oocytes of *P. platessa*. (a,b): Early vitellogenesis in **vit1** oocytes, showing the formation of pink-stained eosinophilic vitellus droplets (**vd** and black arrow), initiates the start of vitellogenesis. At this stage, vitellus droplets coexist with scarce lipidic droplets (**ld**). The cytoplasm is zonated (**ic** and **ec** for internal and external cytoplasm, respectively). The *zona pellucida* (**zp**) is still thin and basophilic. Endocytosis vesicles (**ev**) are clearly visible under the *zona pellucida*. The follicular cells (**fc**) and the theca (**th**) containing blood vessels (**bv**) encircle the oocyte. (c,d): Mid vitellogenic oocyte (**vit2**) showing progressive invasion of the cytoplasm by vitellus droplets. The **zp** progressively thickens and becomes eosinophilic. (e,f): Late vitellogenic oocyte (**vit3**) with the thickening of the **zp** fully red and vitellus droplets filling the entirety of the cytoplasm. N: nucleus; n: nucleolus.

3.4. Maturation

During the hydrating stage, partially hydrated oocytes contain vitellus droplets but also homogenous, clear basophilic areas in their cytoplasm (Figure 5a). There is a slight decrease in *zona pellucida* thickness, which appears striated ($33.1 \mu\text{m} \pm 3.5 \mu\text{m}$) with an increase in the mean diameter of oocyte follicles ($847.2 \mu\text{m} \pm 104.0 \mu\text{m}$).

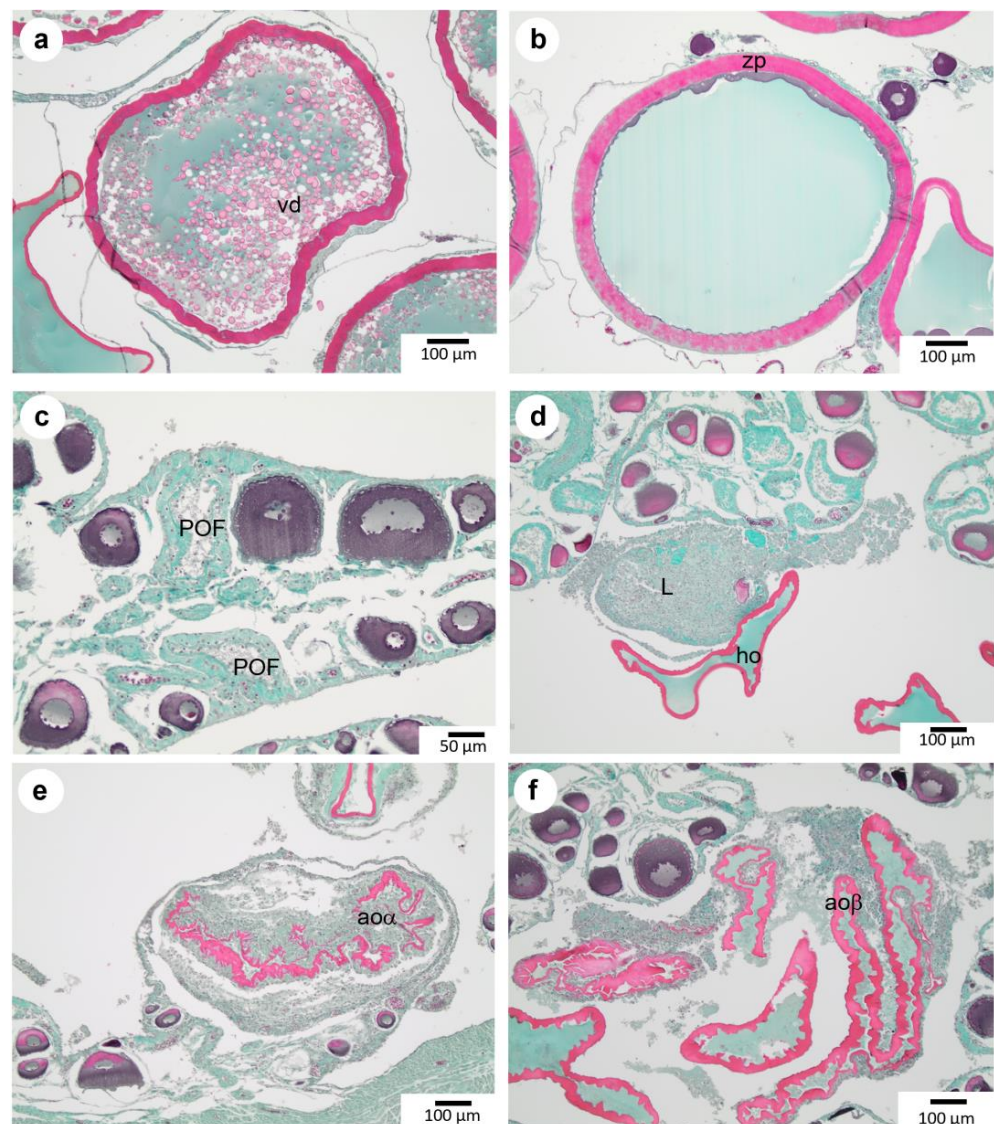


Figure 5. Hydration of oocytes, emission, and atresia in the ovary of *P. platessa*. (a): Partially hydrated oocytes (**pho**). (b): Hydrated oocytes (**ho**). Other structures observed in the ovary are (c): post-ovulatory follicles (**POF**) remaining in the ovary after ovulation. (d): Lysis area (**L**) in the lumen. (e): Atretic oocyte exhibiting evidence of lysis before emission (**ao α**). (f): Atretic oocyte exhibiting evidence of lysis after emission (**ao β**).

At the end of the hydration process, hydrated oocytes appear spherical (Figure 5b). A fully hydrated oocyte (**ho**) possesses a homogeneous cytoplasm with no visible vitellus droplets. The mean diameter of **ho** is $958.7 \mu\text{m}$ ($\pm 60.7 \mu\text{m}$), while *zona pellucida* thickness reaches $40.4 \mu\text{m}$ ($\pm 5.0 \mu\text{m}$). Figure 6 illustrates female germinal cells' growth diameter from the oogonia stage to mature oocytes. Moreover, *zona pellucida* thickness increases mainly between **vit2** and **vit3** stages. The presence of follicle cells and theca indicates that the oocyte has not been emitted yet. The observation of well-preserved, hydrated oocytes is tricky due to the difficulty of cutting at this stage.

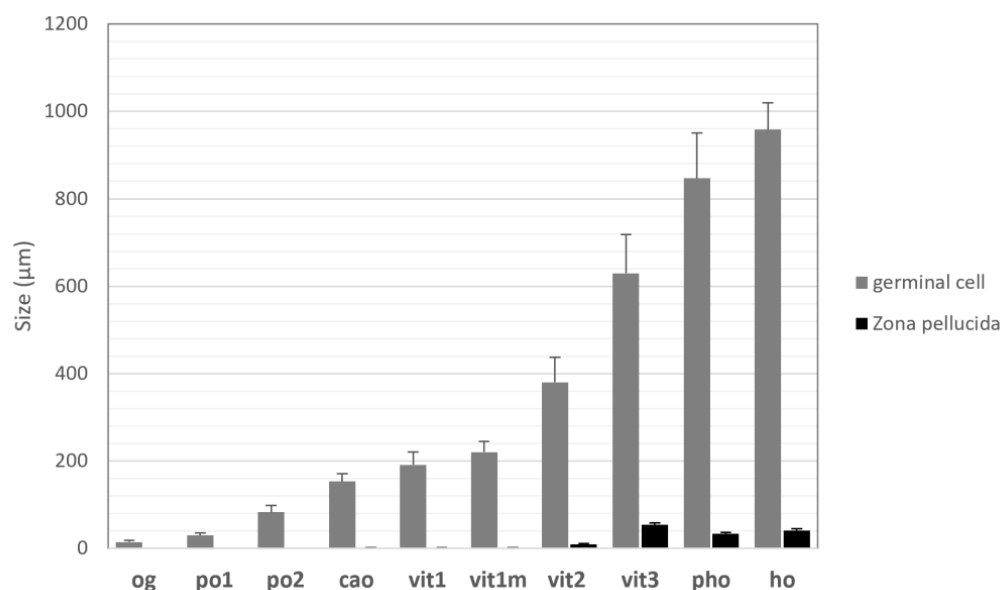


Figure 6. Mean diameters (μm) of female germline cells and *zona pellucida* (zp) thickness for *P. platessa* during oogenesis. Mean diameters were measured over 20 cell sections, including the nucleus. Bars represent the standard deviation. **og**: oogonia; **po1**: early primary oocyte; **po2**: advanced primary oocyte; **cao**: cortical alveoli oocyte; **vit1**: early vitellogenic oocyte; **vit2**: advanced vitellogenic oocyte; **vit3**: complete vitellogenic oocyte; **pho**: partially hydrated oocyte; **ho**: hydrated oocyte.

3.5. Other Notable Ovarian Structures

Post-ovulatory follicles are observed in the ovary once the oocytes have been emitted (Figure 5c). This structure is composed of theca and granulosa layers left behind after ovulation. Due to ongoing lysis, the thickness of these layers will progressively diminish over time during the regressing phase (D).

Atretic oocytes were observed on histological slides of individuals at different maturity phases (Figure 5e,f). Atretic oocytes may be classified into two main categories: Early atretic oocytes, or atretic oocyte alpha, exhibit evidence of lysis before emission. They are still enclosed in the theca and granulosa but show evidence of lysis, resulting in a progressive disruption and the loss of their round shape. Late atretic oocytes, named atretic oocytes beta, are emitted oocytes remaining in the lumen of the ovary, out of their post-ovulatory follicle. They are always free of theca and surrounded by phagocytic cells. Areas with lysis were also observed without any possibility of determining the nature of the lysed cells (Figure 5d). During maturation, the ovarian wall appears distended due to the presence of **ho** and progressively thickens with abundant muscular fibers and blood vessels after spawning. All these cellular structures have been taken into account during the quantitative approach.

3.6. Quantitative Evaluation of Maturity

Stereology allows for the count of structures found within a 3-dimensional cell by analyzing a 2-dimensional section while taking into consideration geometry and statistical probabilities [26,27]. As applied to histology, linking a single cellular structure to a unique sampling point gives an objective view of the different cellular structures present within the cross section. This provides a means to quantitatively evaluate the surface percentage of these structures or to methodically point out individuals presenting specific cellular stages throughout the studied cross section.

Through this method, Figure 7 shows for fish of each size class the percentage of animals classified into the most advanced oocyte stage present within the ovary. When taking into account precortical alveoli oocytes (i.e., **og**, **po1**, or **po2**) as the most advanced follicle stage, all individuals of 18 cm or less are classified into that category. The first individual with **cao** as the most advanced oocyte stage appears at 19 cm ($n = 1$ out of 3 sampled individuals).

Individuals presenting vitellogenesis (i.e., **vit1** and later stages) as the most advanced oocyte stage are 21 cm and over.

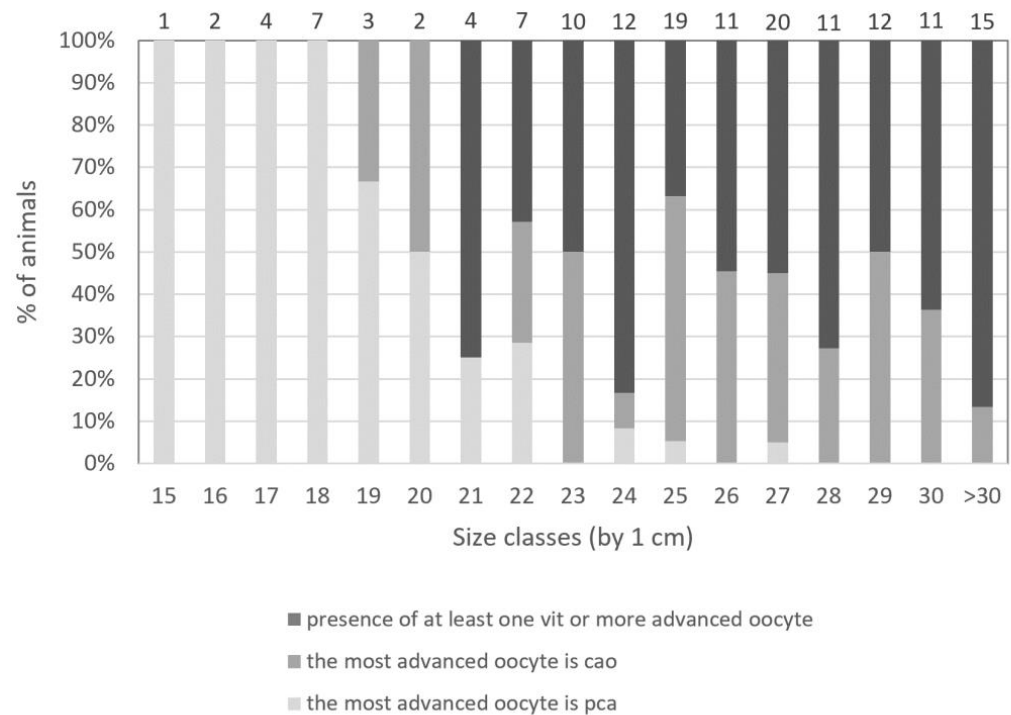


Figure 7. Identification of the most advanced oocyte in the gonad of *P. platessa*. For each individual's length (by class of 1 cm), three groups were defined: animals with at least one vitellogenic oocyte or more advanced stages (dark gray), animals with at least one cortical alveoli oocyte (**cao**) as the most advanced oocyte (medium gray), and animals with precortical alveoli (**pca**) stages (**og** + **po1** + **po2**) as the most advanced oocyte (light gray). The number (n) of fish belonging to each size class is indicated on the top of the bars.

Figure 8a shows the percentage of mature individuals with their most advanced germline stage, classified by month over a year (March 2018 to March 2019). All individuals (n = 123) are ≥ 21 cm long and could be considered sexually mature when looking at Figure 7. The first sampling in March 2018 showed a majority (80%) of individuals presenting **POF**, an indication of spawning. In June, 58% of individuals showed **pca** as their most advanced oocyte stage, while the rest showed **cao**, indicating that spawning events ended between March and June. From November to December, the number of individuals with partially hydrated oocytes at the most advanced stage increases. In January and February, the majority of individuals (70% and 91%, respectively) presented **POF**, signaling that spawning has occurred. By March 2019, individuals with **POF** were still present (46%), but there are still individuals with **pca** (3%), **cao** (27%), vitellogenic oocytes (17%), and **ho** (7%) as their most advanced oocyte stage, indicating oogenesis onset.

Furthering the use of histology data obtained through stereology, Figure 8b was established to allow for a better appreciation of the mean surface percentages of each germ cell type (%GCS) found within the ovaries depending on the month. The mean percentage of precortical alveoli (**pca**) oocytes ranges from 31% in December to 56% in March 2019, and they are present all year round. Cortical alveoli stages also seem to be present all year, with a mean surface percentage of 22% in November that decreases to 10% by January. For November and December, the mean percentage of maturing oocytes (**vit**, **pho**, and **ho**) increased from 24% to 48%. By January, **ho** are present (5%) concomitantly with **POF** (38%), indicating a massive spawning event. From January to March, **POF** progressively decreased due to its progressive resorption.

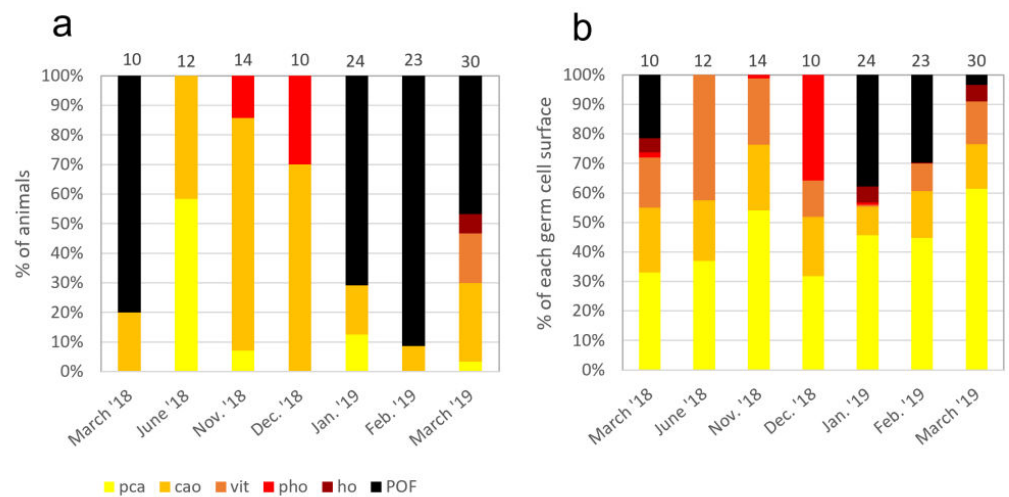


Figure 8. (a): For each month, percentage of animals classified under the most advanced oocyte stage found within their ovary. (b): For each month, the mean percentage of germline cell surface (GCS) found in the gonads of sampled *P. platessa*. **pca**: precortical alveoli oocytes (og + po1 + po2); **cao**: cortical alveoli oocyte (light gray); **vit**: vitellogenic oocyte; **pho**: partially hydrated oocyte; **ho**: hydrated oocyte; **POF**: post-ovulatory follicle. The number of fish sampled (n) for each month is indicated on the top of each bar.

The gonadosomatic index (GSI) was established for each individual classified under a visually determined maturity stage A, B, C, or D (Figure 9a and Table 1) for all sampled animals (n = 151). The mean GSI shows the highest rates (22%) for individuals classified under C (spawning) (n = 3) and the lowest mean GSI (<1%) for phase A (immature) (n = 49). When using quantitative data issued from stereologic analysis (Figure 9b,c), immature A animals were mainly associated with **pca** or **cao** as the most advanced stage (94%), whereas 6% of them exhibited **POF**, attesting that they had already spawned. On a stereological level, however, **POF** represented only about 2% of the total germ cell surface. For developing animals (B) (n = 53), approximately 43% had **POF** as the most advanced stage, even if they represented only 9% of the total germ cell surface. For spawning animals (C), 66% have **ho** or **POF** as the most advanced stage. Maturity phase A shows a majority of **pca** stages (80%), but the presence of **cao** (17%), **ho** (<1%), and **POF** (2%) underlines misclassifications. This problem is also found in phase B, with 76% of germ cells that are of **vit** stage and under, but **pho** (12%), **ho** (3%), and **POF** (9%) are present. Phase C shows a majority of **pho** (70%), with no **cao** stage or below, but the presence of **vit** (14%), **ho** (15%), and a few **POF** (1%). Finally, for phase D, all germ cell types are present, with the highest mean surface percentage for **pca** (34%), followed by **POF** (25%), and **vit** (22%).

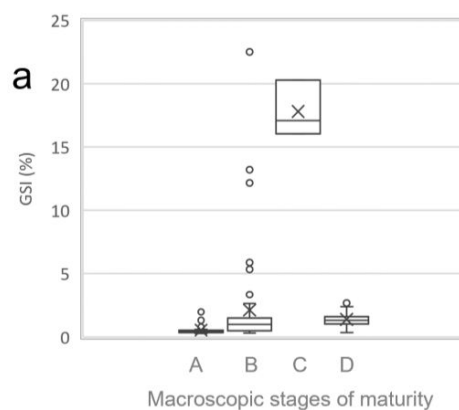


Figure 9. Cont.

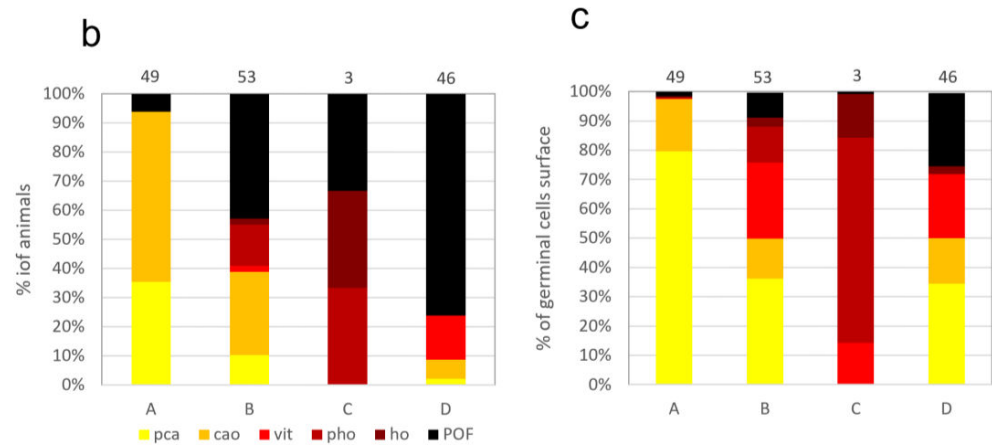


Figure 9. *Pleuronectes platessa* classified under a maturity phase through visual macroscopic criteria with a (a): boxplot of gonadosomatic index (GSI%) with minimum, first quartile, median, third quartile, and maximum. The black cross indicates the mean value. (b): Percentage of animals by the most advanced oocyte stage found within their ovary and (c): mean %GCS (germline cell surface). With A: immature; B: developing; C: spawning; and D: regressing/regenerating. Germline cells were identified through stereology, and the percentages were computed from the total germline population in each maturity phase. **pca**: precortical alveoli oocytes (**og** + **po1** + **po2**); **cao**: cortical alveoli oocyte; **vit**: vitellogenic oocyte; **pho**: partially hydrated oocyte; **ho**: hydrated oocyte; **POF**: post-ovulatory follicle. The number of fish sampled for each month (n) is indicated on the top of each bar for (b,c).

The size class in which 50% of the females in our sampling are considered mature by stereology (L_{50}) is presented in Figure 10. The L_{50} is 20.6 cm, with a confidence interval of [19.6, 21.5] cm and a Nagelkerke’s R-squared of 0.7.

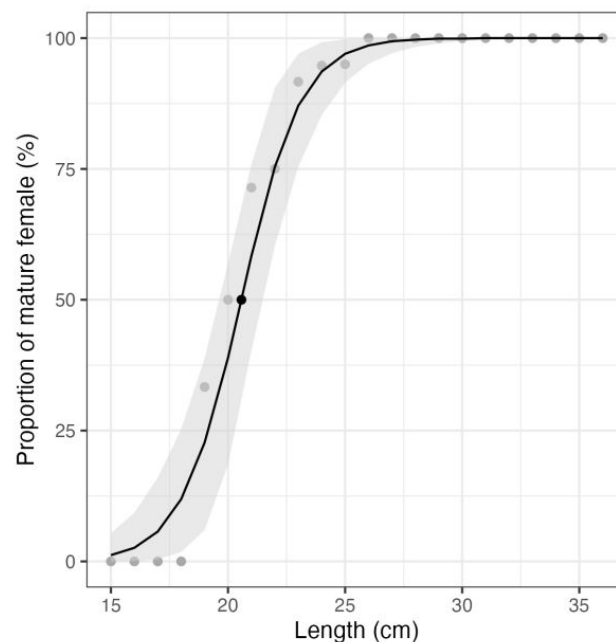


Figure 10. Logistic regression between the size (x-axis) and the proportion of mature females in the sampling (y-axis). The gray dots are the individual measurements, the black dot is the L_{50} (20.6 cm), and the gray ribbon displays the estimates’ confidence interval using a non-parametric bootstrap with 1000 replications. The confidence interval of L_{50} is [19.6, 21.5] cm.

4. Discussion

The minimum landing size in fisheries management is established through sound knowledge of age and size at maturity for each stock species considered. The present study details the oogenesis cycle for *Pleuronectes platessa*, a species with an age and length at maturation that has been in decline for the past century in the North Sea [16,28]. Yearly surveys and samplings from commercial catch allowed for important data collection at different time periods, making it possible to estimate an age or length at first maturity for this species. The aim of this study was to establish an accurate description of the oogenesis cycle for this pleuronectid as well as underline the main criteria linked to the spawning period of mature individuals. For this, a histological approach, enhanced through the use of stereology, was used [19].

4.1. Germ Cell Lineage

Before quantifying cell structures through stereology, a detailed description of the *Pleuronectes platessa* oogenesis cycle needed to be implemented since gametogenesis descriptions for the European Plaice are scarce and dated [29–35]. *Pleuronectes platessa* is an iteroparous batch spawner with group-synchronous oocyte development and a determinate fecundity [36]. This batch spawner will release hydrated oocytes at two- to five-day intervals for four to six weeks in the North Sea [37]. Even if all cellular structures found within the female gonad were identified, only germline cells were detailed in this paper. Notable characteristics were found for European Plaice oogenesis regarding lipid droplet abundance, *zona pellucida* size, and hydrated oocyte size.

4.2. Lipid Droplets

In teleosts, lipids found in eggs play an important role in oocyte maturation, egg viability, and embryonic and larval fish growth [38], but they also influence the time intervals between spawning and egg hatching [39] and can vary in size and presence depending on the species [40]. In a previous study, the volume percentage of oil globule(s) within the oocyte was reviewed for 803 teleost species, including *Pleuronectes platessa* [41]. For Pleuronectiformes, the volume percentage of oil globules within the oocyte seems low (under 2.5%), as well as for Pleuronectidae (given at 0% for the European Plaice). This concurs with our observations, with very small and scarce lipid droplets appearing during the *cao* stage. These lipid droplets will be in very low abundance throughout the entire oogenesis cycle, compared to other flatfish species such as *Solea solea* or *Lepidorhombus* spp. (based on personal observations).

With proteins, lipids are the oocytes' main energy source in vitellus. Lipid and protein contents in ovaries differ in Pleuronectiformes [42]. Indeed, *Pleuronectes platessa* showed low ovarian lipid content (8%) with high proteins (85%), compared to other flatfishes [43]. For the European Plaice, these differences in lipid within the ovary correlate with the low presence of lipid droplets in oocytes.

4.3. Zona Pellucida Size

The *zona pellucida* (**zp**) envelopes the oocytes and is a crucial structure not only during oogenesis but also during ovulation, fertilization, and embryonic development [44–46]. Moreover, it is one of the embryonic structures that will play an important role in protecting the embryos by mitigating the effects of potentially harmful factors such as high temperatures, salinity, anoxia, and desiccation [47]. In this study, the first appearance of **zp** is noted at the cortical alveoli stage (**cao**) and progressively thickens through the stages. Similar observations have been recorded for the European Plaice [35,48]. However, this study goes further with **zp** sizes and descriptions for undischarged oocytes, with the first appearance of a **zp** in **cao**. The **zp** progressively thickens throughout the vitellogenesis process until reaching a maximum size of 53.81 μm ($\pm 5.10 \mu\text{m}$) at the late vitellogenic stage. Its composition also changes during this stage, as indicated by the evolution of the staining. The **zp** will then lose thickness during the hydration process and reach a size of 40.41 μm ($\pm 5.00 \mu\text{m}$) for undischarged hydrated

oocytes. Such a progressive reduction in **zp** thickness during hydration was already observed in various fish species [49]. Once ovulation has occurred, the **zp** will decrease further in size [50], with pelagic eggs' envelopes being much thinner than those of demersal eggs [51,52]. However, it has been previously found that the European Plaice's pelagic eggs possess an exceptionally thick **zp** of about 15 μm [51].

4.4. Hydrated Oocyte Size

In this study, the hydrated oocyte mean size prior to ovulation was 958.66 μm ($\pm 60.66 \mu\text{m}$). In previous studies, North Sea Plaice egg diameter ranged from 1.66 to 2.17 mm [53], and fresh egg mean size ranged from 1.736 to 1.966 mm for samples collected from 1984 to 1986 [54]. Other follicle sizes were measured for the Irish Sea Plaice, with an estimated follicle diameter ranging from 1.65 to 1.80 mm for a 43 cm female [55]. Another mean follicle size of 592 μm was measured for one- to two-year-old European Plaice, and a 789 μm mean size was found for individuals four years of age and older [56]. The smaller size estimated in this study could be explained by different factors. First of all, the dehydrating tissue processing method used may lead to smaller-sized oocytes. Secondly, the mean diameter was estimated through the widest diameter of sectioned oocytes, but there were no guarantees that all sections were fully transversal. Moreover, the measures ($n = 22$) were from a small-sized (21 cm for 70 g) individual sampled in 2017 that had already spawned (presence of post-ovulatory follicles). These are important facts since it has been shown that larger females often produce larger eggs [56,57], and egg size progressively decreases with each batch during the spawning season [57].

4.5. Histology for Maturity Staging

Compared to estimating sexual maturity visually through macroscopic criteria, histology was found to yield more accurate results as well as more information [10,58–61]. Adding the quantitative approach (stereology) allows for a quantification of the different structures as well as estimating their representativeness within the ovary. Even with the use of histology, it can be very difficult to distinguish immature animals from mature animals that are capable of producing hydrated oocytes but are in the resting phase if the samplings are conducted outside of the spawning period. With stereology, monthly samplings allow for the quantification of each cellular type along the oogenesis cycle. Add to that different-sized fish, and it is possible to determine size (or age) at first maturity and eventually see if there are differences in spawning times for fish of different sizes.

4.6. Size at Maturity

Identification of cortical alveoli oocytes (**cao**) is a key point in maturity staging since their formation is gonadotropin-dependent [62,63], placing them into the secondary growth oocyte category [6,63]. When distinguishing between fish with precortical alveoli oocytes, **cao**, or vit as their most advanced oocyte stages, the minimum size varies. The appearance of **cao** will be the turning point between a fish classified as sexually immature and a mature one. When classifying individuals of different sizes with **cao** as the most advanced stage, the first size at maturity is 19 cm. When using the presence of vit as the most advanced stage, the size at first maturity is 21 cm. The size at which all individuals are sexually mature is 23 cm. This, however, could be biased when taking into account the constrained sampling size as well as the sampling period. Indeed, a sampling of the spawning period could explain the presence of large individuals (24 cm and over) with precortical alveoli oocytes as the most advanced follicle stage. Moreover, increasing the sampling for small-sized individuals (between 18 cm and 24 cm) would help better define the size limit. This would also better underline the individual variability in size at first maturity for this stock.

The estimation of the size class in which 50% of the females of our sampling (L_{50}) are considered mature by stereology was 20.6 cm, very close to the minimum size of the individuals presenting vitellogenesis (21 cm). These results are well in accordance with the L_{50} calculation assumptions.

When quantifying the structure with stereology, the identification of **cao** was not always obvious, with cortical alveoli being scarce and small-sized, leading to a probable underestimation of this key germ cell. An alternative option would be to set the limit between the mature and immature states with the presence of **vit**, but as stated previously, this would lead to a difference of 2 cm for the size at first maturity. The already low size at first maturity found in this study follows the decrease in age and length at maturation that has been occurring for the past century for the European Plaice, at least since 1955 [16]. A previous study [28] showed that the Lp50 (probability of becoming mature is 50%) of four-year-old female *Pleuronectes platessa* decreased from 41.6 cm in the 1900s to 33.3 cm in the 1980s and 22.9 cm in the 2000s. The observed changes in maturation, reproductive investment, and growth seemed consistent with fisheries-induced evolution [16]. Moreover, with the current context of global changes, the evolution and availability of trophic resources could further impact the age and/or size at first maturity for this species [2]. These observations strongly underline the importance of using histology at such a fine level in order to better follow the evolution of life history traits in fish and help with fishing management regulations.

4.7. Spawning Period

Classifying the sampled individuals by the most advanced germline cell present within the ovary, by month, allowed for an illustration of the yearly cellular cycle. Precortical alveoli germ cells are present all year long and in individuals of all maturity phases. Partially hydrated oocytes are present by November for a few individuals. The first spawning takes place between December (presence of **pho**) and January (presence of **POF**). The majority of individuals had been spawned by February. This concurs with the literature stating that the spawning period for female North Sea Plaice starts in December [2] and January [37], with a peak in February [2,37]. From January to March, an increase in mature oocytes (**vit** and **ho**) may suggest another possible batch spawn by April, such as that observed by Rijnsdorp [37]. However, we observe an increase in **vit** stage oocytes from March to June, while Rijnsdorp [37] suggested a complete renewal of the oocytes in the ovary after the expulsion of hydrated oocytes, with a start of vitellogenesis in July and a marked gonadal growth by October.

4.8. Maturity Phase

The gonadosomatic index (**GSI**) clearly distinguishes female individuals classified under phase C (spawning) from other maturity phases, though it is important to note that only three individuals had been sampled for this phase. The low number of histological slides for spawning (phase C) individuals can be explained by the difficulty in obtaining exploitable cross sections from ovaries with fragile, hydrated oocytes. Phase C is considered the easiest phase to identify with the naked eye because of the presence of hydrated oocytes that can reach a diameter of more than 1 mm. Value deviations in the **GSI** for phase B can be explained by the presence of visually misclassified fish. Indeed, when looking at the histological slides, fish with the highest **GSI** classified under phase B show late-stage vitellogenic oocytes and oocytes in hydration in their ovaries.

Other misclassifications are present between phases A (immature) and D (regressing/regenerating), with individuals that have spawned classified under phase A, implying that mature and spawning-capable individuals have been classified as immature individuals. An additional misclassification is found between B and D, with 42% of individuals that have spawned being classified under phase B.

The difficulty of visually determining a maturity phase for the European Plaice has already been addressed [64], with the highest staging disagreements between immature (A) and developing (B) females. Finally, a maturity exchange workshop for *Pleuronectes platessa* [5] showed the lowest agreement of 67% for phase D and the highest agreement of 83% for phase C. The use of histology gives a more detailed resolution for maturity phase profiles compared to the **GSI** and visual maturity determination.

5. Conclusions

Spawning-capable female individuals have been identified using histology. From this, the issue of misclassification through the use of the visual maturity staging method for the European Plaice has been made clear. This allows us to validate the method of using histological criteria to classify individuals into a maturity phase. However, this study also underlined several difficulties, notably the limited number of certain individuals' sizes due to the opportunistic samplings as well as the loss of histological sections due to the fragility of the ovaries. Indeed, an accurate determination of maturity data is of utmost importance in fisheries management, regardless of the time- and resource-consuming nature of histology. The use of histology for maturity determination is not a new method, but coupling histology with stereology to assess maturity brings great flexibility to the method and may be applied to other species. However, even if similarities are found among general germline cell stages, germline cells defining a particular maturity phase must be adapted from one species to another. The next step would be to standardize these procedures through the establishment of detailed species-specific gametogenesis lexicons, a stereology reading protocol, reader calibrations, and gonad homogeneity validations. This would allow for a more objective determination of the maturity phase. Furthermore, data collection at such a fine scale may lead to the possibility of automating the reading process through image analysis and supervised learning, allowing for the analysis of a higher number of samples in a shorter time period.

Author Contributions: Conceptualization, C.S. and K.K.; data curation, C.S. and K.K.; formal analysis, C.S.; funding acquisition, L.D.; investigation, C.S., J.Q. and M.L.; methodology, C.S., J.Q., K.K., C.B., L.D. and N.E.; project administration, K.K. and L.D.; software, N.E.; validation, L.D.; writing—original draft, C.S. and K.K.; writing—review and editing, L.D., C.B., N.E. and M.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Funding for the MATO project was provided by the Direction Scientifique of IFREMER and France Filière Pêche (convention PH/2020/14).

Institutional Review Board Statement: All the samples in this study were taken from dead animals, either commercial or scientific samples. Therefore, national and European laws do not require an ethics committee's approval in this context.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All scanned histological slides as well as reading results are available on the Zenodo data repository (<https://zenodo.org/record/3463296#.ZB115PaZOF4>, accessed on 27 September 2019). For the scripts, contact the main author, C.S.

Acknowledgments: We would like to thank the coordinators of the Channel Ground Fish Surveys as well as Port-en-Bessin's fish market for fish accessibility.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Domínguez-Petit, R.; Anastasopoulou, A.; Cubillos, L.; Gerritsen, H.D.; Gonçalves, P.; Hidalgo, M.; Kennedy, J.; Korta, M.; Marteinsdottir, G.; Morgado, C.; et al. Chapter 3: Maturity. In *Handbook of Applied Fisheries Reproductive Biology for Stock Assessment and Management*; Domínguez-Petit, R., Murua, H., Saborido-Rey, F., Trippel, E., Eds.; Digital CSIC: Vigo, Spain, 2015; 196p.
2. Bromley, P.J. Growth, sexual maturation and spawning in central North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.), and the generation of maturity ogives from commercial catch data. *J. Sea Res.* **2000**, *44*, 27–43. [[CrossRef](#)]
3. Alonso-Fernández, A.; Villegas-Ríos, D.; Valdés-López, M.; Oliveira-Domínguez, B.; Saborido-Rey, F. Reproductive biology of pollack (*Pollachius pollachius*) from the Galician shelf (north-west Spain). *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **2013**, *93*, 1951–1963. [[CrossRef](#)]
4. International Council for the Exploration of the Sea Report of the workshop for maturity staging chairs. In *Workshop for Maturity Staging Chairs (WKMATCH), Split, Croatia, 11–15 June 2012*; CM 2012/ACOM: Copenhagen, Denmark, 2014; Volume 58, 52p.
5. International Council for the Exploration of the Sea. Report of the workshop for advancing sexual maturity staging in fish. In *Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF), ICES Headquarters, Copenhagen, Denmark, 30 April–4 May 2018*; ICES, CM/EOSG: Copenhagen, Denmark, 2018; Volume 38, 79p.

6. Brown-Peterson, N.J.; Wyanski, D.M.; Saborido-Rey, F.; Macewicz, B.J.; Lowerre-Barbieri, S.K. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Mar. Coast. Fish.* **2011**, *3*, 52–70. [[CrossRef](#)]
7. International Council for the Exploration of the Sea. Report of the workshop on sexual maturity staging of cod, whiting, haddock, saithe and hake. In *Workshop on Sexual Maturity Staging of Cod, Whiting, Haddock, Saithe and Hake (WKMSGAD)*; ICES, CM 2013/ACOM: Copenhagen, Denmark, 2014; Volume 57, 55p.
8. Marty, L.; Rochet, M.J.; Ernande, B. Temporal trends in age and size at maturation of four North Sea gadid species: Cod, haddock, whiting and Norway pout. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2014**, *497*, 179–197. [[CrossRef](#)]
9. Lowerre-Barbieri, S.K.; Brown-Peterson, N.J.; Murua, H.; Tomkiewicz, J.; Wyanski, D.M.; Saborido-Rey, F. Emerging issues and methodological advances in fisheries reproductive biology. *Mar. Coast. Fish.* **2011**, *3*, 32–51. [[CrossRef](#)]
10. Hunter, J.R.; Macewicz, B.J. Measurement of spawning frequency in multiple spawning fishes. *NOAA Tech. Rep.* **1985**, *36*, 79–94.
11. Rodgveller, C.J. A comparison of methods for classifying female sablefish maturity and skip spawning outside the spawning season. *Mar. Coast. Fish.* **2018**, *10*, 563–576. [[CrossRef](#)]
12. International Council for the Exploration of the Sea. Plaice (*Pleuronectes platessa*) in Subarea 4 (North Sea) and Subdivision 20 (Skagerrak). In *ICES, CM 2022/Advice on Fishing Opportunities, Catch and Effort ple.27.420*; ACOM: Copenhagen, Denmark, 2022; 12p. [[CrossRef](#)]
13. International Council for the Exploration of the Sea. Plaice (*Pleuronectes platessa*) in Division 7.d (eastern English Channel). In *ICES, CM 2022/Advice on Fishing Opportunities, Catch and Effort ple.27.7d*; ACOM: Copenhagen, Denmark, 2022; 11p. [[CrossRef](#)]
14. International Council for the Exploration of the Sea. Plaice (*Pleuronectes platessa*) in Division 7.e (western English Channel). In *ICES, CM 2022/Advice on Fishing Opportunities, Catch and Effort ple.27.7e*; ACOM: Copenhagen, Denmark, 2022; 8p. [[CrossRef](#)]
15. Rijnsdorp, A.D.; Millner, R.S. Trends in population dynamics and exploitation of North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.) since the late 1800s. *ICES J. Mar. Sci.* **1996**, *53*, 1170–1184. [[CrossRef](#)]
16. Grift, R.E.; Rijnsdorp, A.D.; Barot, S.; Heino, M.; Dieckmann, U. Fisheries-induced trends in reaction norms for maturation in North Sea plaice. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2003**, *257*, 247–257. [[CrossRef](#)]
17. Coppin, F.; Goascoz, N.; le Roy, D.; Giraldo, C. Compte-rendu provisoire de la campagne CGFS 2019 sur le N/O Thalassa/CGFS 2019. In *Survey Report*; IFREMER: Brest, France, 2019; 10p. Available online: <https://archimer.ifremer.fr/doc/00598/70986/> (accessed on 16 February 2023).
18. Gabe, M. Les méthodes de la cytologie générale. In *Techniques Histologiques*, 2nd ed.; Masson: Paris, France, 1968.
19. Sauger, C.; Quinquis, J.; Kellner, K.; Heude-Berthelin, C.; Elie, N.; Lepoittevin, M.; Dubroca, L. A macroscopic and stereological imaging dataset of *Pleuronectes platessa* ovaries. *Sci. Data* **2020**, *7*, 165. [[CrossRef](#)]
20. Glagolev, A.A. Quantitative analysis with the microscope by the ‘point’ method. *Miner. Eng.* **1934**, *135*, 399–400.
21. Goode, A.; Gilbert, B.; Harkes, J.; Jukic, D.; Satyanarayanan, M. OpenSlide: A vendor-neutral software foundation for digital pathology. *J. Pathol. Inform.* **2013**, *4*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Sauger, C.; Quinquis, J.; Dubroca, L.; Kellner, K.; Lepoittevin, M.; Heude-Berthelin, C.; Elie, N. *Protocole de Détermination des Structures Histologiques D’ovaires et de L’ovogenèse de la Plie, Pleuronectes platessa (Linné, 1758)*; IFREMER: Brest, France, 2019; 39p. [[CrossRef](#)]
23. Torrejon-Magallanes, J. sizeMat: An R Package to Estimate Size at Sexual Maturity. 2018. Available online: <https://cran.r-project.org/web/packages/sizeMat/vignettes/sizeMat.html> (accessed on 19 June 2023).
24. Tjur, T. Coefficients of determination in logistic regression models—A new proposal: The coefficient of discrimination. *Am. Stat.* **2009**, *63*, 366–372. [[CrossRef](#)]
25. Beverton, R.J.H.; Holt, S.J. Recruitment and egg production. In *On the Dynamics of Exploited Fish Populations*, 1st ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1993; pp. 44–67, ISBN 978-94-010-4934-4.
26. Mandarim-de-Lacerda, C.A. Stereological tools in biomedical research. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2003**, *75*, 469–486. [[CrossRef](#)]
27. Weibel, E.R. Selection of the best method in stereology. *J. Microsc.* **1974**, *100*, 261–269. [[CrossRef](#)]
28. van Walraven, L.; Mollet, F.M.; van Damme, C.J.G.; Rijnsdorp, A.D. Fisheries-induced evolution in growth, maturation and reproductive investment of the sexually dimorphic North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *J. Sea Res.* **2010**, *64*, 85–93. [[CrossRef](#)]
29. Cole, F.J.; Johnstone, J. *Pleuronectes* (the plaice). In *Liverpool Marine Biological Committee Memoir*; Williams & Norgate: London, UK, 1901; Volume 8.
30. Lincoln, R.F. Sexual maturation in female triploid plaice, *Pleuronectes platessa*, and plaice x flounder, *Platichthys flesus*, hybrids. *J. Fish Biol.* **1981**, *19*, 499–508. [[CrossRef](#)]
31. Barr, W.A. The endocrine control of the sexual cycle in the plaice, *Pleuronectes platessa* (L). I. Cyclical changes in the normal ovary. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1963**, *3*, 197–204. [[CrossRef](#)]
32. Barr, W.A. The endocrine control of the sexual cycle in the plaice, *Pleuronectes platessa* (L). II. The endocrine Control of Oogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1963**, *3*, 205–215. [[CrossRef](#)]
33. Barr, W.A. The Endocrine Control of the Sexual Cycle in the plaice, *Pleuronectes platessa* (L). III. The Endocrine Control of Spermatogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1963**, *3*, 216–225. [[CrossRef](#)]
34. Miossec, L. Altération de l’ovogenèse des plies *Pleuronectes platessa* L. capturées dans les abers Wrac’h et Benoît, depuis la pollution de l’Amoco-Cadiz. *Rev. Trav. Inst. Pech. Marit.* **1984**, *46*, 195–207.

35. Brule, T. The reproductive biology and the pathological changes of the plaice *Pleuronectes platessa* (L.) after the 'Amoco Cadiz' oil spill along the north-west coast of Brittany. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **1987**, *67*, 237–247. [[CrossRef](#)]
36. Murua, H.; Saborido-Rey, F. Female reproductive strategies of marine fish species of North Atlantic. *J. Northwest Atl. Fish. Sci.* **2003**, *33*, 23–31. [[CrossRef](#)]
37. Rijnsdorp, A.D. Maturation of male and female North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *J. Cons. Int. Explor. Mer* **1989**, *46*, 35–51. [[CrossRef](#)]
38. Johnson, R.B. Lipid deposition in oocytes of teleost fish during secondary oocyte growth. *Rev. Fish. Sci.* **2009**, *17*, 78–89. [[CrossRef](#)]
39. Kaitaranta, J.K.; Ackman, R.G. Total lipids and lipid classes of fish roe. *Comp. Biochem. Physiol. B* **1981**, *69*, 725–729. [[CrossRef](#)]
40. Wiegand, M. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* **1996**, *6*, 259–286. [[CrossRef](#)]
41. Baras, E.; Arifin, O.Z.; Slembrouck, J.; Subagja, J.; Kristanto, A.H.; Legendre, M. Oil globule size in fish eggs: A matter of biome and reproductive strategy. *Fish Fish. (Oxf.)* **2018**, *19*, 996–1002. [[CrossRef](#)]
42. Devauchelle, N.; Alexandre, J.C.; le Corre, N.; Letty, Y. Spawning of sole (*Solea solea*) in captivity. *Aquaculture* **1987**, *66*, 125–147. [[CrossRef](#)]
43. Devauchelle, N.; Alexandre, J.C.; le Corre, N.; Letty, Y. Spawning of turbot (*Scophthalmus maximus*) in captivity. *Aquaculture* **1988**, *69*, 159–184. [[CrossRef](#)]
44. Jalabert, B. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod. Nutr. Dev.* **2005**, *45*, 261–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Litscher, E.S.; Wassaman, P.M. Evolution, structure, and synthesis of vertebrate egg-coat proteins. *Trends Dev. Biol.* **2014**, *8*, 65–76. [[PubMed](#)]
46. Litscher, E.S.; Wassaman, P.M. *A Guide to Zona Pellucida Domain Proteins*; John Wiley and Sons: Hoboken, NJ, USA, 2015; ISBN 978-047-052-811-2.
47. Domínguez-Castanedo, O.; Uribe, M.C.; Rosales-Torres, A.M. Morphological development of the structures related to annualism in the ovarian follicle of the killifish *Müllerichthys robustus* (Costa, 1995) (Teleostei: Cyprinodontiformes). *J. Morphol.* **2016**, *277*, 1219–1230. [[CrossRef](#)]
48. Stott, G.G.; Haensly, W.E.; Neff, J.M.; Sharp, J.R. Histopathologic survey of ovaries of plaice, *Pleuronectes platessa* L., from Aber Wrac'h and Aber Benoit, Brittany, France: Long-term effects of the Amoco Cadiz crude oil spill. *J. Fish Dis.* **1983**, *6*, 429–437. [[CrossRef](#)]
49. Rizzo, E.; Moura, T.F.; Sato, Y.; Bazzoli, N. Oocyte surface in four teleost fish species postspawning and fertilization. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **1998**, *41*, 37–48. [[CrossRef](#)]
50. Berois, N.; Arezo, M.J.; Papa, N.G. Gamete interactions in teleost fish: The egg envelope. Basic studies and perspectives as environmental biomonitor. *Biol. Res.* **2011**, *44*, 119–124. [[CrossRef](#)]
51. Stehr, C.M.; Hawkes, J.W. The comparative ultrastructure of the egg membrane and associated pore structures in the starry flounder, *Platichthys stellatus* (Pallas), and pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum). *Cell Tissue Res.* **1979**, *202*, 347–356. [[CrossRef](#)]
52. Litscher, E.S.; Wassaman, P.M. Chapter eight—The fish's egg's zona pellucida. In *Extracellular Matrix and Egg Coats*; Litscher, E.S., Wassaman, P.M., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; pp. 275–305. [[CrossRef](#)]
53. Russell, F.S. *The Eggs and Planktonic Stages of British Marine Fishes*; Academic Press: London, UK, 1976; ISBN 978-012-604-050-0.
54. Hislop, J.R.G.; Bell, M.A. Observations on the size, dry weight and energy content of the eggs of some demersal fish species from British marine waters. *J. Fish Biol.* **1987**, *31*, 1–20. [[CrossRef](#)]
55. Kennedy, J.; Geffen, A.J.; Nash, R.D.M. Maternal influences on egg and larval characteristics of plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *J. Sea Res.* **2007**, *58*, 65–77. [[CrossRef](#)]
56. Horwood, J.W. Fecundity and maturity of plaice (*Pleuronectes platessa*) from Cardigan Bay. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **1990**, *70*, 515–529. [[CrossRef](#)]
57. Rijnsdorp, A.D. Changes in fecundity of North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.) between three periods since 1900. *ICES J. Mar. Sci.* **1991**, *48*, 253–280. [[CrossRef](#)]
58. International Council for the Exploration of the Sea. The DEPM estimation of spawning-Stock biomass for sardine and anchovy. In *ICES Cooperative Research Report*; Stratoudakis, Y., Bernal, M., Uriarte, A., Eds.; ICES Study Group on the Estimation of Sardine and Anchovy Spawning Biomass: Copenhagen, Denmark, 2004; Volume 268, ISBN 978-87-7482-369-8.
59. Ferreri, R.; Basilone, G.; d'Elia, M.; Traina, A.; Saborido-Rey, F.; Mazzola, S. Validation of macroscopic maturity stages according to microscopic histological examination for European anchovy. *Mar. Ecol.* **2009**, *30*, 181–187. [[CrossRef](#)]
60. Costa, A.M. Macroscopic vs. microscopic identification of the maturity stages of female horse mackerel. *ICES J. Mar. Sci.* **2009**, *66*, 509–516. [[CrossRef](#)]
61. Becker, C.; Cunningham, E.M.; Dick, J.T.A.; Eagling, L.E.; Sigwart, J.D. A unified scale for female reproductive stages in the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*): Evidence from macroscopic and microscopic characterization. *J. Morphol.* **2018**, *279*, 1700–1715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

62. Wallace, R.A.; Selman, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Amer. Zool.* **1981**, *21*, 325–343. [[CrossRef](#)]
63. Lubzens, E.; Young, G.; Bobe, J.; Cerdà, J. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2010**, *165*, 367–389. [[CrossRef](#)]
64. Gerritsen, H.D.; McGrath, D. Variability in the assignment of maturity stages of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) and whiting (*Merlangius merlangus* L.) using macroscopic maturity criteria. *Fish. Res.* **2006**, *77*, 72–77. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article 2

Citation : Sauger, C., Quinquis, J., Kellner, K., Berthelin, C., Lepoittevin, M., Elie, N., Dubroca, L. (2023) «Sexual maturity determination for the female European plaice, *Pleuronectes platessa* Linnaeus, 1758, through quantitative histology». 29pp. *En préparation*

Résumé : «A method using quantitative histology (stereology) was developed to determine sexual maturity with more accuracy than the standard macroscopic maturity staging method. Based on a point counting grid (Glagolev's method), ovarian cellular structures were quantified throughout the whole cross section of 151 *Pleuronectes platessa* individuals. Cellular homogeneity in the anterior, median and posterior section of both ovaries from 15 fish was validated and a reading protocol was set up to limit subjectivity during stereology readings. Once the ovarian structures quantified for 151 individuals, a model was set up following the standardized staging grid of the International Council for the Exploration of the Sea (ICES), classifying each sampled individual into a maturity phase. These results showed that 34.6 % of the time Immature (A) individuals were correctly identified, but 57.1 % developing (B) individuals were classified under A when using the visual macroscopic method, while individuals that had finished spawning were correctly identified as such 80.4 % of the time. Finally, maturity ogive and the length at which 50 % of the population is sexually mature (L50) was calculated, with a L50 of 28.6 cm when using the macroscopic method and a L50 of 20.6 cm with a maturity phase estimated under the stereological method.»

Contribution : Création, conception et rédaction de l'article, avec récolte et traitement des échantillons, lectures des des lames histologiques en stéréologie et analyse des résultats

Sexual maturity determination for the female European plaice, *Pleuronectes platessa* (Linnaeus, 1758), through quantitative histology

Authors

Carine Sauger¹, Jérôme Quinquis¹, Kristell Kellner², Clothilde Heude-Berthelin², Mélanie Lepoittevin², Nicolas Elie³, Laurent Dubroca¹

Affiliations

1 : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER). Ifremer, HMMN, Laboratoire Ressources Halieutiques, F-14520 Port-en-Bessin, France

2 : University of Caen-Normandie, Unity Biology of Organisms and Aquatic Ecosystems (UMR 8067 BOREA), MNHN, Sorbonne University, UCN, CNRS, IRD, UAG, Esplanade de la Paix, 14032 Caen, France

3 : Université de Caen-Normandie, Structure Federative 4207 'Normandie Oncologie', PLATON Services Unit, VIRTUAL'HIS, 14000 Caen, France

Corresponding author(s): Carine Sauger (carine.sauger@gmail.com), Laurent Dubroca (laurent.dubroca@gmail.com)

Abstract

A method using quantitative histology (stereology) was developed to determine sexual maturity with more accuracy than the standard macroscopic maturity staging method. Based on a point counting grid (Glagolev's method), ovarian cellular structures were quantified throughout the whole cross section of 151 *Pleuronectes platessa* individuals. Cellular homogeneity in the anterior, median and posterior section of both ovaries from 15 fish was validated and a reading protocol was set up to limit subjectivity during stereology readings. Once the ovarian structures quantified for 151 individuals, a model was set up following the standardized staging grid of the International Council for the Exploration of the Sea (ICES), classifying each sampled individual into a maturity phase. These results showed that 34.6 % of the time Immature (A) individuals were correctly identified, but 57.1 % developing (B) individuals were classified under A when using the visual macroscopic method, while individuals that had finished spawning were correctly identified as such 80.4 % of the time. Finally, maturity ogive and the length at which 50 % of the population is sexually mature (L50) was calculated, with a L50 of 28.6 cm when using the macroscopic method and a L50 of 20.6 cm with a maturity phase estimated under the stereological method.

Key Words

Maturity determination ; Stereology ; Human assessment ; inter-rater reliability ; Histology ; Oogenesis

Introduction

Maturity is an important life history trait that defines a population's dynamics (Domínguez-Petit *et al.*, 2017) and can be used to quantify the reproductive capacity of individual fish (Murua *et al.*, 2003). In fisheries' stock assessments, demographic models are based on length composition from commercial catches and fishing surveys (Domínguez-Petit *et al.*, 2017; Bromley, 2000). In this regard, an accurate determination of the length or age at which a commercial stock species has reached sexual maturity ensures a precise appraisal of its size and reproductive capacity (Alonso-Fernández *et al.*, 2013; FAO, 2018). Moreover, factors such as the maturity ogive (Bromley, 2000; Flores *et al.*, 2015) and the length at which 50% of the population has reached sexual maturity (L50) (Mahé *et al.*, 2007) are extracted from maturity data and are used in stock assessment models. This makes maturity data a basic information for the estimation of the number of mature individuals within a stock, also known as the Spawning Stock biomass (SSB) (Domínguez-Castanedo *et al.*, 2016). The SSB being an important variable in fisheries management (Armstrong *et al.*, 2001) for its use in population dynamic models and estimating the Total Allowable Catch (TAC) for stock species, from one year to the next (Bromley, 2000; Domínguez-Castanedo *et al.*, 2016).

For maturity determination, many different maturity scales and terminologies can be found throughout the literature when classifying the ichthyological reproductive cycle (Brown-Peterson *et al.*, 2011; ICES, 2018a, 2014a). Moreover, these maturity scales are in constant evolution and will differ from one institution to the other (ICES, 2018a). Since the early 2000s, the ICES has worked towards harmonizing the terminologies and scales used within different European institutions in order to better homogenize these practices (Brown-Peterson *et al.*, 2011; ICES, 2018a, 2014a, 2012, 2010, 2008). The most common method used to determine sexual maturity in fish is a visual observation of the gonads (Gerritsen & McGrath, 2006; Brown-Peterson *et al.*, 2011; Flores *et al.*, 2015; ICES, 2018a). Unfortunately, this simple and swift method leads to uncertainties in the identification of the maturity phase through the use of subjective criteria, such as the texture, color or size of the gonads (Brown-Peterson *et al.*, 2011; Gerritsen and McGrath, 2006). Disagreements between maturity estimators is a common problem, with higher uncertainties that may even be found when estimating immature individuals and individuals that have reached first maturity (ICES 2018b, 2013).

In this study, the plaice (*Pleuronectes platessa*, Linné 1758) was chosen as a model species to address this issue. The plaice is a well-studied commercial species that ranges from the west of the Mediterranean sea, along the European coast, and reaches the Icelandic waters while passing through the North sea and the Skagerrak (Hoarau *et*

al., 2002; ICES, 2014b; IFREMER, 2011). This teleost is a synchronous batch spawner (Rijnsdorp, 1989; Murua & Saborido-Rey 2003), meaning that the females will spawn a portion of their eggs at multiple intervals in the spawning season (Brown-Peterson *et al.*, 2011). The spawning season for the plaice spans from December to March (Bromley, 2000; Brule, 1987; Cushing, 1969; Dawson and Grimm, 1980; Hoarau *et al.*, 2002), and females reach sexual maturity at 4 or 5 years of age (ICES, 2014b; IFREMER, 2011). During macroscopic sexual determination for plaice, Gerritsen and McGrath (2006) found that the percentage agreement between readers ranged from 40% to 94%, depending on the maturity phase. Moreover, a Workshop organized by the International Council for the Exploration of the Sea (ICES) in 2012 estimated that the overall agreement for plaice maturity staging was of 80%, with a percentage agreement between readers that varied from 67% to 83% depending on the maturity phase. Only female gonads were analyzed, with female gametes being easier to observe through their larger size compared to male gametes, as well as bringing information on egg production for reproductive capacity estimations in stock assessments (Brown-Peterson *et al.*, 2011).

To provide a more accurate identification of an individual's maturity phase, methods like histology and whole mounts may be used (Domínguez-Petit *et al.*, 2017), with histology being the more precise method that also yields more information (Hunter and Macewicz, 1985). This led to the use of histology on an individual's gonads to classify the sampled fish within a maturity phase (Brown-Peterson *et al.*, 2011; Hunter and Macewicz, 1985). In our case, histology and stereology were used to quantify the different cellular structures found within the plaice's ovaries, with stereology defined as "*a body of mathematical methods which relate parameters defining 3-dimensional structures to measurements obtainable on 2-dimensional sections*" (Weibel, 1974). Even though histology takes out a lot of the subjectivity during the maturity determining process, it is not perfect. First, cell identification may also be biased depending on the reader. Secondly, there is the issue of whether cell distribution is homogenous throughout the entire gonad, and between the gonads of a same individual. If that is not the case, then there is a risk of obtaining different results depending on the location of the histological cross section. Finally, there's the difficulty of classifying an individual into a maturity phase based on cell counts.

To resolve the problem regarding cell identification, a lexicon of the different cellular structures, as well as an identification protocol, was set up to minimize the reading bias between operators. Calibration exercises between reading operators were also put in place. Homogeneity was then verified between and within the gonads of a same individual, a general linear model was done on the cell counts of cross sections taken at different areas of a same gonad, and that for different individuals. In regard to the rules used to classify the individuals into a maturity phase by using the cell counts, the definitions and staging grids of Brown-Peterson *et al.*, (2011) and the ICES (WKASMSF

2018a, WKMATCH 2012) were applied. Once the individuals were categorized into a maturity phase, classification trees were put in place to link macroscopic parameters with the plaice's maturity phases. Finally, to assess the results obtained through visual readings and through the stereological method, a confusion matrix was set up (Figure 1).

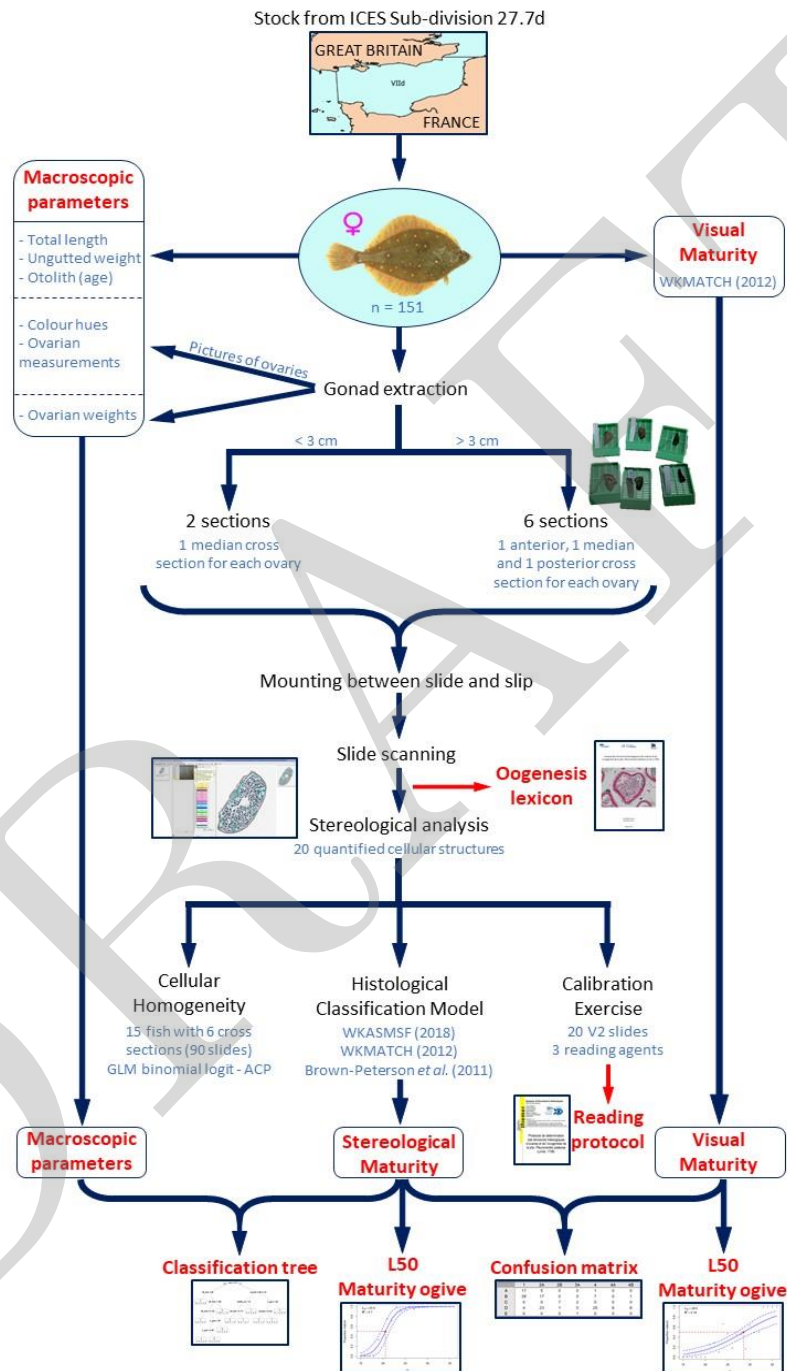


Figure 1 : Summary of the material and methods, as well as results, of the current study

Material and methods

A. Sampling

A detailed breakdown of the methods applied in this study has been published in a data paper describing the data set used (Sauger *et al.*, 2020). A total of 151 female plaice were collected by bottom trawling in the English Channel (ICES division VIIId). The specimens were gathered during 10 different sampling events, from January 2017 to August 2019 (Table 1). Each fish was measured (total length (cm)), weighted (ungutted weight (g)) and aged through otolithometry. An experienced operator estimated each female's sexual maturity with the naked-eye, while following the maturity staging grids of the ICES (WKMATCH, 2012).

Table 1 : Summary of the number of female plaice sampled per year and per month for this study

Month	Year	Number of fish sampled
January	2017	5
December	2017	5
March	2018	10
June	2018	12
November	2018	14
December	2018	10
January	2019	24
February	2019	23
March	2019	30
August	2019	18

B. Full ovarian photographs

Both ovaries were extracted prior to being photographed using a digital camera (Nixon D3200). The ovaries were positioned onto a uniform colored background, next to a 0.50€ coin that served as a fixed size marker. The Image J software (v. 1.50J) was used to analyze the photographs and quantify the color hues, as well as the macroscopic parameters, of each ovary: surface (mm²), length (mm), width (mm), width at mid-length (mm).

C. Gonad extraction, fixation and mount between slide and slip

Ovaries were cut and placed into tissue processing embedding cassettes. For ovaries of 3 centimeters and over, the dorsal ovary (coded D) and ventral ovary (coded V) were cut into 3 sections of 1cm. These sections were located in the anterior (coded 1), median (coded 2), and posterior (coded 3) area of each ovary. Each sample was placed into a cassette, with an identification tag.

The tissue processing embedding cassettes were placed for 48 hours into a Davidson solution, for tissue fixation, before being placed into an automate (Leica TP1020) for dehydration and paraffin embedding. The ovarian samples were then cut into 5 microns thick sections, using a microtome (HM330). These sections were placed onto a slide, deparaffinized, rehydrated, stained in Prenant-Gabe's Trichrome (Gabe, 1968) and mounted with Roti-Histokitt®.

D. Slide scanning and stereological readings

Each slides were digitized using an histology slide scanner Aperio CS, running under the Scan Scope Console software (v.10.2.0.2352, Leica Biosystems), with a magnification of 20x (numerical aperture 0.75). The Aperio software (v12.1.0.5029) assisted with the counting of the 20 different types of cellular structures found within the ovarian scans, using stereological analysis based on Glagolev's method (Glagolev, 1934), an assumption-based stereological method that uses a grid of points to estimate the different structures' areas on the total amount of points sampled. The counted percentage of each structure (*fract_estim*) was then calculated.

$$\mathbf{fract_estim} = (100 / \mathbf{total_points}) * \mathbf{hit_points}$$

fract_estim : Percentage (%) of times the structure was counted

total_points : Total number of sampling points counted during the stereological analysis on the histological slide

hit_points : Number of times a structure was counted on the histological slide

The 20 structures identified within the plaice's oogenesis cycle (Table 2) were described in a lexicon (Sauger & Kellner, 2019) as well as in an article (Sauger *et al.*, 2023). A total of 226 histological slides were read using the aforementioned stereology method, with 151 slides of the median section of the ventral ovary (V2) read for maturity

staging. Prior to the reading of the 226 slides, 20 slides of the median section of the ventral ovary (V2) were used for the agent calibration exercise. The calibration exercise consisted in having three agents read the exact same 15 slides, and to apply a reading error index for each cellular structure. If a structure showed a difference of over 3% between the readers, the slides were reviewed and identification rules were set up under a reading protocol (Sauger *et al.*, 2019b). The previous 15 slides were then read a second time by the same three agents. The results from both readings of the calibration exercise led to the quantification of a reading disagreement percentage between the three agents and for each slide through the use of two inter-rater reliability indexes; the percentage agreement between readers (McHugh, 2012), and Fleiss's kappa (Conger, 1980; Hallgren, 2012).

Table 2 : List of the 20 cellular structures, and their abbreviations, used for the stereologic counts

Abbreviation	Structure name
ov	oogonium
op1	Premature stage 1 oocyte
op2	Premature stage 2 oocyte
oca	Cortical alveoli oocyte
vit1	Oocyte in early vitellogenesis
vit2	Oocyte in vitellogenesis with nucleus migration
vit3	Oocyte in vitellogenesis with zona pelucida growth
vit4	Oocyte at the end of vitellogenesis
och	Oocyte in hydration
oh	Hydrated oocyte
POF	Post-Ovulatory Follicle
L	Lysis
oaA	Oocyte in atresia alpha
oaB	Oocyte in atresia beta
pg	Gonadal wall
tc	Connective tissue
cs	Blood vessel
ei	Intercellular space
v	Unnatural emptiness
i	Undetermined

E. Cellular homogeneity

For a detailed view of the analyses of this section, refer to the supplementary data.

To assess cellular homogeneity within the ovary, and between the ventral and dorsal ovaries, 6 slides matching the anterior, median and posterior sections of the dorsal and ventral ovaries, respectively coded D1, D2, D3 and V1, V2, V3, were read. The 15 sampled ovaries did not show oocytes with advanced vitellogenesis (**vit4**), hydrating oocytes (**och**) or hydrated oocytes (**oh**).

All computations were performed under RStudio (v1.2.5001). Once all 90 slides were read, the reading error index (in %) was calculated for each type of cellular structure. For all 15 individuals, histograms figuring the number of times each cellular structure was counted were established to better visualize the results. Afterwards, general linear models (GLM) were performed to check the effects of the section position within the gonad, as well as cellular structure occurrences within these sections. The response variable used was the number of times a structure was counted on a single slide divided by the total number of sampled points on that same slide. The error term followed a binomial distribution, and a *logit* regression model was used (Zuur *et al.*, 2008; Chessel & Thioulouse, 2013). The model results were then analyzed by using the deviances of each variable (the 20 cellular structures). The function *drop1* (Zuur *et al.*, 2008) was used to quantify the deviances of each variable by removing them from the whole model alternatively. A principal component analysis (PCA) on the histological structures were established to summarize and plot the reading data.

F. Maturity phase determination

Following the ICES definitions and staging grids (WKASMSF 2018a, WKMATCH 2012), as well as the terminologies from Brown-Peterson *et al.*, (2011), for gonochoristic oviparous female marine teleosts, Table 3 was established. From these documents, Table 4 was also established, recapitulating macroscopic and microscopic ovarian criteria for the different maturity phases, as well as the stereological criteria used to classify the 151 sampled fish into the corresponding maturity phase. Using the stereological reading results of the median ovarian sections (V2), R Studio was used to classify the 151 samples into either the Immature (A), Developing (B), Spawning (C) or Omitted spawning (E) maturity phase. All remaining samples not classified into one of the 4 previously stated phases were put under the Regressing/Regenerating phase (D) as shown in Table 3 (Histological model).

Once each fish was classified into a maturity phase, a confusion matrix between the visually estimated maturity phase and the stereologically estimated maturity phase was established. Classification trees were then set up using the stereologically determined maturity phases coupled with macroscopic parameters that could easily be measured or collected on the field : month at which the fish was sampled, total fish length, ungutted fish weight, fish's age, length of the ventral ovary, width of the ventral ovary, width at mid length of the ventral ovary and the ratio between the ventral ovary's length and the fish's total length. Finally, the maturity ogive and the length at which 50% of the population has reached sexual maturity (L50) were calculated using the sizeMat package (Torrejon-Magallanes, 2018). Maturity ogive and L50 were calculated with the visual maturity data and with the stereological maturity data.

State	Phase
SI (Sexually Immature) Specimens that are without gonadal development. An individual will be SI only once in its life.	A (Immature) Initial phase in the reproductive cycle, with individuals that have never reproduced before, and will not produce gametes in the current spawning cycle.
	B (Developing) Phase spanning from the beginning of the breeding season to before the individual spawns, with the production of follicle-stimulation hormone (FSH) and subsequent estradiol. Vitellogenin is found in blood plasma and/or yolk granules are seen in oocyte cytoplasm. For species with a reproductive cycle longer than a year, this phase can be divided into two sub-phases: Ba & Bb
SM (Sexually Mature) Specimens that have a gonadal growth and a gamete development that is gonadotropin dependent (production of sex steroids and activation of related hormonal receptors). Once an individual is SM , it will remain in that state until the end of its life. An individual in the SM state will not always take part in the current spawning season.	Ba (Developing but functionally immature) Only for species with a reproductive cycle longer than one year, and the individual is in the first year of development. The gonad has undergone development, but it is unclear if it will spawn during the current year, or if it is developing for the first time. Will not take part in the current spawning season.
	Bb (Developing but functionally mature) Only for species with a reproductive cycle longer than one year. Individuals will spawn during the current year (vitellogenic oocytes are more advanced than in Ba).
	C (Spawning) This phase helps to define the spawning season: females are ovulating or releasing eggs. Gonadotropin production switches to luteinizing hormone (LH) and sex steroids become maturation inducing steroids (MIS). Usually a very short phase for total spawners, individuals are developmentally and physiologically able to spawn, but do not spawn or release gametes continuously. For batch spawners, or if there is a need to separate individuals who are very close to spawning, this phase can be divided into two sub-phases: Ca & Cb Other sub-phases related with spawning activity can be defined if necessary
	Ca (Spawning capable) Spawning is imminent or specimen has already initiated spawning. In batch spawners, at least one batch has been produced. This sub-phase is the period between batches. In total spawners, this is a short sub-phase right before spawning.
	Cb (Actively spawning) Sub-phase characterized by the ovulation of oocytes, or other signs of ovulation (hydrated oocytes are present, fertilized eggs/embryos are observed in viviparous fish, oocytes are in the oviduct for cephalopods, visible eggs are seen in crustaceans)
	D (Regressing/Regenerating) Long phase for most of species, this period spans from the end of the spawning period to the start of the next breeding season. This phase includes both the regressing and recovering sub-phases, but is generally considered as a single phase. When the regenerating phase can be confused with the immature or omitted spawning phase, on a macroscopic level, two separate sub-phases can be used.
	Da (Regressing) During this phase, the ovary reabsorbs material from previous activity. Egg production is finished. Massive atresia after spawning is also a sign of regression.
	Db (Regenerating) Only for iteroparous species, with an important metabolic and physiological activity in the ovary as it is reorganized to prepare for the next reproduction cycle. Gametes undergo active gonadotropin independent mitotic proliferation (oogonias and primary growth oocytes). Regeneration time is influenced by biological and/or environmental factors, and ends with the start of the new breeding season. For some species, ovaries in Db and A can be very similar to the naked eye.
	E (Omitted spawning) This phase includes both : individuals developing oocytes for the first time but will cancel their development without ever having contributed to the egg production, and individuals that have previously spawned but will skip the current spawning season. During this phase, massive atresia can be observed (at least 50% of oocytes are in atretic conditions) and no hydrated oocytes were released. Will not take part in the current spawning season.
	F (Abnormal) This phase is for individuals that show problems in the development of the gonad (necrosis, sclerosis, intersex in gonochoristic species), or when a part, or the majority, of the gonad looks unhealthy. This category is not to be used for individuals that are in an undetermined maturity phase, that are difficult to classify, or that show massive atresia. Will not take part in the current spawning season.

Table 3 : Definitions of the sexual states and maturity phases in teleosts. Based on ICES WKMATCH (2012), WKASMSF (2018a), Brown-Peterson *et al.* (2011). With PG: primary growth; CA: cortical alveolar, Vtg1: primary vitellogenic; Vtg2: secondary vitellogenic; Vtg3: tertiary vitellogenic, OM: oocyte maturation, GVM: germinal vesicle migration, GVBD: germinal vesicle breakdown.

Table 4 : Terminologies used by the ICES for maturity staging, and descriptions of the sexual state, maturity phase, macroscopic and histological criteria of teleosts, based on the definitions and descriptions of the ICES (WKMATCH & WKASMSF) and Brown-Peterson *et al.* (2011). Histological models used to classify each fish into their corresponding sexual maturity phase, using the structure percentages quantified through stereology, all based on the previously stated definitions and terminologies

State description	Phase		Old terminology (ICES 2012)		New terminology		Macroscopic criteria		Histological features		Histological model
		Possible sub-phase	Possible sub-phase	Possible sub-phase		Possible sub-phase			Possible sub-phase		
SI : Sexually immature, (without gonad development)	Immature		I	A	Small pinkish and translucent (often clear) ovaries shorter than 1/3 of body cavity. Indistinct blood vessels and no visible eggs		Only oogonia and PG oocytes present containing no oil droplets, rare atresia, no muscle bundles. Thin ovarian wall, scarce connective tissue around follicles and little space between oocytes			Presence of either ov , op1 or op2 cells Absence of oca , vit1 , vit2 , vit3 , vit4 , och , oh and POF	
SM : Sexually mature (with gonad development)	Developing	Developing but functionally immature (first-time developer)	IIa	Ba	Enlarging ovaries, blood vessels become more distinct	Small pinkish/reddish ovaries shorter than 1/2 of the body cavity. Eggs not visible to the naked eye	Marked increase in oocyte size, blood vessels become more distincts, PG, CA oocytes present. Vtg1 and Vtg2 oocytes can also be present. No POF. No Vtg3 oocytes. Some atresia may be present.			Presence of either oca , vit1 , vit2 or vit3 cells Absence of vit4 , och , oh , oaB and POF A percentage count of oaA of less than or equal to 50% of the total follicles quantified	
		Developing but functionally mature	IIb	Bb		Pinkish-reddish/reddish-orange and translucent ovaries that have a length of about 1/2 of the body cavity. Visible blood vessels, no visible eggs					
	Spawning	Actively spawning	IIIa	Ca	Large ovaries, blood vessels prominent, individual oocytes visible macroscopically	Pinkish-yellow ovaries with a granular appearance and a length of about 2/3 of the body cavity. Eggs are visible to the naked eye through the <i>ovarian tunica</i> which is not yet translucent. No eggs are expelled under light pressure	Oocytes at the end of GVM, GVBD, hydration or ovulation are present. Recently collapsed POF can be present			Ca : Presence of either vit4 , och or oh cells Absence of oaB A percentage count of oaA of less than or equal to 50% of the total follicles quantified A percentage of POF that does not exceed the number of oh	
		Spawning capable	IIIb	Cb		Orange-pink ovaries with conspicuous superficial blood vessels and a length from 2/3 to full length of the body cavity. Large, transparent, ripe eggs are clearly visible and can be expelled under light pressure, or escape freely					Vtg3 oocytes are present. Early stage of OM can be present. No POF. Atresia of vitellogenic or hydrating oocytes may be present
	Regression / Regeneration	Regression	VIa	Da		Reddish ovaries of about 1/2 of the body cavity length. Flaccid ovarie walls, prominent blood vessels, and possible remnants of disintegrating opaque and/or translucent eggs	Atresia (any stage) and POF are present. Some healthy CA and/or Vtg1, Vtg2 oocytes present				
		Regeneration	VIb	Db		Small pinkish and translucent ovaries that have a length of about 1/3 of the body cavity, with reduced but present blood vessels. No visible eggs					Only oogonia and PG oocytes present. Oil droplets can be seen in PG oocytes (species dependent). Muscle bundles, enlarged blood vessels, thick ovarian wall and/or atresia or old, degenerating POF may be present. There is more space and interstitial tissues around PG oocytes
	Omitted spawning		V	E			No POF and at least 50% of the vitellogenic oocytes are atretic			Absence of POF A percentage count of oaA of more than 50% of the total follicles quantified	
	Abnormal		VI	F		Problems in the gonad development (necrosis, sclerosis, intersex, majority of the gonad that looks unhealthy)					

Results

A. Inter-rater reliability percentage

The calibration exercise, between three agents, for the stereology reading of 20 histological sections, was composed of two readings. Between the first and second reading, a stereology reading protocol (Sauger *et al.*, 2019b) was set up so that all agents followed the same reading method. The inter-rater reliability percentages of the second reading (Table 5) went from 69.0 % to 87.8 % for the percentage agreement for 12 slides, and from 67.2 % to 89.0 % for Fleiss' kappa for 20 slides. The mean value for the percentage agreement was of 79.2 % (± 6.1 %) while Fleiss' kappa was of 80.5 % (± 5.6 %). While the inter rater reliability was estimated with a percentage agreement and Fleiss' kappa for the last stereological slide reading, the first readings were not recorded so the evolution of the reading method before and after the reading protocol was set up could not be compared.

Table 5 : For all 20 slides, percentage agreement (Agree %) and Fleiss' kappa (%) between 2 or 3 readers. With the Agree % for 3 or more readers and Fleiss' kappa for n readers and the Slide ID the identification tag given the ovarian section that was read under stereology.

Slide ID	Number of raters	Agree (%)	Fleiss' Kappa (%)
P 230117 7D 22 88 F1	3	71.9	73.7
P 230117 7D 19 72 F1	3	77.7	79.9
P 210117 7D 23 130 F1	3	76.6	78.5
P 110618 7D 31 297 F2A V2	3	83.3	85.2
P 110618 7D 30 257 F4 V2	3	87.2	88.2
P 110618 7D 30 243 F2A V2	3	76.2	67.2
P 110618 7D 29 237 F4 V2	3	87.8	89.0
P 110618 7D 28 249 F2A V2	3	73.4	76.4
P 110618 7D 28 227 F2A V2	3	69.0	71.9
P 110618 7D 27 225 F4 V2	3	85.7	86.6
P 110618 7D 27 215 F4 V2	3	81.6	83.6
P 110618 7D 27 206 F2A V2	3	79.8	82.0
P 110618 7D 28 247 F4 V2	2	NA	82.9
P 220117 7D 23 116 F1	2	NA	77.7
P 230117 7D 21 80 F1	2	NA	79.8
P 150318 7D 36 523 F4 V2	2	NA	81.0
P 150318 7D 31 287 F4 V2	2	NA	84.9
P 150318 7D 30 302 F4 V2	2	NA	82.7
P 150318 7D 30 271 F4 V2	2	NA	83.7
P 150318 7D 29 282 F2A V2	2	NA	74.5

B. Inter and intra gonad homogeneity

Results of the *drop1* function (Table A supplementary materials) show the variance *slide* (identifying the sampled individuals) to always have the highest deviance, and thus best explains the models for all cellular structures. All *position* variables (position of the section within the gonads) have a lesser effect on our models than *slide*, even with very significant p-values ($P(\text{Chi}) < 0.001$). The presence of the cellular structure oogonium (**ov**), does not seem significantly affected by the individual (*slide*) or the position for the section (*position*). However, the deviances are very low compared to the other models. This could be explained by the fact that these cellular structures are of very small size, and thus may be present on a slide but not recorded. The percentage of estimated **ov** does not reflect reality. A principal component analysis (PCA) visually confirms these results (Figure 2).

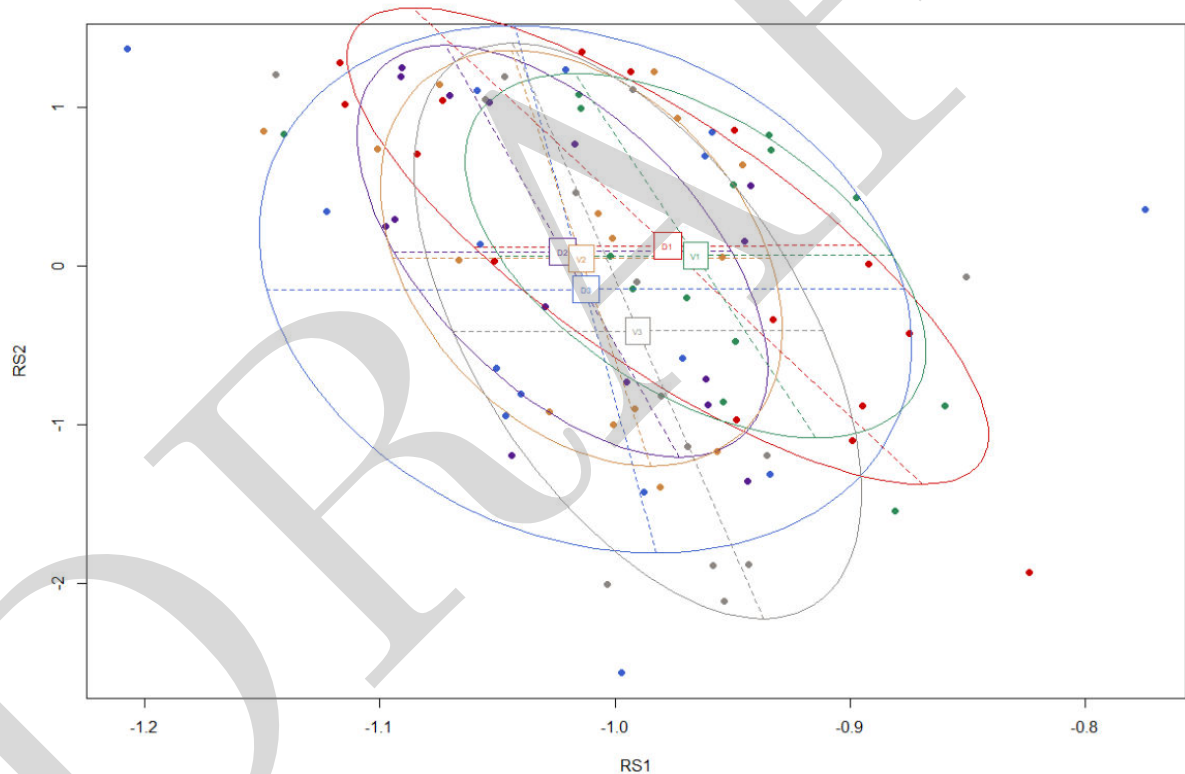


Figure 2 : Principal component analysis (PCA) graphical output for the 90 histological slides read for $n = 15$ individuals, with the 6 different section positions color coded (D1 red, D2 purple, D3 blue, V1 green, V2 peru, V3 gray). 95.4 % of the variation expressed on both axis.

C. Maturity phase classification

To make use of the stereological method to classify each fish into a maturity phase, the cellular counts of the structures found within the ovaries, were applied. Moreover, the rules set to classify the fish into a maturity phase were based on the descriptions of the histological features of the ovaries from the WKMATCH (ICES, 2012), the WKASMSF (ICES, 2018a) and Brown-Peterson *et al.*, (2011). The rules set are as followed (Table 4, last column):

For the immature (A) individuals, the histological features state that only oogonia and primary growth oocytes are present, the ovarian wall is thin and the connective tissue is scarce. To abide by those rules, individuals classified into this phase only showed oogonia (**ov**), premature stage 1 oocytes (**op1**) and premature stage 2 oocytes (**op2**). All other follicle types could not be present on the cross section.

With individuals found in the developing stage (B), we enter the sexually mature state. It is important to note that, by definition, an individual will leave the sexually immature state when cortical alveoli oocytes are produced. In this regard, all ovarian cross sections must have follicles at the cortical alveoli stage, or follicles at later stages, in order to be classified into one of the phases found within the sexually mature state.

From a histological point of view, the oocytes will increase in size, blood vessels become more distinct and follicles from primary growth oocytes to secondary vitellogenic (Vtg2) oocytes can be present, with at least cortical alveoli oocytes or later staged follicles. Tertiary vitellogenic (Vtg3) oocytes and post-ovulatory follicles (**POF**) must not be present. The model will classify individuals into the developing (B) phase when the following criteria are respected:

- presence of either cortical alveoli oocytes (**oca**), oocytes in early vitellogenesis (**vit1**), oocytes in vitellogenesis with nucleus migration (**vit2**) or oocytes with *zona radiata* growth (**vit3**).
- a count of *alpha* atretic oocytes (**oaA**) of less than or equal to 50% of the total follicles quantified.
- absence of post-ovulatory follicles (**POF**), *beta* atretic oocytes (**oaB**), oocytes at the end of vitellogenesis (**vit4**), oocytes in hydration (**och**) and hydrated oocytes (**oh**).

The histological features for the spawning (C) phase are split into two. The first feature description aims to identify ovaries that are at the beginning of the spawning phase, stating that Vtg3 oocytes are present, early stage of maturing oocytes can be present,

atresia of vitellogenic or hydrating oocytes may be present, and there can be no **POF**. The classifying model takes into consideration the absence of **POF**, but also adds the absence of *beta* atretic oocytes, further eliminating any slides that show signs of spawning. Moreover, the maturing follicles such as **vit4**, **och** or **oh** are present, and alpha atretic oocytes must represent 50% or less of the follicles quantified.

The second histological feature description aims to identify ovaries at the end of the spawning phase. The ovaries are described as potentially having oocytes at the end of the germinal vesicle migration, oocytes with germinal vesicle breakdown, and oocytes in hydration or ovulation. Recently collapsed **POF** can be present. The model set up states that, follicles such as **vit4**, **och** or **oh** are present, *alpha* atretic oocytes represent 50% or less of the oocytes quantified, *beta* atretic oocytes must be absent, and the number of **POF** does not exceed the number of **oh** quantified. The last two rules mark the limit between ovarian slides that are to be classified into the spawning (C) phase and those that are to be classified under the D (regressing/regenerating) phase. They allow for the presence of **POF**, but take into consideration that if there are more **POF** than hydrated oocytes, then the individual has finished spawning, especially if *beta* atretic oocytes are already present. Finally, in this model, the presence of oocytes with germinal vesicle migration (**vit2** in our case) has been bypassed since the migration of the nucleus, for the plaice, occurs at the beginning of the vitellogenesis, when individuals are still considered to be in the developing (B) phase.

The histological features for omitted spawning individuals is characterized by the absence of **POF** and with at least 50% of the vitellogenic oocytes in atresia. The model set up to classify the slides takes into consideration these two premises. To make sure that no slide is misclassified, the previously stated models for phase B and C include a rule that if a count of more than 50% of **oaA** is present, they are not to be classified into one of the previous stages, even if they possess the right cellular criteria, allowing them to be classified into the E phase.

In regard to the regressing (Da) and regenerating (Db) phases, the Da phase is defined by the presence of atresia, **POF** and some cortical alveoli and/or Vtg1, Vtg2 oocytes. The Db phase is characterized by the presence of solely oogonia and PG oocytes, with the potential presence of muscle bundles, enlarged blood vessels, thick ovarian walls and/or atresia or old, degenerating **POF**.

The previously set up models do not intersect with one another, leaving any unclassified individuals to be categorized under the D phase. Setting up models to separate these individuals into two sub-phases would mean to add percentages to certain cellular structures or to infer a quality to the follicles, which would add subjectivity.

Finally, the features such as the gonadal wall thickness, the intercellular space and the connective tissue, they were not implemented into the models. Indeed, with no definite possibility to quantify what is to be considered a “thin” or “thick” ovarian wall, or even what percentage of connective tissue, intercellular space or blood vessels, is to be considered as being “scarce” or “a lot”, using this data would only have added subjectivity into our models. Moreover, these features could have led to a bias since the proportion they occupy on a cross section can be affected by the quality of the slide. Indeed, if the ovary has been nicked during the sampling, this could lead to missing tissues for the ovarian wall. A fresh ovary that has been stretched out during the extraction or during the cut into a smaller sample, could show a lot of intercellular space. Finally, oocytes in the late stages of vitellogenesis tend to get ripped off the slide during the microtome cutting process. This leads to slides with missing oocytes that can not be identified, or presence of “fake” intercellular space. The same problem also applies to connective tissue that, stretched out too thin at those later stages, also tends to be ripped away during the mounting process.

D. Histological and visual maturity

By giving each of the 151 sampled fish a maturity phase through macroscopic criteria (1, 2A, 2B, 3A, 4, 4A, 4B) and a stereologically determined maturity (A, B, C, D, E), a confusion matrix (Table 6) showed that 34.6 % of the individuals visually classified as Immature (1) were also placed under that same phase (A) by using the stereology method. However, 57.1 % of the individuals visually classified as Immature (1) were placed under the Developing (B) stage by using the stereology method. For the individuals visually categorized under the Developing (2) stage, 32.0 % were also classified under that same stage (B) through the use of stereology, while 45.2 % fell under the Regressing/Regenerating (D) phase. 66.6% of individuals visually estimated to be in the Spawning phase (3) were found to be in that same phase (C) by using the stereology method. For individuals visually classified under the Regressing/Regenerating (4) phase, 80.4 % were also found to be in that same phase (D) with the stereology method. Finally, while no individuals were found to be omitted spawners when visually classifying their maturity phase, one individual was found to be an omitted spawner (E) when using the stereology method.

Table 6 : Confusion matrix for all 151 female plaice classified into a Visual maturity phase (1, 2A, 2B, 3A, 4, 4A, 4B) and an histological maturity phase (A, B, C, D, E). With Immature (A & 1), Developing (B & 2A & 2B), Spawning (C & 3A), Regression/Regeneration (D & 4 & 4A & 4B) and Omitted spawning (E)

	1	2A	2B	3A	4	4A	4B
A	17	5	0	0	1	0	0
B	28	17	0	0	7	0	1
C	0	0	7	2	0	0	0
D	4	23	1	0	25	6	6
E	0	0	0	1	0	0	0

The classification tree (Figure 3) has a root node error of 55.4 % (n = 146). The first node is the ratio between the ventral ovary's length and the fish's total length ($rap < 0.17$). This first node separates all Immature (A) individuals from all Spawning (C) individuals. Individuals in the Developing (B) phase are found throughout the entire tree. Individuals in the Spawning (C) phase are found in months 11 and 12. However, all but one individual in the Regressing/Regenerating (D) phase is found when rap is greater or equal to 0.17. The majority (85 %) of individuals in phase D are found out of the months 6, 11, 12 and for gonads with a length greater or equal to 56 mm. The fish classified under Omitted spawning (E) does not seem to have a macroscopic parameter that allows for it to be grouped by itself, and instead was grouped under phase C.

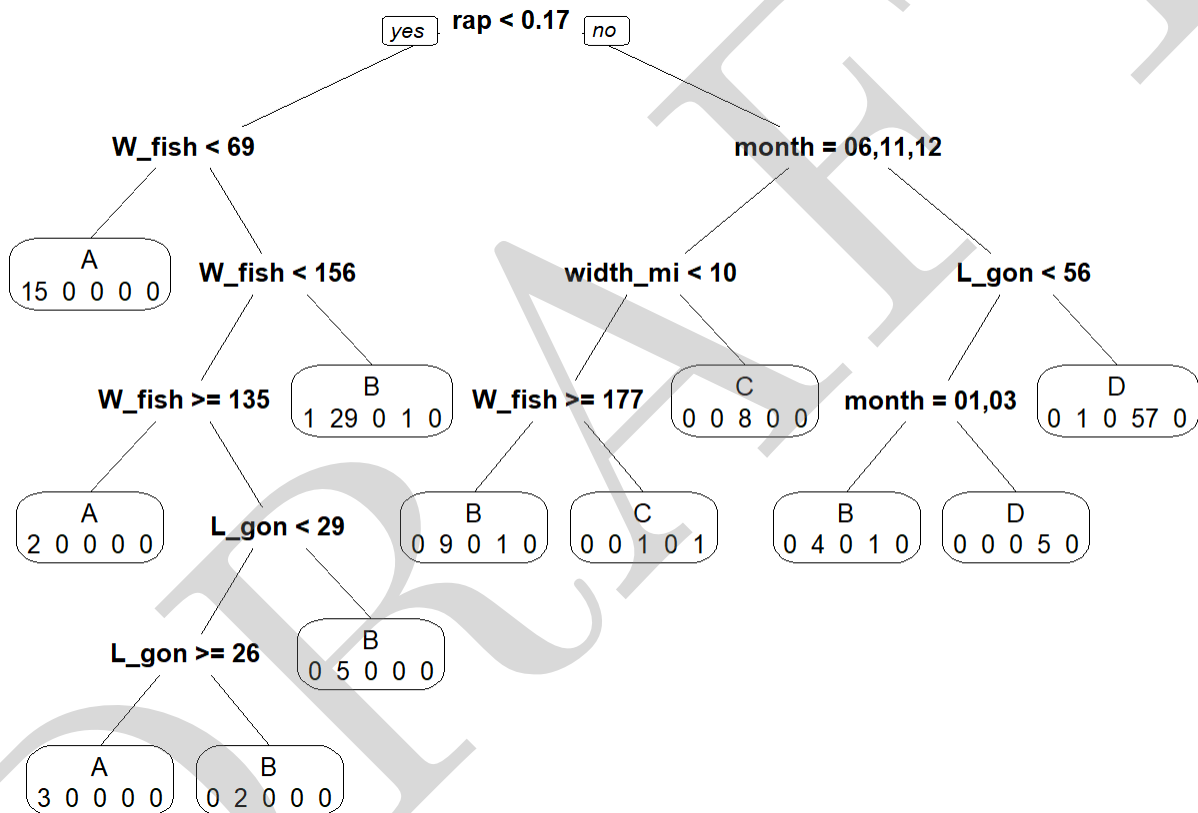


Figure 3 : Classification tree with the identified maturity phase and the number of linked individuals categorized into that leaf, and with the measured parameter that separates the different leaves at the node. With the maturity phases determined through stereology (A, B, C, D, E), L_{fish} the fish's total length, W_{fish} the fish's ungutted weight, L_{gon} the ventral ovary's total length, month the month the fish was sampled, rap the ratio between the ventral ovary's length and the fish's total length. Root node error = 81/146 (55%); n = 146

Maturity ogive and the length at which 50 % of the population has reached sexual maturity (L50) was determined for both data frames (Figure 4). For the visual maturity data, the L50 falls at 28.6 cm ($R^2 = 0.18$). For the stereological maturity data, the L50 falls at 20.6 cm ($R^2 = 0.70$).

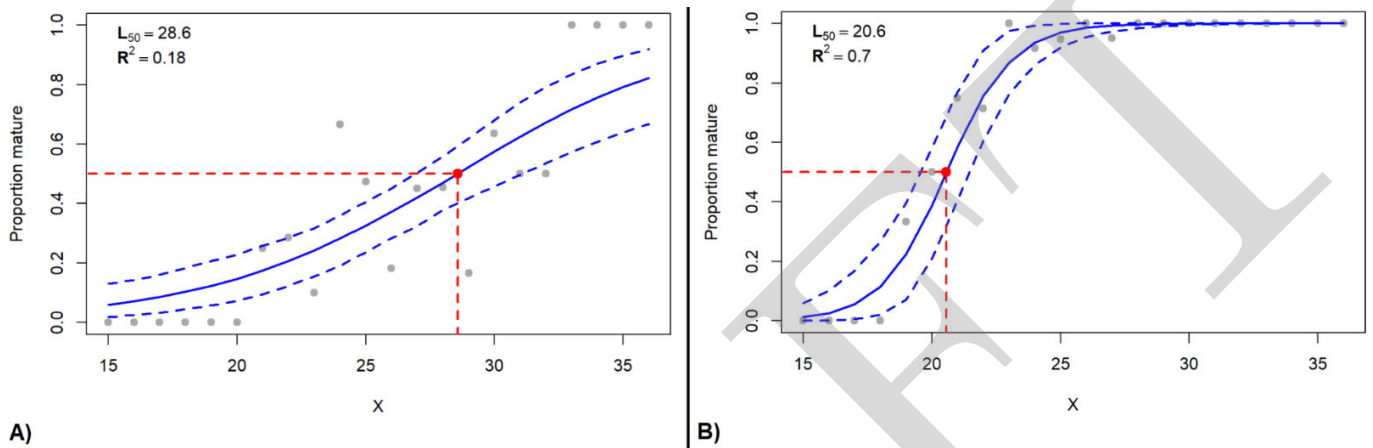


Figure 4 : Maturity ogive and length at which 50 % of the population has reach sexual maturity (L50) for female plaice collected in division VIId during the MATO project, from 2017 to 2019 (n=151), calculated from : **A**) visually estimated maturity data (confidence intervals = 26.9 cm - 31.1 cm) ; **B**) histologically determined maturity data (confidence intervals = 19.6 cm - 21.5 cm)

Discussion

A. Maturity phase classification with stereology

Histology is recognized as the most precise method to estimate sexual maturity through the detailed observation of ovarian sexual structures (Lowerre-Barbieri et al., 2011; West, 1990), a cross section represents a snapshot in time for a single individual. Though we can infer on the oogenesis development with enough sampling from individuals at different maturity phases, the identification of germline cells that are in transition between two stages can lead to difficulties in their identification. This may also lead to missing cellular stages if too much time passes between two samplings, especially if the species studied is in a maturity phase for a short time period. Another problem encountered was the limited access to immature individuals, which led to a size targeted sampling (August 2019) for small sized plaice, to ensure that immature individuals would also be sampled, and a maturity ogive could be calculated.

Using stereology means the ratio of structures quantified are from a random sampling grid. This assures for a more objective data on what structures are present or absent. With an adapted grid, the results will be reliable and allow for a classification of the individual into a maturity phase. In our case, it was shown that very small structures such as oogonia may be underrepresented, but thankfully this has little to no impact on the classification model thereafter since primary oocytes are reliably identified. Moreover, this study set up a method to check for cellular heterogeneity, testing that the position of the cross section within the ovary will not influence the ratio of quantified structures for individual sampled at the beginning of the spawning period (Sauger *et al.*, 2023).

The quantitative histology based model set up for the classification of individuals into a maturity phase follows the ICES criteria (ICES, 2018a), which does take into account species that are batch spawners like *Pleuronectes platessa* (a portion of eggs are released at different intervals during the spawning season). Moreover, this species has a determinate fecundity (total fecundity prior to the onset of spawning is considered to be the potential annual fecundity) with a group synchronous oocyte development (with at least two populations of oocytes at any one time) (Murua & Saborido-Rey 2003). This means that multiple oocytes stages will be present during the entire oogenesis cycle. The study of the oogenesis cycle of the species before classifying these individuals into a maturity phase is primordial since it will greatly influence on the rules set to classify the individuals into maturity phases. Moreover, even if the quantitative histology based model was generalized as much as possible, certain species specific criteria had to be implemented (percentage difference of **POF** and **oh** to identify end of spawning individuals).

Moreover, phase D (regressing/regenerating) could not be modeled because of the complexity of present structures within the ovary at this phase. Indeed, the presence of post-ovulatory follicles (**POF**) at different stages of degeneration, the quantity of atretic oocytes (still in their theca or that are in the ovarian lumen), presence of oocytes that may undergo atresia at a later time, development of a new oocyte cohort for a future spawning season or the presence of oocytes that will mature during a future spawning season are all criteria that must be taken into account when classifying individuals by the presence or absence of their germline cells (Brown-Peterson *et al.*, 2011). These criteria are species dependent and will greatly change as the ovary goes through the regressing/regenerating phase, making the implementation of a model to identify these individuals complex, if not impossible when making sure that there are no redundancies with the rules set up for the classification into other maturity phases. Though other criteria such as gonadal wall thickness, blood vessel ratio or spatial volume of the lumen could be added, however they must be quantified through stereology to reduce the subjective aspect in their identification and once again are very species specific.

B. Inter rater reliability

In 2006, Gerritsen and McGrath underlined the bias that could be found when field agents identified sexual maturity of female plaice using only a visual estimation of the sexual maturity phase through macroscopic criteria. Females that had spawned (D) were assigned with the highest consistency, while there was disagreement for immature (A) and developing (B) females. When comparing the macroscopic results with the stereology ones from the current study, similar results are found. The best identified phase is D (80.4%) and the least is B (30.2%). Indeed, 57.1% of individuals that were identified as immature (A) were actually in development (B) while 45.2% classified under B were shown to have spawned (D) after quantitative histology readings.

There is a clear difficulty when determining the maturity phase through either the observation of macroscopic criteria of the ovary, or individual parameters such as body length or weight. When classifying individuals by their biological parameters, depending on their maturity phase determined through the stereological method (Figure 3), only immature (A) and spawning (C) individuals were completely separated by the ratio between the ventral ovary's length and the fish's total length. No clear patterns could be extracted.

For the stereological readings, while the inter rater reliability was estimated with a percentage agreement and Fleiss' kappa, the first readings were not recorded so the evolution of the reading method before and after the reading protocol was set up could

not be compared. However, the final high agreement percentages showed the importance of a calibration exercise before the readings, as well as setting up a reading protocol to limit interpretations during the identification of structures.

C. Impact of macroscopic versus stereology methods

When estimating a maturity ogive for this species, the visual macroscopic method yielded a size at which 50% of the population has reach sexual maturity (L50) of 28.6 cm. When using the stereological method, the L50 is of 20.6 cm. This difference in estimations is even more notably important since the minimum landing size for *Pleuronectes platessa* is set at 27 cm (Annex XII of Council Regulation 850/98, Millner & Vigneau, 2018). For the eastern English Channel stock (27.7d), individuals migrate between the eastern English Channel (division 7.d), the North Sea and the western English Channel (division 7.e) during the spawning period, and a fixed maturity ogive was established from age survey data, but no length related maturity ogive was established for this stock (ICES, 2019).

Conclusion

Stereology on histological ovarian cross sections, coupled with a calibration exercise and standardized reading procedure, allows for a more objective identification of the sexual maturity phase when compared to the macroscopic method, while being just as precise as the histological method. Once the cellular structures have been quantified, the individual can be classified into a sexual maturity phase, though the model set up will greatly vary on the gametogenesis development of the species. Though this method requires a lot more resources compared to the more classical macroscopic method, it clearly shows differences in data output, and ultimately impacts fisheries assessment indexes such as maturity ogives.

Supplementary material

All data is available on the Zenodo repository (<http://doi.org/10.5281/zenodo.3745640>).

Scripts are available on a GitHub repository

(https://github.com/CarineMTS/P_platessa_Paper) , or by contacting Carine Sauger (carine.sauger@gmail.com) and Laurent Dubroca (laurent.dubroca@gmail.com).

DRAFT

		df	deviance	AIC	P (Chi)
ov	Intercept		32.4	99.0	
	slide	14	53.2	91.8	0.10
	position	5	33.9	90.5	0.91
op1	Intercept		156.4	341.2	
	slide	14	194.5	351.3	<0.001 ***
	position	5	174.4	349.2	0.003 ***
op2	Intercept		420.6	910.9	
	slide	14	1307.7	1770.0	<0.001 ***
	position	5	483.8	964.1	<0.001 ***
oca	Intercept		215.8	616.6	
	slide	14	1326.0	1698.7	<0.001 ***
	position	5	234.3	625.1	0.002 ***
vit1	Intercept		175.7	404.0	
	slide	14	4552.3	4752.6	<0.001 ***
	position	5	205.1	423.4	<0.001 ***
vit2	Intercept		21.0	99.1	
	slide	14	725.4	775.5	<0.001 ***
	position	5	52.9	120.9	<0.001 ***
vit3	Intercept		6.5e-10	58.7	
	slide	14	182.2	212.9	<0.001 ***
	position	5	15.3	64.1	0.009 ***
L	Intercept		443.9	723.9	
	slide	14	668.8	920.8	<0.001 ***
	position	5	595.4	865.4	<0.001 ***
oaA	Intercept		51.5	124.1	
	slide	14	154.3	198.8	<0.001 ***
	position	5	80.3	142.8	<0.001 ***
oaB	Intercept		7.1	70.2	
	slide	14	855.9	891.0	<0.001 ***
	position	5	318.1	371.3	<0.001 ***
POF	Intercept		9.2	76.3	
	slide	14	229.9	269.0	<0.001 ***
	position	5	18.1	75.1	0.11
pg	Intercept		678.2	1269.1	
	slide	14	3317.8	3880.7	<0.001 ***
	position	5	938.0	1518.9	<0.001 ***
tc	Intercept		435.7	1013.9	
	slide	14	566.3	1116.5	<0.001 ***
	position	5	517.8	1086.1	<0.001 ***
cs	Intercept		142.0	426.5	
	slide	14	284.2	540.7	<0.001 ***
	position	5	156.7	431.2	0.01 **
ei	Intercept		754.4	1387.8	
	slide	14	1269.5	1874.9	<0.001 ***
	position	5	825.4	1448.8	<0.001 ***
i	Intercept		50800.5	52185.3	
	slide	14	51349.0	52705.8	<0.001 ***
	position	5	50839.8	52214.5	<0.001 ***
v	Intercept		7844.8	8505.9	
	slide	14	10390.2	11023.3	<0.001 ***
	position	5	7902.9	8554.0	<0.001 ***

Table A : Function **drop1** outputs of the generalised linear models (GLM binomial, logit link) for each histological structure found throughout the 90 slides. With **slide** the identification number of the sampled fish (n = 15), **position** the section's position within the ovary (n = 6), **df** the degrees of freedom, **deviance** the residual deviance of the model, **AIC** the Akaike information criterion and **P(Chi)** the p-value calculated under a Chi² distribution

Acknowledgements

We would like to thank the coordinators of the Channel Ground Fish Surveys as well as Port-en-Bessin's fish market for fish accessibility

References

Alonso-Fernández, A., Villegas-Ríos, D., Valdés-López, M., Oliveira-Domínguez, B., Saborido-Rey, F., 2013. Reproductive biology of pollack (*Pollachius pollachius*) from the Galician shelf (north-west Spain). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **93** : 1951–1963.
<https://doi.org/10.1017/S0025315413000283>

Aperio Technologies, 2015. Aperio Image Scope. Leica Biosystems Imaging, Inc., USA.

Armstrong, M. J., Connolly, P., Nash, R. D. M., Pawson, M. G., Alesworth, E., Coulahan, P. J., Dickey-Collas, M., Milligan, S. P., O'Neill, M. F., Witthames, P. R., and Woolner, L. 2001. An application of the annual egg production method to estimate the spawning biomass of cod (*Gadus morhua* L.), plaice (*Pleuronectes platessa* L.) and sole (*Solea solea* L.) in the Irish Sea. *ICES J. Mar. Sci.*, **58**: 183–203.

Bromley, P.J., 2000. Growth, sexual maturation and spawning in central North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.), and the generation of maturity ogives from commercial catch data. *J. Sea Res.*, **44** : 27–43. [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(00\)00043-5](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(00)00043-5)

Brown-Peterson, N.J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B.J., Lowerre-Barbieri, S.K., 2011. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. *Mar. Coast. Fish. Dyn. Manag. Ecosyst. Sci.*, **3** : 52–70.
<https://doi.org/10.1080/19425120.2011.555724>

Brule, T., 1987. The reproductive biology and the pathological changes of the plaice *Pleuronectes platessa* (L.) after the 'Amoco Cadiz' oil spill along the north-west coast of Brittany. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **67** : 237–247.
<https://doi.org/10.1017/S0025315400026564>

Chessel, D. & Thioulouse, J., 2013. Modèle linéaire généralisé. Fiche n°5 d'utilisation du logiciel R, <https://pbil.univ-lyon1.fr/R/pdf/br5.pdf>

Conger, A. J., 1980. Integration and Generalization of Kappas for Multiple Raters. *Psychol. Bull.*, **88** : 322–328.

Cushing, D.H., 1969. The Regularity of the Spawning Season of Some Fishes. *ICES J. Mar. Sci.*, **33** : 81–92. <https://doi.org/10.1093/icesjms/33.1.81>

Dawson, A.S., Grimm, A.S., 1980. Quantitative seasonal changes in the protein, lipid and energy content of the carcass, ovaries and liver of adult female plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Biol.*, **16** : 493– 504. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1980.tb03729.x>

Domínguez-Castanedo, O., Uribe, M.C., Rosales-Torres, A.M., 2016. Morphological development of the structures related to annualism in the ovarian follicle of the killifish *Millerichthys robustus* (Costa, 1995) (Teleostei: Cyprinodontiformes). *J. Morphol.*, **277** : 1219–1230. <https://doi.org/10.1002/jmor.20570>

Domínguez-Petit R., Anastasopoulou A., Cubillos L., Gerritsen H.D., Gonçalves P., Hidalgo M., Kennedy J., Korta M., Marteinsdottir G., Morgado C., Muñoz M., Quincoes I., Saínza M., Thorsen A., Vitale F., 2017. Chapter 3: Maturity. In Handbook of applied fisheries reproductive biology for stock assessment and management, ed. R. Domínguez-Petit, H. Murua, F. Saborido-Rey and E. Trippel. Vigo, Spain. Digital CSIC. <http://hdl.handle.net/10261/87787>.

FAO, 2018. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2018. Atteindre les objectifs de développement durable., L'état du Monde. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, Rome. 237 pp. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Flores, A., Wiff, R. and Díaz, E., 2015. Using the gonadosomatic index to estimate the maturity ogive: application to Chilean hake (*Merluccius gayi gayi*). *ICES J. Mar. Sci.*, **72** : 508–514.

Murua, H., Kraus, G., Saborido-Rey, F., Witthames, P.R., Thorsen, A., Junquera, S., 2003. Procedures to Estimate Fecundity of Marine Fish Species in Relation to their Reproductive Strategy. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, **33** : 33–54.

Murua H. & Saborido-Rey F., 2003. Female Reproductive Strategies of Marine Fish Species of the North Atlantic. *J. Northw. Atl. Fish Sci.*, **33** : 23-31.

Gabe, M., 1968. Techniques Histologiques, 2nd edn (Masson).

Gerritsen, H.D., McGrath, D., 2006. Variability in the assignment of maturity stages of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) and whiting (*Merlangius merlangus* L.) using macroscopic maturity criteria. *Fish. Res.*, **77** : 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2005.08.007>

Glagolev, A. A., 1934. Quantitative analysis with the microscope by the 'point' method. *Miner. Eng. J.*, **135** : 399–400.

Hallgren, K. A., 2012. Computing Inter-Rater Reliability for Observational Data: An Overview and Tutorial. *Tutor. Quant. Methods Psychol.*, **8** : 23–34.

Hoarau, G., Rijnsdorp, A.D., Van Der Veer, H.W., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2002. Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: microsatellites revealed large-scale spatial and temporal homogeneity. *Mol. Ecol.*, **11** : 1165–1176. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01515.x>

Hunter, J.R., Macewicz, B.J., 1985. Rates of atresia in the ovary of captive and wild northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull.*, **83** : 119–136.

ICES, 2010. Report of the ICES/HELCOM Workshop on Flatfish in the Baltic Sea. International Council for the Exploration of the Sea, Öregrund, Sweden. ICES CM 2010/ACOM:68. 85pp.

ICES, 2008. Report of the Workshop on Maturity Ogive Estimation for Stock Assessment (WKMOG) (Workshop). International Council for the Exploration of the Sea, Lisbon, Portugal. ICES CM2008/ACOM:33. 72 pp.

ICES. 2012. Report of the Workshop for maturity staging chairs (WKMATCH), 11–15 June 2012, Split, Croatia. ICES CM 2012/ACOM:58. 57 pp.

ICES, 2013. Report of the Workshop on sexual maturity staging of cod, whiting, haddock, saithe and hake (WKMSGAD) (Workshop). International Council for the Exploration of the Sea, San Sebastian, Spain. ICES CM 2013:57. 51pp.

ICES, 2014a. Report of the Workshop for maturity staging chairs (WKMATCH) (Workshop). International Council for the Exploration of the Sea, Split, Croatia. ICES CM 2012/ACOM:58. 57 pp

ICES, 2014b. ICES FishMap, Plaice *Pleuronectes platessa*. 10 pp.
<http://www.ices.dk/exploreus/projects/EURFP/EU%20Repository/ICES%20FishMap/ICES%20FishMap%20species%20factsheet-plaice.pdf>

ICES. 2018a. Report of the Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF), 30 April - 4 May 2018, ICES Headquarters, Copenhagen, Denmark. ICES CM/EOSG: 38. 75 pp.

ICES, 2018b. Working Group on Biological Parameters (WGBIOP) (Workshop). International Council for the Exploration of the Sea, Ghent, Belgium. ICES CM 2018/EOSG:07. 186pp.

ICES, 2019. Plaice (*Pleuronectes platessa*) in Division 7.d (eastern English Channel). In Report of the ICES Advisory Committee, 2018. ICES Advice 2018, ple.27.7d, <https://doi.org/10.17895/ices.pub.4446>

IFREMER, 2011. Biologie de la Plie commune (*Pleuronectes platessa*). 1pp. <https://wwz.ifremer.fr/peche/Le-monde-de-la-peche/Lesressources/Lesquelles/Poissons/Osseux/Plies>

McHugh, M. L., 2012. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem. Medica*, **22** : 276–282.

Lowerre-Barbieri, S. K., Brown-Peterson, N. J., Murua, H., Tomkiewicz, J., Wyanski, D. M., & Saborido-Rey, F., 2011. Emerging issues and methodological advances in fisheries reproductive biology. *Mar. Coast. Fish.*, **3** : 32–51. <https://doi.org/10.1080/19425120.2011.555725>

Millner R. & Vigneau J., 2018. Stock Annex: Plaice (*Pleuronectes platessa*) in Division 7.d (eastern English Channel) - Working Group on the Assessment of Demersal Stocks in the North Sea and Skagerrak (WGNSSK). 28pp.

R Core Team, 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rijnsdorp, A.D., 1989. Maturation of male and female North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *ICES J. Mar. Sci.*, **46** : 35-51.

Sauger, C. & Kellner, K., 2019. Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the European plaice, *Pleuronectes platessa* (Linné, 1758). IFREMER.

Sauger, C., Quinquis, J., Kellner, K., Heude-Berthelin, C., Lepoittevin, M., Elie, N., & Dubroca, L., 2020. A macroscopic and stereological imaging dataset of *Pleuronectes platessa* ovaries. *Sci Data* **7**, 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0505-8>

Sauger, C., Quinquis, J., Kellner, K., Heude-Berthelin, C., Lepoittevin, M., Elie, N., & Dubroca, L., 2019a. Macroscopic and histological image dataset of the European plaice

(*Pleuronectes platessa*) ovaries (Version 1). Zenodo.
<http://doi.org/10.5281/zenodo.3745640>

Sauger, C., Quinquis, J., Kellner, K., Heude-Berthelin, C., Lepoittevin, M., Elie, N., & Dubroca, L., 2019b. Protocol for the determination of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the European plaice, *Pleuronectes platessa* (Linné, 1758). IFREMER.

Sauger, C., Quinquis, J., Heude-Berthelin, C., Lepoittevin, M., Elie, N., & Dubroca, L., Kellner, K., 2023. A Quantitative Histologic Analysis of Oogenesis in the Flatfish Species *Pleuronectes platessa* as a Tool for Fisheries Management. *Animals*, **13** : 1-21.
<https://doi.org/10.3390/ani13152506>

Schneider, C. A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods*, **9** : 671-675.

Torrejon-Magallanes, J., 2018. sizeMat: An R Package to Estimate Size at Sexual Maturity. <https://cran.r-project.org/web/packages/sizeMat/vignettes/sizeMat.html>

Weibel, E.R., 1974. Selection of the best method in stereology. *J. Microsc.*, **100** : 261–269. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1974.tb03938.x>

West, G., 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, **41** : 199–222.

Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Saveliev, A. A. & Smith, G. M., 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R, Statistics for biology and health, Springer.

Article 3

Citation : Sauger, C., Kellner, K., Martin, V., Le Meleder, A., Berthelin, C., Villain-Naud, N., Elie, N., Dubroca, L. «Stereology as a method for maturity phase determination in fisheries stock assessments : An example with a batch spawner species the Striped red mullet (*Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758) ». 38pp. *En préparation*

Résumé : «Sexual maturity phase of 317 female Striped red mullets *Mullus surmuletus* was established by visual observation of macroscopic criteria as well as through histology coupled with stereology. Stereology reading agents showed calibration results with a difference of less than 4% for germline cell identification. Individuals from the Bay of Biscay (n=103) and English Channel (n=214) stocks showed inter- and intra-gonadic cellular homogeneity. The beginning of a spawning event was detected for the English Channel stock in May while two spawning event were registered in May and July for the Bay of Biscay stock. When comparing the visual method with the use of stereology, individuals correctly classified were of 93% in A (immature), 30.5% in B (developing), 78% in C (spawning), 0% in D (regressing/regenerating) and 0% in E (omitted spawning). However, visually the ovaries will become opaque early on, leading to an under-estimation of A individuals. Bay of Biscay stock $L_{50}=16.1$ cm and $A_{50}=0.1$ year old, English Channel stock $L_{50}=18.7$ cm and $A_{50}=0.6$ year old. When using histology, the cellular structures to identify individuals that have spawned disappear just as the spawning period ends, leading to an over-estimation of A individuals outside of the spawning period. To separate phase A and phase pfB (potentially future developing) individuals, all 317 individuals were regrouped and a hierarchical clustering was used. Length L_{50} and age A_{50} at which 50% of the fish in both stocks are sexually mature were re-calculated, with a L_{50} of 22.9 cm and a A_{50} of 1.5 years old when including pfB individuals, and a L_{50} of 24.8 cm and a A_{50} of 1.9 years old when excluding them.»

Contribution : Création, conception et rédaction de l'article, avec récolte et traitement des échantillons, lectures des des lames histologiques en stéréologie et analyse des résultats

Stereology as a method for maturity phase
determination in fisheries stock assessments :
An example with a batch spawner species the
Striped red mullet (*Mullus surmuletus*
Linnaeus, 1758)

Sauger Carine^{1,2}, Kellner Kristell², Martin Valentine¹, Le
Meleder Anna¹, Berthelin Clothilde², Villain-Naud Nadège²,
Elie Nicolas³, and Dubroca Laurent¹

¹Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
(IFREMER). Laboratoire Ressources Halieutiques de Port en
Bessin, Avenue du Général de Gaulle, 14520, Port en Bessin
Huppain, France

²University of Caen Normandie, Unity Biology of Organisms
and Aquatic Ecosystems (UMR 8067 BOREA), MNHN,
Sorbonne University, UCN, CNRS, IRD, UAG, Esplanade de
la Paix, 14032 Caen, France

³Normandie Univ, UNICAEN, Federative Structure 4207
"Normandie Oncologie", Service Unit PLATON,
VIRTUAL'HIS, 14000 Caen, France

Abstract

Sexual maturity phase of 317 female Striped red mullets *Mullus surmuletus* was established by visual observation of macroscopic criteria as well as through histology coupled with stereology. Stereology reading agents showed calibration results with a difference of less than 4% for germline cell identification. Individuals from the Bay of Biscay (n=103) and English Channel (n=214) stocks showed inter- and intragonadic cellular homogeneity. The beginning of a spawning event was detected for the English Channel stock in May while two spawning events were registered in May and July for the Bay of Biscay stock. When comparing the visual method with the use of stereology, individuals correctly classified were of 93% in A (immature), 30.5% in B (developing), 78% in C (spawning), 0% in D (regressing/regenerating) and 0% in E (omitted spawning). However, visually the ovaries will become opaque early on, leading to an under-estimation of A individuals. Bay of Biscay stock $L_{50}=16.1$ cm and $A_{50}=0.1$ year, English Channel stock $L_{50}=18.7$ cm and $A_{50}=0.6$ year. When using histology, the cellular structures to identify individuals that have spawned disappear just as the spawning period ends, leading to an over-estimation of A individuals outside of the spawning period. To separate phase A and phase pfB (potentially future developing) individuals, all 317 individuals were regrouped and a hierarchical clustering was used. Length L_{50} and age A_{50} at which 50% of the fish in both stocks are sexually mature were re-calculated, with a L_{50} of 22.9 cm and a A_{50} of 1.5 year when including pfB individuals, and a L_{50} of 24.8 cm and a A_{50} of 1.9 year when excluding them.

Keywords : *Mullus surmuletus*, stereology, histology, visual maturity, maturity ogive

1 Introduction

Life history traits encompass the defining features of an organism's life cycle, intricately weaving together to shape its reproductive strategy and overall fitness (Stearns, 2000). These traits, such as individual reproductive effort and output, growth patterns, or biological characteristics, interplay to mold an organism's reproductive success. These elements not only govern an individual's fitness (Stearns, 1992) but also hold the key to conditioning the productivity and vitality of the broader underlying population.

In fishery management, essential biological parameters such as length, weight, and sexual maturity phase of exploited stocks are collected either through individuals landed by fishermen or during scientific surveys. These biological parameters are used to compute metrics such as the L_{50} or the A_{50} : respectively, length or age at which 50% of the fish within the stock are sexually mature (?). These metrics play a pivotal role in the estimation of the SSB (total weight of all sexually mature fish in the stock), or to define the Minimum Legal Length (MLL) (ICES, 2012).

Among the collected biological parameters, metrics such as length, weight and age can be objectively quantifiable. However, when it comes to ascertaining sexual maturity, the usual process in fishery science hinges on visually assessing the gonad (de Boois *et al.*, 2023; ICES, 2018). While convenient, this rapid and straightforward approach can yield considerable uncertainty upon the specific identification criteria for the studied species (Brown-Peterson *et al.*, 2011; West, 1990). Another method for determining maturity phases involves employing histology. Histology is considered the most accurate method despite it also being the most time and resource-consuming (Hunter & Macewicz, 1985; West, 1990). However, coupling histology with a quantitative method (stereology) guarantees accurate rates of cellular contents and takes into account atresia to identify omitted spawners and can be used to estimate fecundity with higher precision than the volumetric or gravimetric methods, especially for species with multiple follicle cohorts (Emerson *et al.*, 1990; Kjesbu *et al.*, 2010; Bucholtz *et al.*, 2013). One commercially important species with little histological data description available (N'Da & Deniel, 1993) is the Striped red mullet (*Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758).

The Striped red mullet is a benthic teleost found along the coast of Europe, from the English Channel to Gibraltar, but also in the northern part of West Africa to Dakar as well as in the Mediterranean and Black seas (Whitehead *et al.*, 1986). In North Atlantic waters in 2022, this Mullidae was managed under two stocks: Striped red mullet in International Council

for the Exploration of the Sea (ICES) subarea 4 (North Sea), divisions 7d (Eastern English Channel) and 3a (Skagerrak, Kattegat) (ICES, 2022a) and the Striped red mullet in ICES subareas 6 and 8, and in divisions 7a–c, 7e–k, and 9a (North Sea, Bay of Biscay, southern Celtic Seas and Atlantic Iberian waters) (ICES, 2022b).

The Working Group on the Assessment of Demersal Stocks in the North Sea and Skagerrak (ICES, 2022a) stated that, for the Striped red mullet stock of subarea 4, divisions 7d and 3a, the 2021 landings for this commercially important species was of 2976 Tonnes (T), with 1745 T from division 7d (Eastern English Channel). There is no Total Allowable Catch (TAC) or minimum landing size for this stock, though signs of over-fishing have been recorded. Moreover, in 2021, this stock’s ICES data category was downgraded from category 3 to category 5 (Landings-only stocks. Includes stocks for which only landings data are available (ICES, 2016)). For subareas 6, 8 and divisions 7.a-c, e-k and 9.a stock, the Working Group on Widely Distributed Stocks estimated the landings of 2021 to be of 1445 Tonnes (ICES, 2022b). This stock is also under the ICES data category 5, with no assessment method in place due to short time-series, no TAC and a first full benchmark proposed for 2024. The only minimum landing size was set in France in 2002 (16cm) and 2013 (15cm) (France, 2013).

In the following study, a quantitative method was set up, coupling histology and stereology, with the aim to make maturity estimation more objective. With the Striped red mullet as the studied species, a comparison between the maturity phases yielded by this quantitative method with the more classical visual approach was made.

2 Materials and Methods

2.1 Samplings

For this study, females of two *M. surmuletus* stocks were taken into consideration (Table 1). The Bay of Biscay stock includes 103 individuals fished from ICES divisions 8a, 8b, 8c, 7g and 7j while 214 individuals from the English Channel stock were fished from ICES division 7d. The samplings were opportunistic, meaning the number of fish, their sizes and the time of the sampling depended greatly on commercial catches arrivals and the possibility to embark on scientific campaigns. The sampling period for this study spanned from November 2020 to August 2022, with a monthly sampling of 15 individuals for both stocks when possible. A final sampling occurred in August 2022, long after all other samplings for the English Channel stock

since the end of the spawning period had been missed the year prior. All fish were sampled by bottom trawl and originated from either commercial fishing vessels or scientific campaigns such as CGFS (Channel Ground Fish Survey), EVHOE (EValuation Halieutique Ouest de l'Europe) and IBTS (International Bottom Trawl Survey).

Individuals from commercial fishing vessels were caught at least a day prior and were kept on ice while being brought to the IFREMER laboratory of Port-en-Bessin (France) for dissection. Individuals caught during scientific campaigns were dissected immediately on board. For each fish, the following parameters were taken : ungutted weight (g), total length (cm), visually estimated maturity ([Le Meleder, 2022](#)), right ovary weight (mg), left ovary weight (mg). From the weights, a gonado-somatic index (GSI) was calculated for each individual ($GSI = (\text{total gonad weight} \div \text{ungutted weight of the individual}) * 100$). Finally, the otoliths were extracted and sent to IFREMER of Boulogne-sur-Mer (France) for age estimation.

Table 1: Sampled individuals from the English Channel stock (ICES division 7d) and the Bay of Biscay stock (ICES divisions 8a, 8b, 8c, 7g and 7j)

Month	Fish sampled	ICES Division	Source
Nov 2020	9	7j ; 7g	EVHOE 2020
Feb 2021	20	7d	Commercial
Mar 2021	13	7d	Commercial
Apr 2021	12	7d	Commercial
May 2021	15	7d	Commercial
May 2021	11	8b ; 8c	Commercial
Jun 2021	7	8a	Commercial
Jul 2021	15	8b	Commercial
Aug 2021	15	7d	Commercial
Sept 2021	15	7d	Commercial
Sept 2021	15	8b	Commercial
Oct 2021	3	8b	EVHOE 2021
Oct 2021	27	7d	CGFS 2021
Oct 2021	14	7d	Commercial
Nov 2021	10	7d	Commercial
Nov 2021	1	7g	EVHOE 2021
Nov 2021	11	8a ; 8b	EVHOE 2021
Nov 2021	16	8b	Commercial
Dec 2021	14	7d	Commercial
Jan 2022	15	7d	IBTS 2022
Jan 2022	15	7d	Commercial
Feb 2022	15	7d	Commercial
Feb 2022	15	8b	Commercial
Aug 2022	14	7d	Commercial

2.2 Histology

The histological slide processing method was taken from [Sauger *et al.* \(2020\)](#). Fresh sampled individuals were dissected, their ovaries were extracted, photographed ([Le Meleder *et al.*, 2022](#)) and a 1.5 cm section was extracted from the median area of each ovaries. These sections were then placed into a Davidson fixative at 4°C for 48 hours before being transferred into Ethanol (70°). Samples were then put into an automate (Leica TP1020) for dehydration through successive ethanol and butanol baths, before being manually embedded into paraffin wax. Ovarian cross sections of 3 μm were trichrome stained ([Gabe, 1968](#)) and mounted between slide and slip.

2.3 Stereology

Microphotographs of ovarian structures were taken with an Olympus AX70 microscope using the Olympus CellSens© software. Female germline cells were identified and measured (i.e. mean cell diameter and mean *zona radiata* width). These photographs and measurements were used to set up a lexicon describing, in fine detail, the ovarian structures of *M. surmuletus* (Berthelin *et al.*, 2023).

The stereological method used to quantify the volume each structure takes within the ovarian slide was based off the Glagolev (1934) method and described in Sauger *et al.* (2020). Each slide was digitized with an Olympus VS120 slide scanner and read under QuPath (Bankhead *et al.*, 2017). Under QuPath, for each scanned histological slide, the cross section was detected through segmentation by using a threshold applied on the gray level image to extract the tissue area (Goode *et al.*, 2013). Once the tissue area was outlined, a grid of 500 to 600 equidistant points was layered over the ovarian section using a random starting point. This random starting point was then fixed to facilitate reproducibility, allowing for different readers to use the same reading grid. Each grid point was attributed a single structure from a list of 18 possible ovarian cellular structure described in the lexicon Table 2. The percentage of times a structure was counted on a single slide was then computed. For this study, 3 readers have participated in slide readings and have undergone a inter-calibration beforehand.

Table 2: Identifiable structures during the stereological reading of ovarian histological slides of *M. surmuletus* (Berthelin *et al.*, 2023). * = main germline cells

Abbreviation	Name
og*	oogonium
po1*	primary oocyte stage 1
po2*	primary oocyte stage 2
ldo*	lipid droplet oocyte
cao*	cortical alveoli oocyte
vtg*	oocyte in vitellogenesis
oih*	oocyte in hydration
ho*	hydrated oocyte
POF*	Post-Ovulatory Follicle
aoA*	atretic oocyte alpha
aoB*	atretic oocyte beta
L	lysis
bv	blood vessel
Is	intercellular space
gw	gonadal wall
ct	connective tissue
E	unnatural emptiness
U	undetermined

2.3.1 Reader inter-calibrations

During the calibration exercises, 15 slides were read multiple times by four different agents. These 15 slides were chosen so as to encounter a maximum of cellular structure variety (sections with missing gonadal wall, discolored areas, different germ cells, *ect.*). The counting grid generated for each slide was identical for all agents. Between each readings, the results of all agents were compared and rules were set up for an harmonization of the reading process (Dubroca *et al.*, 2023). During the calibrations, each slide was read at least 3 times by all agents until reaching a difference of less than 3% for all main germline cell types between all readers. To assess the global agreement of the readers for each slide, a percentage agreement and Fleiss's kappa index (Conger, 1980; Hallgren, 2012; McHugh, 2012) were calculated.

Out of the four reading agents, one agent had no previous knowledge on histological structures identification. The agent was given the lexicon, the reading protocol and was instructed to read the 15 slides with no further information. Two out of the four reading agents were given more information on cellular identification and stereology beforehand while the last agent had

previous experience in stereology and oogenesis structure identification.

2.3.2 Cellular homogeneity

To verify whether the location of the cross section within the ovary had an impact on cellular structure percentages, cellular homogeneity was checked. For this, 14 fish from the Bay of Biscay were sampled in February 2022, while 16 fish from the English Channel were sampled in November 2021. These individuals ranged from a size of 21 cm to 36 cm. For all 30 individuals, cross sections were made in the anterior (1) median (2) and posterior (3) areas of the right (D) and left (G) ovaries. Stereology readings were done for the 6 (G1, G2, G3, D1, D2, D3) slides for all 30 fish. A binomial GLM (General Linear Model), with a *logit* link (Chessel & Thioulouse, 2013; Zuur *et al.*, 2009), was used to test the effect of (1) the cross section's position (1, 2, 3) and of (2) the gonad (D, G) on the cellular structures' frequencies. The results from the GLM were analyzed using the individual deviations of the variables tested (i.e. cellular structures) through the *drop1* function. Finally, a principal component analysis (PCA) of the quantified cellular structures was established for a visual representation of cellular homogeneity.

2.3.3 Stereological maturity phase determination

Following the ICES (2014, 2018) and Brown-Peterson *et al.* (2011) definitions, the stereological counts were used to classify each individual into a maturity phase. For this process, only the phases A, B, Ca, Cb and E were established (Table 3). The criteria were chosen so that no two phase could overlap, and all remaining slides were classified automatically into the D (Regressing/Regenerating) phase.

Table 3: Definitions of the sexual states and maturity phases in teleosts. Based on WKMATCH (ICES, 2014), WKASMSF (ICES, 2018), Brown-Peterson *et al.* (2011). With og: oogonium, po1: primary oocyte stage 1, po2: primary oocyte stage 2, ldo: lipid droplet oocyte, cao: cortical alveoli oocyte, vtg: oocyte in vitellogenesis, oih : oocyte in hydration, ho: hydrated oocyte, POF: Post-Ovulatory Follicle, aoA: atretic oocyte alpha, aoB: atretic oocyte beta, GVM: germinal vesicle migration, GVBD: germinal vesicle breakdown

State description	Phase	Macroscopic criteria		Histological features		Histological model	
SI : Sexually immature, (without gonad development)	A - Immature	Possible sub-phase	Small pinkish and translucent ovaries shorter than 1/3 of body cavity. Indistinct blood vessels and no visible eggs	Possible sub-phase	Only og, po1, po2 present containing no oil droplets, rare atresia, no muscle bundles. Thin ovarian wall, scarce connective tissue around follicles and little space between oocytes	A count of og, po1, po2 or ldo that is not null. Absence of POF, aoB, cao, vtg, oih and ho. A count of aoA that is less than 50% of germinal cells counted	
SM : Sexually mature (with gonad development)	B - Developing		Enlarging pinkish-reddish ovaries that have a length of about 1/2 of the body cavity. Visible blood vessels, no visible eggs		Marked increase in oocyte size, blood vessels become more distincts, po1, po2, cao present. Vitg oocytes can also be present. No POF. No oih. Some atresia may be present	Presence of either cao or vtg. A count of aoA that is less than 50% of germinal cells counted. Absence of POF, aoB, oih and ho	
	C - Spawning	Ca - Actively spawning	Large ovaries, blood vessels prominent. individual oocytes visible macroscopically	Pinkish-red ovaries with a granular appearance and a length of about 2/3 of the body cavity. Eggs are visible to the naked eye through the <i>ovare tunica</i> which is not yet translucent. No eggs are expelled under light pressure		Oocytes at the end of GVM, GVBD, hydration or ovulation are present. Recently collapsed POF can be present	Presence of POF. Presence of either vtg, oih, ho, or aoB. A count of aoA that is less than 50% of germinal cells counted
		Cb - Spawning capable	Red ovaries with conspicuous superficial blood vessels and a length from 2/3 to full length of the body cavity. Large, transparent, ripe eggs are clearly visible and can be expelled under light pressure, or escape freely			oih oocytes are present. No POF. Atresia of vitellogenic or hydrating oocytes may be present	Absence of POF and of aoB. Presence of either oih or ho. A count of aoA that is less than 50% of germinal cells counted
	D - Regression / Regeneration	Da - Regression		Reddish ovaries of about 1/2 of the body cavity length. Flaccid ovarie walls, prominent blood vessels, and possible remnants of disintegrating opaque and/or translucent eggs		Atresia (any stage) and POF are present. Some healthy cao and/or vtg oocytes present	Individuals classified into the
		Db - Regeneration		Small pinkish and translucent ovaries that have a length of about 1/3 of the body cavity, with reduced but present blood vessels. No visible eggs		Only og, po1, po2 present. Oil droplets can be seen in po1/po2 oocytes. Muscle bundles, enlarged blood vessels, thick ovarian wall and/or atresia or old, degenerating POF may be present. There is more space and interstitial tissues around PG oocytes	Regressing/Regenerating phase are those that have not been classified into the other phases
E - Omitted spawning					No POF and at least 50% of the vitellogenic oocytes are atretic	Account of aoA that is more or equal to 50% of germinal cells counted. Absence of POF	
F - Abnormal		Problems in the gonad development (necrosis, sclerosis, intersex, majority of the gonad that looks unhealthy)	10				

2.3.4 Visual vs Stereological maturity phase determination

As stated previously, for all 317 female individuals a maturity phase was established visually and through the use of stereology. From this data, a confusion matrix was set up, comparing the visual reading with the stereological results. Finally, the maturity ogive, the length at which 50% of the population has reached sexual maturity (L_{50}) and the age at which 50% of the population has reached sexual maturity (A_{50}), were calculated using the size-Mat package (Torrejon-Magallanes, 2018). The L_{50} and A_{50} were calculated using the visual maturity and the stereological maturity.

2.4 Additional analyses

2.4.1 Hierarchical Clustering

A hierarchical clustering (unsupervised learning) was performed on all individuals that were classified into the A (immature) category through the stereological method, regardless of the stock they originated from, while taking into account only the main germline cells percentages.

3 Results

3.1 Reader inter-calibrations

The percentage agreements and Fleiss' kappas for the calibration readings are shown in Table 4. For the first reading, the percentage agreements for the 15 slides ranged from 34.8% to 69.4% (50.2% to 72.6% for Fleiss' kappa). For the last calibration reading, the percentage agreements spanned from 57.6% to 78.6% (67.1% to 83.4% for Fleiss' kappa). There was an increase in the percentage agreement for 14 slides when comparing the first and last readings. However, when looking at Fleiss' kappa there was an increase for all slides. Moreover, the last slide with a lower agreement at the last reading also had an extra reader.

Table 4: Percentage agreement (Agree) and Fleiss' kappa (%) of the first (1) and last (Ω) calibration reading results

Slide N°	1-Readers (n)	Ω -Readers (n)	1-Agree (%)	Ω -Agree (%)	1-Kappa Fleiss (%)	Ω -Kappa Fleiss (%)
1	4	4	50,2	78,6	64,7	83,4
2	3	4	58,8	66,8	62,7	72,2
3	4	4	52,1	63,1	65,3	71,8
4	4	4	56,1	64,9	68,3	73,3
5	4	4	54,8	73,0	65,9	79,9
6	4	4	52,4	74,4	65,7	81,6
7	4	4	34,8	61,8	50,2	68,9
8	3	4	69,4	64,3	70,6	70,6
9	4	4	49,7	60,6	61,1	69,9
10	4	4	64,0	66,5	72,6	73,2
11	4	4	48,8	57,6	61,2	67,1
12	3	4	61,4	69,3	66,2	77,1
13	4	4	50,4	67,7	63,1	74,6
14	4	4	48,2	66,2	56,6	68,1
15	4	4	53,7	71,3	67,0	77,6

During the first reading, there were differences of more than 3% for po1 (primary oocyte stage 1), po2 (primary oocyte stage 2), ldo (lipid droplet oocyte) and cao (cortical alveoli oocyte) for certain slides. These germline cells were better defined in the lexicon and the reading differences for po1, po2 and cao were lowered to 3% or less for the last reading. For the ldo germ cell, the difference between readers was under 4% for the last reading. The highest recurring differences between readers were for the structures U (unknown) and aoA (atretic oocyte alpha), with a clear difficulty to classify structures between L (lysis) and ct (connective tissue) as well as a higher percentage of U for less experienced readers. Moreover, rare structures like aoB (atretic oocyte beta) and POF (Post-Ovulatory Follicle) were not well identified at the time of the calibration, or had never been encountered. Presence of these structures had been counted by certain readers, even if the difference between readers never exceeded 2%. Finally, when removing the less experienced reader, whom had absolutely no guidance with cellular identifications, the first reading results ranged from 54.3% to 87.1% for the percentage agreement and from 59.4% to 83.5% for Fleiss' kappa. The last reading results ranged from 68.1% to 83.9% for the percentage agreement and from 72.2% to 85.3% for Fleiss' kappa.

3.2 Cellular homogeneity

3.2.1 Bay of Biscay stock

For the 14 fish sampled in February 2022, 13 different cellular structures were quantified. The sampled fish is the variance that best explains the model, except for the gw (gonadal wall) and U (unknown) categories where it is the position of the section that explains best the model. For 11 of the 13 cellular structures, the position variables (D1, D2, 3, G1, G2, G3) have a lesser effect on the model, even when P is statistically significant ($P < 0.001$) (Table 7). However, the presence of og (oogonium) and aoA (atretic oocyte alpha) do not seem to be affected significantly by the position of the section. The PCA (Figure 8) allows for a visual validation, with 97.1% of the variation represented on the 2 main axis, with U, Is and ldo being the 3 main structures to influence the model.

3.2.2 English Channel stock

For the 16 fish sampled in November 2021, 12 different cellular structures were quantified. The individual was the variance that explained best the model, except for the bv (blood vessel) and gw (gonadal wall) categories where it is the position of the section that explains best the model. For 10 of the 12 cellular structures, the position variables (D1, D2, 3, G1, G2, G3) have a lesser effect on the model, even when P is statistically significant ($P < 0.001$) (Table 8). Moreover, the presence of og (oogonium), po1 (primary oocyte stage 1) and aoA (atretic oocyte alpha) do not seem to be significantly affected by the position of the section, while the presence of oaA and L (lysis) do not seem to depend on the individual sampled. The PCA (Figure 9) allowed for visual validation, with 98.5% of the variation represented on the 2 main axis, with Is, ldo and U as the 3 main structures influencing the model.

3.3 Visual vs Stereological maturity phase determination

A confusion matrix (Table 5) was set up to compare the maturity phases determined from the visual method with the stereological method. For all 317 *M. surmuletus* sampled during the study, 57 were visually classified as immature (A) individuals. Out of those 57 individuals, stereology showed that 93% were classified correctly. The remaining 7% were actually in the developing (B) maturity phase. Moreover, 30.5% of individuals classified

visually into B were correctly identified, while 66% were reclassified into A through stereology. Visually, 78% of fish were correctly classified under C (spawning), with 9% reclassified under E with stereology. Individuals classified visually into F (abnormal : presence of necrosis) were reclassified into phases A (69%) and B (31%) with stereology. All individuals classified into D visually came out as A with the stereological method. A single individual visually classified into B was reclassified into D with stereology. Out of the 317 individuals sampled, 216 were classified into A through stereology.

Table 5: Confusion matrix comparing maturity phase reading results between the visual (top row) and stereological (first column) method for 317 *M. surmuletus* sampled. The circled data are the number of individuals correctly estimated through the visual method, with A: Immature, B: Developing, Ca: Actively spawning, Cb: Spawning capable, D: Regression/Regeneration, E: Omitted spawning, F: Abnormal

	A	B	C	D	F
A	53	143	3	8	9
B	4	66	0	0	4
Ca	0	2	14	0	0
Cb	0	4	4	0	0
D	0	1	0	0	0
E	0	0	2	0	0

With the maturity phases determined through the visual appreciation of macroscopic criteria, as well as the stereologically determined maturity phases, L_{50} and A_{50} were calculated and summarized in Table 6. When comparing maturity phase results for both methods, stereology always yielded a higher size or age compared to the visual method. Indeed, for Bay of Biscay and English Channel stocks respectively, there are a 9.9 cm and 8.6 cm difference for the estimated L_{50} . For the estimation of the A_{50} for the Bay of Biscay stock, the visual method suggests a A_{50} of 0.1 years old while the stereological method suggests a A_{50} of 1.9 years old. For the English Channel stock, the visual method suggests a A_{50} of 0.6 years old while the stereological method suggests a A_{50} of 2.3 years old.

Table 6: For both stocks of *M. surmuletus*, length at which 50% of the population has reached sexual maturity (L_{50}) and age at which 50% of the population has reached sexual maturity (A_{50}) using estimated maturity phase by the visual and stereological methods

	Bay of Biscay	English Channel
Visual L_{50}	16,1 cm ($r^2=0,48$)	18,7 cm ($r^2=0,26$)
Stereology L_{50}	26 cm ($r^2=0,18$)	27,3 cm ($r^2=0,16$)
Visual A_{50}	0,1 yo ($r^2=0,5$)	0,6 yo ($r^2=0,2$)
Stereology A_{50}	1,9 yo ($r^2=0,34$)	2,3 yo ($r^2=0,41$)

3.4 Stereology results

3.4.1 Bay of Biscay stock

In the Bay of Biscay, mean germline cell percentages were established (Figure 1) for the 103 sampled *M. surmuletus*. In November 2020 ldo (lipid droplet oocyte) shows a high mean percentage of over 50%. In May, the highest mean germline cell percentages are 61% for vtg (oocyte in vitellogenesis), 18% for ho (hydrated oocyte) and 11% for oih (oocyte in hydration). POF (Post-Ovulatory Follicle) were also present at a very low rate 1%. Similarly, in July mean germline cell percentages were highest for vtg (37%), with a presence of ho (6%), oih (5%) and a very low presence of POF (1%). The presence of ldo (lipid droplet oocyte) was high in June (53%) and after the spawning period in September (61%). Mean ldo percentage was low in November (8%) and high again in February 2022 (61%), with a mean percentage of cao (cortical alveoli oocytes) of 17% for that same month. Atretic oocyte alpha (aoA) are present during the spawning period at low rates (<1%) except in July, with a mean percentage of 14%. Ultimately, po1 (primary oocyte stage 1) and po2 (primary oocyte stage 2) are present in all sampled months at variable mean percentages (<1% in May at it's lowest and 94% in October at it's highest).

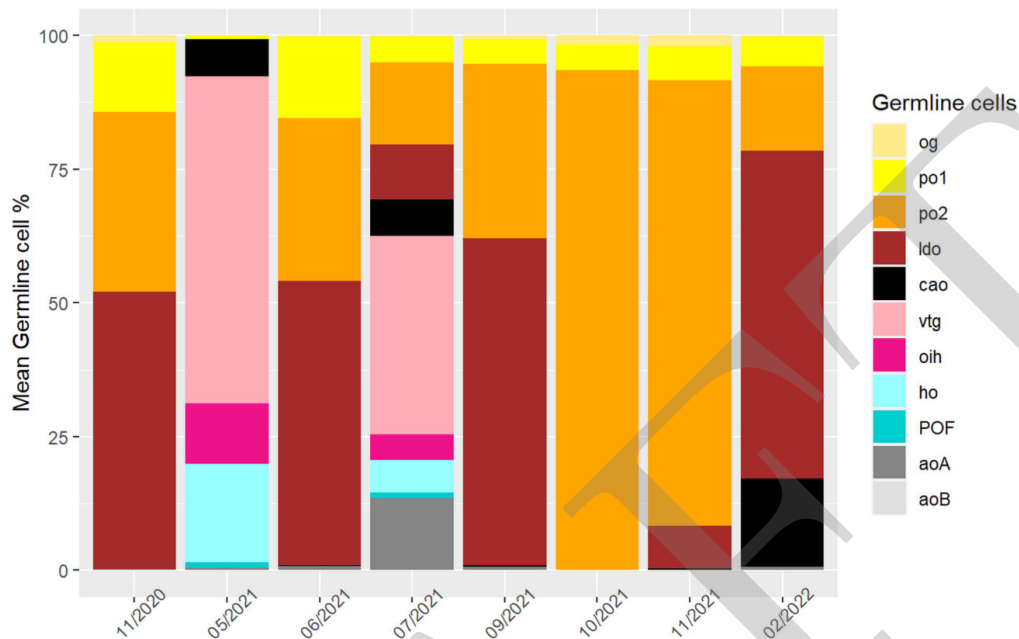


Figure 1: Monthly mean main germline cells percentages for *M. surmuletus* of the Bay of Biscay stock. With og: oogonium, po1: primary oocyte stage 1, po2: primary oocyte stage 2, ldo: lipid droplet oocyte, cao: cortical alveoli oocyte, vtg: oocyte in vitellogenesis, oih: oocyte in hydration, ho: hydrated oocyte, POF: Post-Ovulatory Follicle, aoA: atretic oocyte alpha, aoB: atretic oocyte beta

3.4.2 English Channel stock

Figure 2 shows the mean germline cell percentages for the 214 *M. surmuletus* sampled from the English Channel stock. Starting February 2021, mean cao percentage increase from 17% to 74% in April. Later during the year, after the spawning period, cao appear at very low rates in November and December 2021 (<1%) and rise to 28% by February 2022. A single individual with oih was recorded in March 2021 while other individuals started their vitellogenesis in April (vtg = 6%), with a mean germline vtg percentage of 47% in May. A low presence of POF was also recorded in May (<1%). Atretic oocyte alpha (aoA) were present from February to May, with mean percentages ranging from 1% in April to 5% in May. After the spawning period (August 2021), ldo shows a high mean percentage of over 50%. Finally, po1 are always present with po2 at variable rates. When there are no oocytes in vitellogenesis, mean po2 percentages are highest, with 59% or more in February and March 2021, and from September 2021 to February 2022.

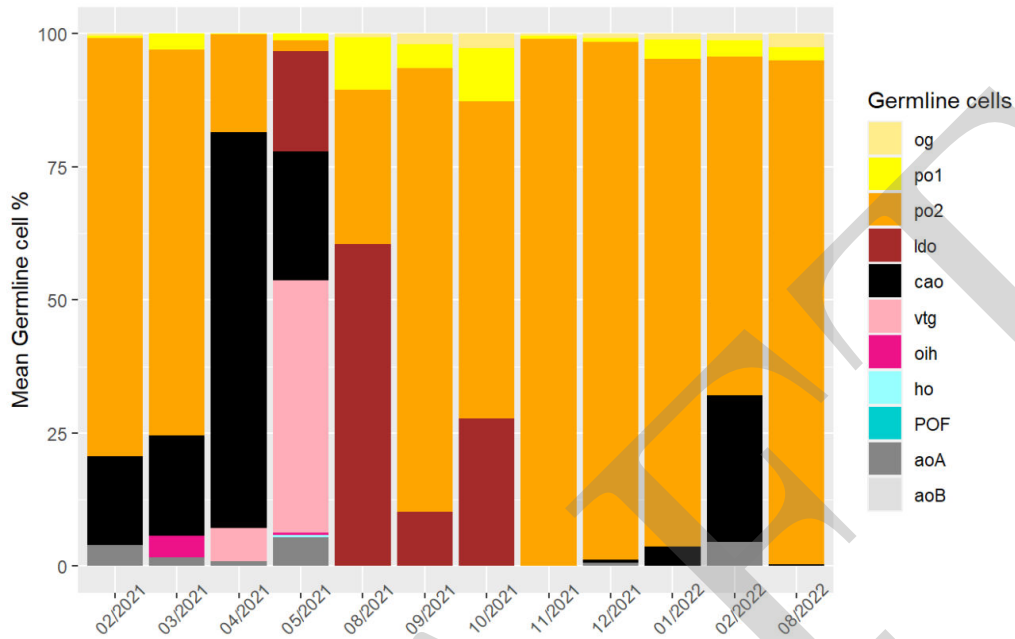


Figure 2: Monthly mean main germline cells percentages for *M. surmuletus* of the English Channel stock. With og: oogonium, po1: primary oocyte stage 1, po2: primary oocyte stage 2, ldo: lipid droplet oocyte, cao: cortical alveoli oocyte, vtg: oocyte in vitellogenesis, oih: oocyte in hydration, ho: hydrated oocyte, POF: Post-Ovulatory Follicle, aoA: atretic oocyte alpha, aoB: atretic oocyte beta

3.4.3 Oogenesis through time for both stocks

For a better visualization of the data, Figure 3 shows sampled *M. surmuletus* from both stocks, classified by month and size, with a color code for the stereologically established maturity phases. For the English Channel stock, individuals sampled in February 2021 ranged from 24 cm to 33 cm, with 11/20 classified into phase A (immature) and the others into phase B (developing). In March, 8 were in A, 4 in B and 1 in C (spawning), and sizes ranged from 20 cm to 25 cm. By April, all individuals were classified under B and were of a length of 20 cm to 24 cm. In May females for both stocks were classified into the spawning phase. Sampled individuals ranged from 24 cm to 30 cm in size, with 9 out of 11 fish from the Bay of Biscay in Ca (has already spawned at least once and is able to spawn again) and only 2 out of 15 females from the English Channel were spawning capable (Cb) while the others were still in development (B). A second spawning event was recorded in July for the Bay of Biscay stock, with fish categorized into phases A (3), C (9), D (1) and E (2). In June, only individuals of 15 cm to 21 cm were sampled for the Bay of Biscay stock, with 6/7 classified into phase A. Outside of the

spawning period, from August to December, 136 out of the 140 sampled *M. surmuletus* were classified into phase A, with total fish lengths ranging from 12 cm to 36 cm. For the English Channel stock, the amount of individuals in phase B increased starting January 2022 (23%), to reach a ratio of 80% of individuals in phase B, for both stocks with fish of similar sizes (from 22 cm to 29cm). In an effort to sample individuals in phase D right after spawning, a last sampling occurred in August 2022 with individuals of 19 cm to 24 cm, however, 12 of those 13 sampled individuals were classified into phase A, and one in phase B.

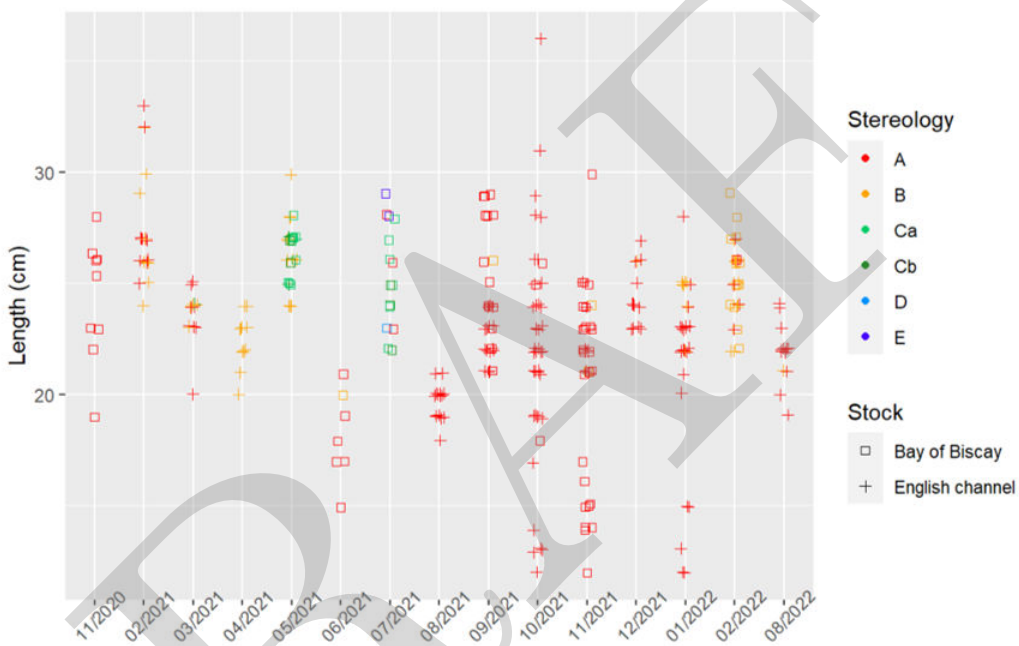


Figure 3: Monthly sampled *M. surmuletus* classified by length (cm), for the English Channel (+) and Bay of Biscay (□) stocks. The maturity phase was estimated through the stereological method, with A: Immature, B: Developing, Ca: Actively spawning, Cb: Spawning capable, D: Regression/Regeneration, E: Omitted spawning

3.5 Stereology results

With the lost of a signal that could help classify the individuals into phase D, such as presence of POF (Post-Ovulatory Follicle) or aoB (atretic oocyte beta), individuals outside of the spawning period were categorized into phase A through the use of stereology. A hierarchical clustering was used as an unsupervised learning method to see if real immature individuals could be

separated from those that had actually spawned a few months prior. From this, all 216 individuals previously classified into A were split into two groups (Figures 4 and 10) : with A (immature) and pfB (possible future developing individuals). The leading variable in the grouping was the presence of ldo (lipid droplet oocyte).

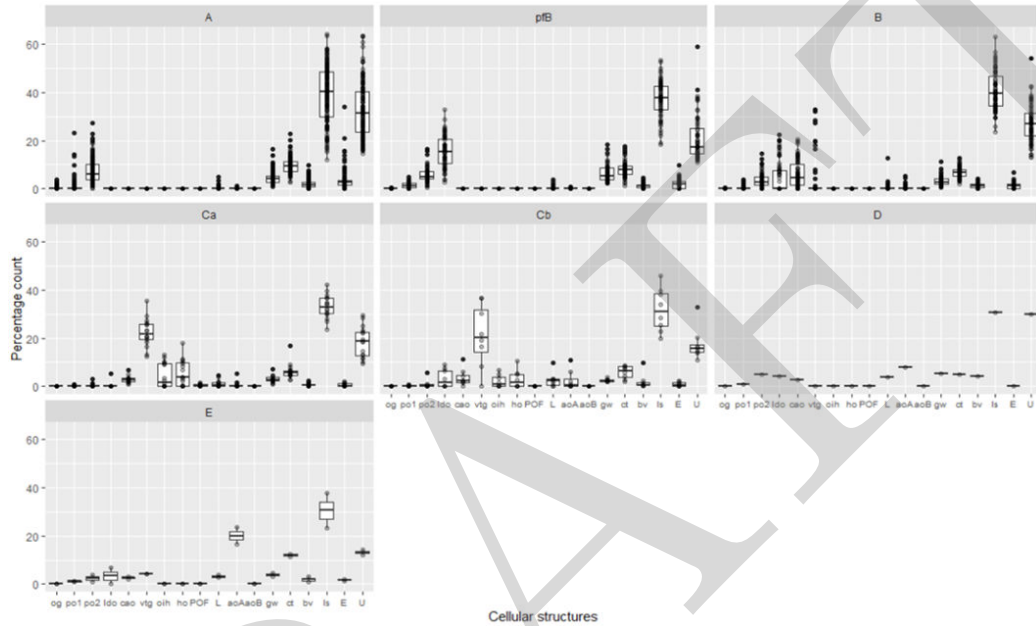


Figure 4: Boxplot of cell structure percentages for all *M. surmuletus* individuals classified into the A (Immature), pfB (potentially future Developing), B (Developing), Ca (Actively spawning), Cb (Spawning capable), D (Regression/Regeneration) and E: Omitted spawning maturity phases through the use of stereology. With og: oogonium, po1: primary oocyte stage 1, po2: primary oocyte stage 2, ldo: lipid droplet oocyte, cao: cortical alveoli oocyte, vtg: oocyte in vitellogenesis, oih: oocyte in hydration, ho: hydrated oocyte, POF: Post-Ovulatory Follicle, aoA: atretic oocyte alpha, aoB: atretic oocyte beta, L: lysis, bv: blood vessel, Is: intercellular space, gw: gonadal wall, ct: connective tissue, E: unnatural emptiness and U: undetermined

When visualizing data with individuals reclassified into the A or pfB groups (Figure 5), pfB fish were mainly present in November 2020, June 2021 and from August to November 2021. Before the spawning period, in November 2020, out of the 7 one year old *M. surmuletus*, 5 were classified into pfB, as well as both 2 year old individuals. During the spawning period in June, five out of the six 0 year old individuals were classified into pfB, the last one being in phase A. After spawning, all individuals sampled in August

2021 were 1 year old and classified into pfB. In September, 50% of sampled fish were classified into pfB, with all individuals of 2 years or older classified into pfB or B. In October all 0 year old fish were in phase A. One year old fish were either in A (58%) or pfB (42%), while fish of two years or older were classified under pfB except for one individual in A. By November, 0 year old fish were in phase A, 21 one year old were in A and 2 were in pfB, and for two year old individuals, one was in A, one in pfB and one in B. Finally, all individuals in December classified into A were of 1 or 2 years of age while the only 3 year old individual was in phase B.

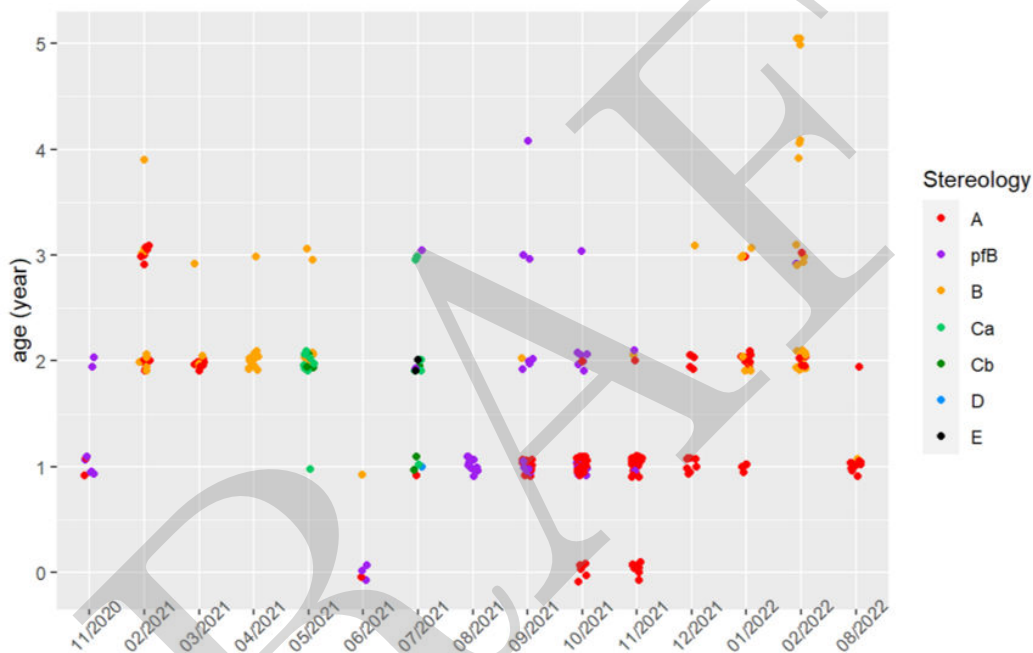


Figure 5: Monthly sampled *M. surmuletus* classified by age (year), for the entirety of the study. The maturity phase was estimated through the stereological method, with A: Immature, pfB: potentially future Developing, B: Developing, Ca: Actively spawning, Cb: Spawning capable, D: Regression/Regeneration, E: Omitted spawning

The gonado-somatic index (GSI) was calculated for 296 fish. Figure 6 shows boxplots of the GSI for all individuals classified into the different maturity phases. Only one individual was classified into D, and no clear GSI value could be extracted to differentiate fish into different maturity phases that aren't C (spawning), even if an increase of the mean GSI can be seen as the maturity phase progresses from A (immature) to C.

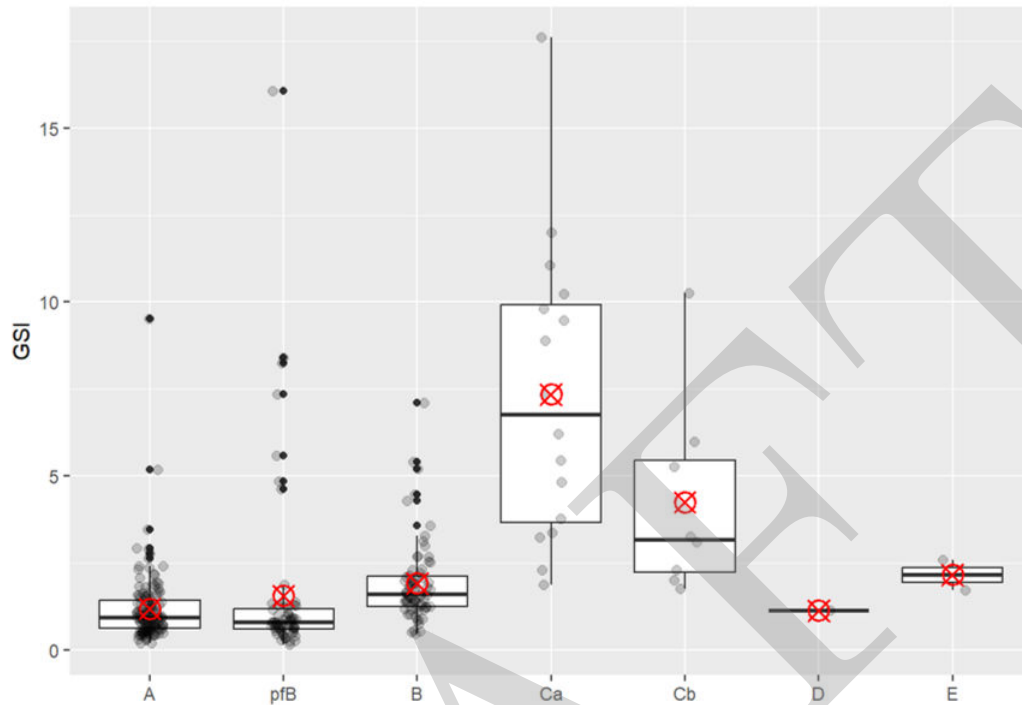


Figure 6: Boxplot of the gonda-somatic index (GSI) of sampled *M. surmuletus* individuals classified by maturity phase, with A: Immature, pfB: potentially future Developing, B: Developing, Ca: Actively spawning, Cb: Spawning capable, D: Regression/Regeneration, E: Omitted spawning

Finally, maturity ogive, L_{50} and A_{50} were calculated (Figure 7). When adding pfB individuals into the model, the L_{50} is estimated at 22.9 cm (confidence intervals = 21.8 - 23.9 cm) and the A_{50} at 1.5 years (confidence intervals = 1.3 - 1.8 years). When removing these individuals completely from the model, the L_{50} is estimated at 24.8 cm (confidence intervals = 24.1 - 25.8 cm) and A_{50} at 1.9 years (confidence intervals = 1.8 - 2.1 cm).

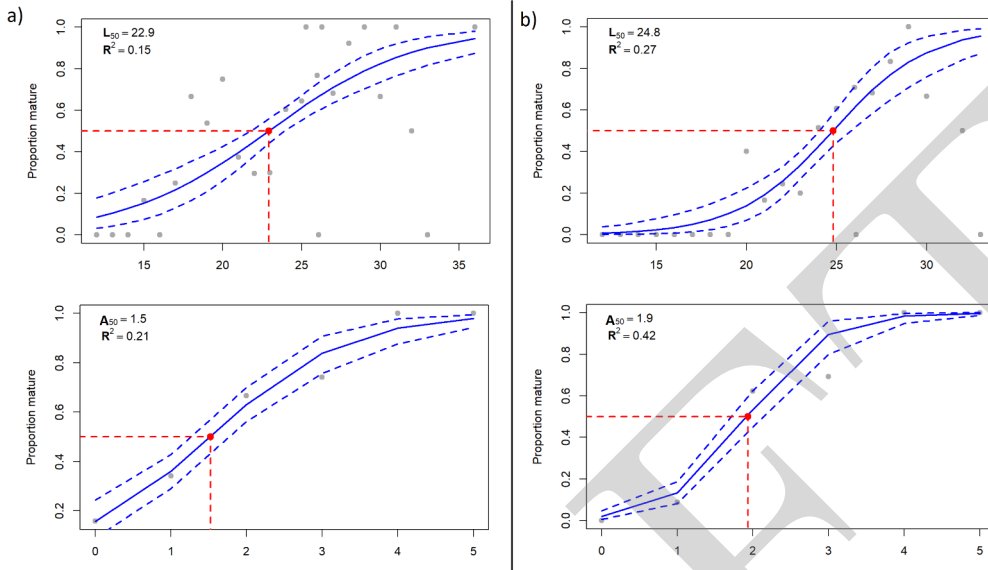


Figure 7: Computing of the length at which 50% of the population of *M. surmuletus* has reached sexual maturity (L_{50}) and age at which 50% of the population of *M. surmuletus* has reached sexual maturity (A_{50}), from the sizeMat R package. a) L_{50} (top) and A_{50} (bottom) calculated when taking into account the pfB group as part of the sexually mature individuals. b) L_{50} (top) and A_{50} (bottom) calculated when removing pfB individuals from the formula

4 Discussion

4.1 Reader inter-calibrations

With multiple (three) agents being included in the reading of histological slides in this project, a calibration exercise for all reading agents was mandatory. Moreover, each reading agent possessed a different background knowledge on identification of ovarian structures from histological slides. A fourth reader, that only participated in the calibration exercise, had absolutely no previous knowledge on histology or gametogenesis and was subjected to the calibration readings with the reading protocol (Dubroca *et al.*, 2023) and lexicon (Berthelin *et al.*, 2023) as his only guides. The calibration readings with readers of varying experience showed the importance of a detailed lexicon for the identification of germline cells, as well as a reading protocol. While the lexicon is here to describe in detail the cellular structures found within the ovaries, the protocol sets down rules to harmonize the stereological reading process. Before the protocol was set up, when a counting cross fell between two structures there would be a disparity between readers whom

would favor one type of structure above another, like favoring a germ cell over a structure like connective tissue, gonadal wall or blood vessels.

The calibration exercise underlined three main difficulties. The first difficulty was in identifying structures in lysis (L) or oocytes in atresia (aoA and aoB). These structures do not have definite sizes or shapes and are not always identifiable depending on the degree of lysis. The other two main difficulties were the identification of rare structures (oaB or POF) and confusion between lysis and connective tissue. Atretic oocytes beta and Post-Ovulatory Follicles were rarely (POF) or never (aoB) encountered during the readings, with a limited description in the lexicon that led to missed identifications during the calibration. The second difficulty, confusion between lysis and connective tissue, was mainly due to the staining that gave both structures a green tint. However, for the identification of the main germline cells, the results were more than satisfactory with a difference of less than 4% amongst all readers. The U (undetermined) category, was higher for readers with less experience. This did not influence the counts of the main germline cells and assures the readings to favor quality over quantity regardless of the readers' experience. Moreover, the high number of sampling points assured the adequate representation of the quantified structures over the studied surface (Gundersen & Jensen, 1987; Sauger *et al.*, 2020).

4.2 Cellular homogeneity

Cellular homogeneity for individuals from the Bay of Biscay stock showed no difference in cellular composition depending on the section. Only the gonadal wall (gw) surface showed a slight impact depending on the position of the section. The presence of oogonium (og) and atretic oocytes alpha (aoA) are not significantly affected by the position of the section, however the deviances are very low compared to other models. This may be explained by either the very small size of the structure that may be present on the section but not quantified (og) or by the presence of the structure (aoA) only in the cross section of certain individuals. In this case, it is clear that very small sized structures, such as og, are not accurately represented.

Cellular homogeneity for individuals from the English Channel stock showed that all slides were similar in their cellular structure compositions. The position of the cross section seemed to have a slight effect on the quantified volume of blood vessels (bv) and gonadal wall (gw). Like the previously, small (og and po1) and uncommon (L and aoA) structures are not accurately represented. regardless of this issue, this does not impede on the maturity phase determination for this species, and validates the fact that the position of the section within the ovary matters little.

4.3 Spawning period

For individuals from the Bay of Biscay, two spawning events were recorded in May and July, with presence of individuals that are actively spawning (presence of hydrated oocytes) but have also already spawned (presence of Post-Ovulatory Follicles.). In June, only small sized individuals were sampled, with 6 classified into A (immature) and 1 into B (developing). Unfortunately, no samples could be acquired before May and after July to follow the beginning and end of the spawning period. However the May-June spawning period seem to match those from the literature (N'Da & Deniel, 1993; Desbrosses, 1933).

For individuals from the English Channel stock, vitellogenesis started in March, with a few spawning capable females in May. Unfortunately, no samples could be acquired in June and July, which would have been the spawning period (Mahé *et al.*, 2005) with a peak in June (Mahé *et al.*, 2013).

When looking at only the gonadal development of the species, regardless of the stocks the individuals came from, a high percentage (over 30%) of atretic oocytes alpha are recorded in July at the end of the spawning period. After July, no POF (Post-Ovulatory Follicle) or aoB (atretic oocyte Beta) were found, event though the individuals sampled in August were small in size, the signal was still missing in September for larger individuals. Outside of the spawning period, only primary growth oocytes (oogonium (og), primary oocyte stage 1 (po1), primary oocyte stage 2 (po2) and lipid droplet oocyte (ldo) are present, with cortical alveoli oocytes (cao) appearing in December and becoming more prominent starting February. This was also observed by N'Da & Deniel (1993). *M. surmuletus* is an iteroparous batch spawner with a short spawning period (3 months) and a very short regression phase (D) right after spawning.

During the spawning period and right after, individuals classified into A (immature) show presence of ldo. These ldo will mature into cao starting January, however to confirm this, sampling of 2 years and older individuals would be needed. This underlines the limitation of an opportunistic sampling method, as well as the importance of a high sample number of individuals from different size categories during the spawning period.

4.4 Maturity phase determination

The study of this species underlined the limitations of both the use of stereology and the visual macroscopic approach for maturity determination. Indeed, stereology wise, the quick disappearance of Post-Ovulatory Follicles and fast atresia of cao and vitellogenic oocytes after spawning leads to a high clas-

sification of fish into phase A (immature) regardless of the high probability (size and age wise) that these individuals have participated in the previous spawning event. The use of stereology is however beneficial for identifying omitted spawning (E) individuals since this phase relies on the presence of 50% of atretic oocytes alpha. In regards to the to the visual method, maturity phase A determination is linked to the transparency of the gonad. However, the ovary is vascularized early on (presence of blood vessels, 4), becoming opaque. For the stereological method, this led to misclassification of sexually mature individuals into the immature (A) phase. For the visual method, this led to misclassification of immature (A) individuals into the sexually mature categories. Under-estimating the size or age at first maturity with the visual method is a known problem when collecting this data for a multitude of species (Gerritsen & McGrath, 2006; Lang *et al.*, 2013; McPherson *et al.*, 2011; Burchard *et al.*, 2013; Midway & Scharf, 2012). Once again, this underlines the importance of sampling during the spawning period, regardless of the method used. Finally, the gonado-somatic index (GSI) was calculated, however there was no clear evidence that the GSI could help with identifying the maturity phase of individuals outside of the spawning phase (Mahé *et al.*, 2005, 2013).

4.5 Length and size at maturity

Before reassigning all individuals classified under A (immature) by the stereological method, the length (L_{50}) and age (A_{50}) at which 50% of the population has reached sexual maturity were compared for both stocks. For the Bay of Biscay stock, the visual approach estimates a L_{50} at 16.1 cm with a A_{50} at 0.1 year. This result is under the estimated first size at maturity for female *M. surmuletus* of 18 cm by Dorel (1986). For the English Channel stock, the visual method estimated a L_{50} at 18.7 cm, a higher result when comparing with results from Desbrosses (1933) that estimated a size at first maturity of 18 cm, or a L_{50} of 16.9 cm by Mahé *et al.* (2013). The A_{50} estimated through the visual method was of 0.6 year, under the estimated A_{50} of almost 1 year old by Mahé *et al.* (2005) or the age at first maturity of 2 years old by Desbrosses (1933).

No L_{50} or A_{50} were previously established for *M. surmuletus* by using data from histological observations. Moreover, with the clear misclassification of sexually mature individuals into phase A (immature), the calculated L_{50} and A_{50} are over-estimated. A solution to this would have been to establish the L_{50} and A_{50} by using data from individuals sampled from March (beginning of vitellogenesis) to July (end of spawning period). Unfortunately, with missing data for certain months depending on the stock, and too few immature

individuals sampled during the spawning period, a L_{50} or A_{50} could not be calculated appropriately.

In order to separate real immature individuals from those classified under phase A but whom were potentially sexually mature, hierarchical clustering was used. This led to the establishment of two groups. A first group of individuals with no ldo (lipid droplet oocytes) that was reclassified under phase A (immature) and a second group with ldo classified under pfB (potential future developing individuals). The presence of lipid droplets in teleost oocytes play an important role in germline cells maturation and are oocytes' main energy source in vitellus (Johnson, 2009; Wiegand, 1996). During the spawning period small sized (<21cm) individuals of 1 year of age or less showed no cortical alveoli oocytes (cao) but ldo were present. After the spawning period, from September to November, ldo were mostly found in individuals of 2 years of age or older, with a size of ≥ 21 cm.

As previously stated, with the lost of structures such as Post-Ovulatory Follicles (POF) and fast atresia of cao and vitellogenic oocytes after spawning, identifying individuals that have previously participated in spawning is impossible. However there seems to be a group-synchronous oocyte development (Murua & Saborido-Rey, 2003), with presence of ldo in small sized individuals during the spawning period and larger sized individuals after the spawning period. This could be signalling that these ldo will be recruited for a future spawning season, so potentially future spawners. When using the ICES's maturity staging key (ICES, 2018), the Ba (developing but sexually immature) sub-phase could be applied here, however our clustering could also include individuals that have already spawned, thus we decided to forgo the use of Ba nomenclature for correctness. For this reason, when calculating L_{50} or A_{50} , the question was raised whether these pfB individuals should be taken into account or removed from the calculation, thus the choice to present results (7 including pfB individuals ($L_{50}=22.9$ cm and $A_{50}=1.5$ year) and excluding them ($L_{50}=24.8$ cm and $A_{50}=1.9$ year).

Finally, when using stereology a bias is formed since physiological maturity (when fish can produce gametes) and functional maturity (when fish can produce gametes and contribute to larval production) are rarely differentiated (Hunter & Macewicz, 1985; Prince *et al.*, 2022). This comes from the definitions of the size at first maturity. With histology an individual will become sexually mature when the gonadotropin-dependent development of gonads begins, which is identified by the first appearance of cao (Brown-Peterson *et al.*, 2011). In fisheries management, the size recorded is when individuals begin contributing to the stock biomass (*i.e.* first spawning) (Prince *et al.*, 2022). This leads to histology over-estimating the actual reproductive potential of stocks and the behaviour of the species should be taken into account

during sampling (Prince *et al.*, 2022), especially for *M. surmuletus* that is known to have mature and immature individuals migrating during the year between coastal and deeper waters (Mahé *et al.*, 2005; Whitehead *et al.*, 1986; Quéro, 1984), with larger fish present at deeper depths (Desbrosses, 1933).

5 Conclusion

In fisheries management, proper assessment of sexual maturity phase for exploited stock species ensures fitting estimations of age and size at first sexual maturity. This will lead to more accurate estimations of the spawning stock biomass (SSB), an important indicator used when defining the total allowable catch (TAC) and minimal legal length (MLL), ultimately favoring a viable exploitation of the stock. In this study to determine a L_{50} and A_{50} for the Striped red mullet (*M. surmuletus*) by using histology and stereology, objectivity and reproducibility were assured by the implementation of a protocol, while replicability was certified through calibration of reading agents. Testing cellular homogeneity confirmed that cross sections anywhere in the ovary would yield the same reading results. Finally, whether the visual or stereological method is used for maturity phase determination, in order to diminish the risk of misclassification it is of utmost importance to favor a monthly or bi-monthly sampling during the spawning period (March to August for stereology and May to July for the visual method) while taking into account multiple size classes.

6 Supplementary materials

All macroscopic ovarian pictures, scanned histological slides, stereology reading results and sampling data are available on the Zenodo data repository for individuals from the Bay of Biscay stock (Sauger *et al.*, 2023a) and individuals from the English Channel stock (Sauger *et al.*, 2023b). For an access to the R scripts used for data analyses, contact the main authors.

Appendices

Table 7: Results of the *drop1* function (R package), for the binomial General Linear Model (logit link) for each cellular structure quantified in 6 histological slides of different positions (D1, D2, 3, G1, G2, G3) for 14 *M. surmuletus* ovaries from the Bay of Biscay stock. With df = degrees of freedom, deviance = the residual deviance of the model, AIC = the Akaike information criterion, P(Chi) = p-value calculated through a Chi² distribution, og: oogonium, po1: primary oocyte stage 1, po2: primary oocyte stage 2, ldo: lipid droplet oocyte, cao: cortical alveoli oocyte, vtg: oocyte in vitellogenesis, oih : oocyte in hydration, ho: hydrated oocyte, POF: Post-Ovulatory Follicle, aoA: atretic oocyte alpha

		df	deviance	AIC	P (Chi)
og	Intercept		21,30	83,49	
	Fish	13	52,54	88,73	0,003113 **
	position	5	31,58	83,77	0,067773
po1	Intercept		61,99	407,18	
	Fish	13	184,90	504,08	<2.2e-16 ***
	position	5	80,22	415,40	0,002679 **
po2	Intercept		148,31	541,34	
	Fish	13	408,86	775,89	<2.2e-16 ***
	position	5	167,74	550,77	0,001596 **
ldo	Intercept		293,83	842,81	
	Fish	13	589,05	1112,03	<2.2e-16 ***
	position	5	324,06	863,04	1,325e-05 ***
cao	Intercept		126,26	526,72	
	Fish	13	1043,11	1417,57	<2.2e-16 ***
	position	5	158,49	548,95	5,362e-06 ***
oaA	Intercept		35,87	143,21	
	Fish	13	156,24	237,58	<2.2e-16 ***
	position	5	39,21	136,55	0,6485
bv	Intercept		250,71	547,01	
	Fish	13	477,52	747,82	<2.2e-16 ***
	position	5	301,55	587,85	9,328e-10 ***
ct	Intercept		200,20	671,99	
	Fish	13	350,51	796,30	<2.2e-16 ***
	position	5	241,94	703,73	6,633e-08 ***
E	Intercept		116,71	194,07	
	Fish	13	286,44	337,80	<2.2e-16 ***
	position	5	145,25	212,62	2,844e-05 ***
gw	Intercept		1044,70	1517,10	
	Fish	13	1311,80	1758,20	<2.2e-16 ***
	position	5	1413,00	1875,40	<2.2e-16 ***
Is	Intercept		620,70	1216,80	
	Fish	13	779,48	1349,50	<2.2e-16 ***
	position	5	704,96	1291,00	<2.2e-16 ***
L	Intercept		382,24	617,70	
	Fish	13	628,16	837,62	<2.2e-16 ***
	position	5	435,19	660,65	3,443e-10 ***
U	Intercept		970,43	1551,30	
	Fish	13	1178,92	1733,80	<2.2e-16 ***
	position	5	1402,60	1973,50	<2.2e-16 ***

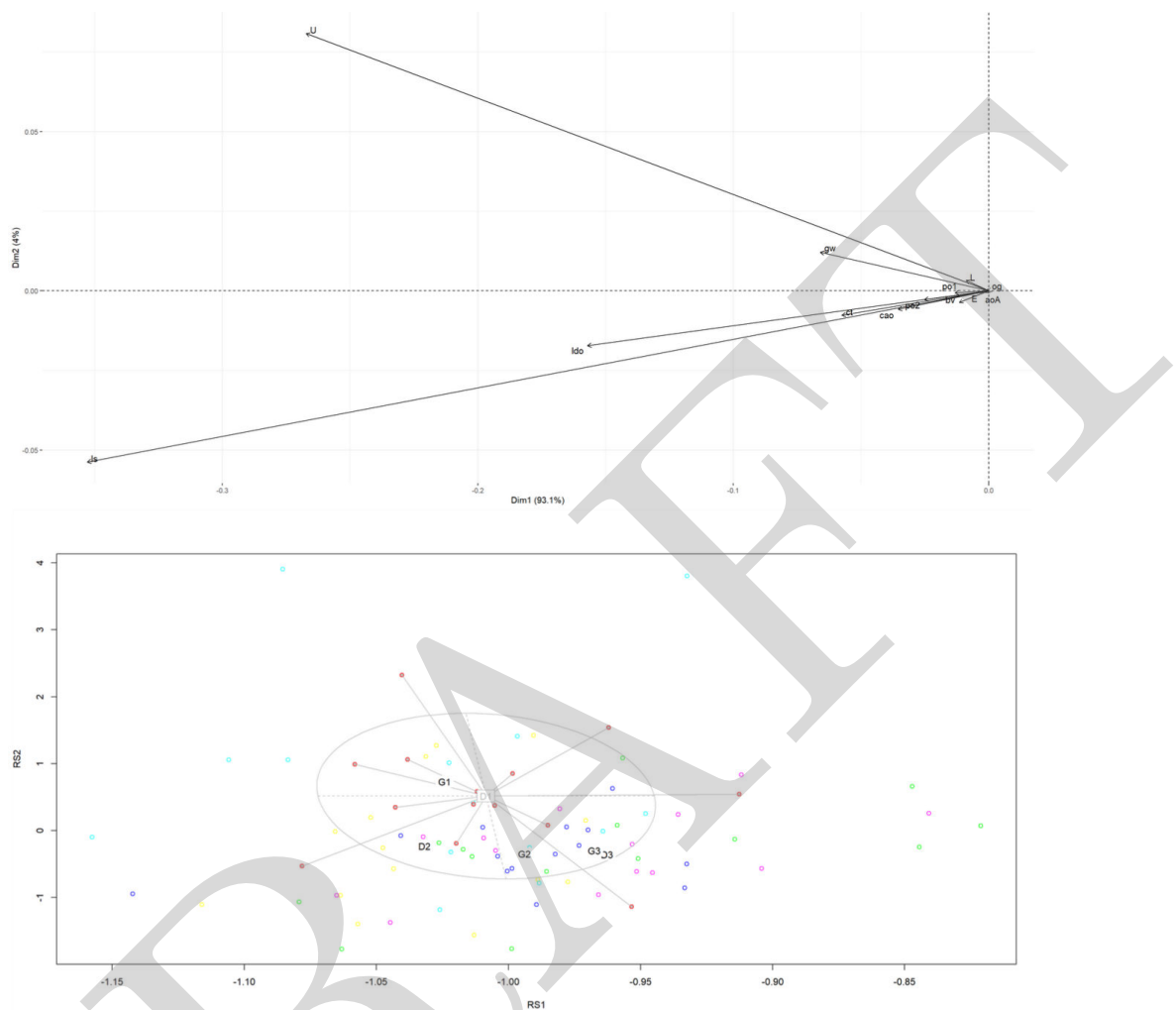


Figure 8: Principal component analysis (PCA) of the cellular structures quantified in 6 histological slides of different positions (D1, D2, 3, G1, G2, G3) for 14 *M. surmuletus* ovaries from the Bay of Biscay stock. With og: oogonium, po1: primary oocyte stage 1, po2: primary oocyte stage 2, ldo: lipid droplet oocyte, cao: cortical alveoli oocyte, vtg: oocyte in vitellogenesis, oih : oocyte in hydration, ho: hydrated oocyte, POF: Post-Ovulatory Follicle, aoA: atretic oocyte alpha, aoB: atretic oocyte beta

Table 8: Results of the *drop1* function (R package), for the binomial General Linear Model (logit link) for each cellular structure quantified in 6 histological slides of different positions (D1, D2, 3, G1, G2, G3) for 16 *M. surmuletus* ovaries from the English Channel stock. With df = degrees of freedom, deviance = the residual deviance of the model, AIC = the Akaike information criterion, P(Chi) = p-value calculated through a Chi² distribution, og: oogonium, po1: primary oocyte stage 1, po2: primary oocyte stage 2, ldo: lipid droplet oocyte, cao: cortical alveoli oocyte, vtg: oocyte in vitellogenesis, oih : oocyte in hydration, ho: hydrated oocyte, POF: Post-Ovulatory Follicle, aoA: atretic oocyte alpha

		df	deviance	AIC	P (Chi)
og	Intercept		65,28	193,99	
	Fish	15	116,17	214,89	8,587e-06 ***
	position	5	71,22	189,94	0,3113
po1	Intercept		102,78	492,92	
	Fish	15	191,69	551,83	1,583e-12 ***
	position	5	111,12	491,26	0,1385
po2	Intercept		138,57	684,29	
	Fish	15	832,96	1348,68	<2.2e-16 ***
	position	5	165,19	700,91	6,753e-05 ***
ldo	Intercept		155,84	796,83	
	Fish	15	1027,77	1638,76	<2.2e-16 ***
	position	5	193,71	824,69	4,022e-07 ***
oaA	Intercept		0,00	44,00	
	Fish	15	5,48	19,48	0,9872
	position	5	3,56	37,55	0,615
bv	Intercept		217,37	615,39	
	Fish	15	470,89	838,91	<2.2e-16 ***
	position	5	481,73	869,75	<2.2e-16 ***
ct	Intercept		111,59	667,32	
	Fish	15	294,01	819,73	<2.2e-16 ***
	position	5	125,57	671,30	0,01572 *
E	Intercept		959,86	1177,00	
	Fish	15	1268,55	1455,60	<2.2e-16 ***
	position	5	1089,18	1296,30	<2.2e-16 ***
gw	Intercept		250,39	769,12	
	Fish	15	378,04	866,76	<2.2e-16 ***
	position	5	406,78	915,51	<2.2e-16 ***
Is	Intercept		266,55	949,68	
	Fish	15	564,98	1218,11	<2.2e-16 ***
	position	5	295,06	968,20	2,89e-05 ***
L	Intercept		5,41	56,39	
	Fish	15	23,80	44,78	0,2428
	position	5	21,45	62,43	0,00673 **
U	Intercept		127,41	743,72	
	Fish	15	221,85	808,16	1,463e-13 ***
	position	5	138,58	744,90	0,04803 *

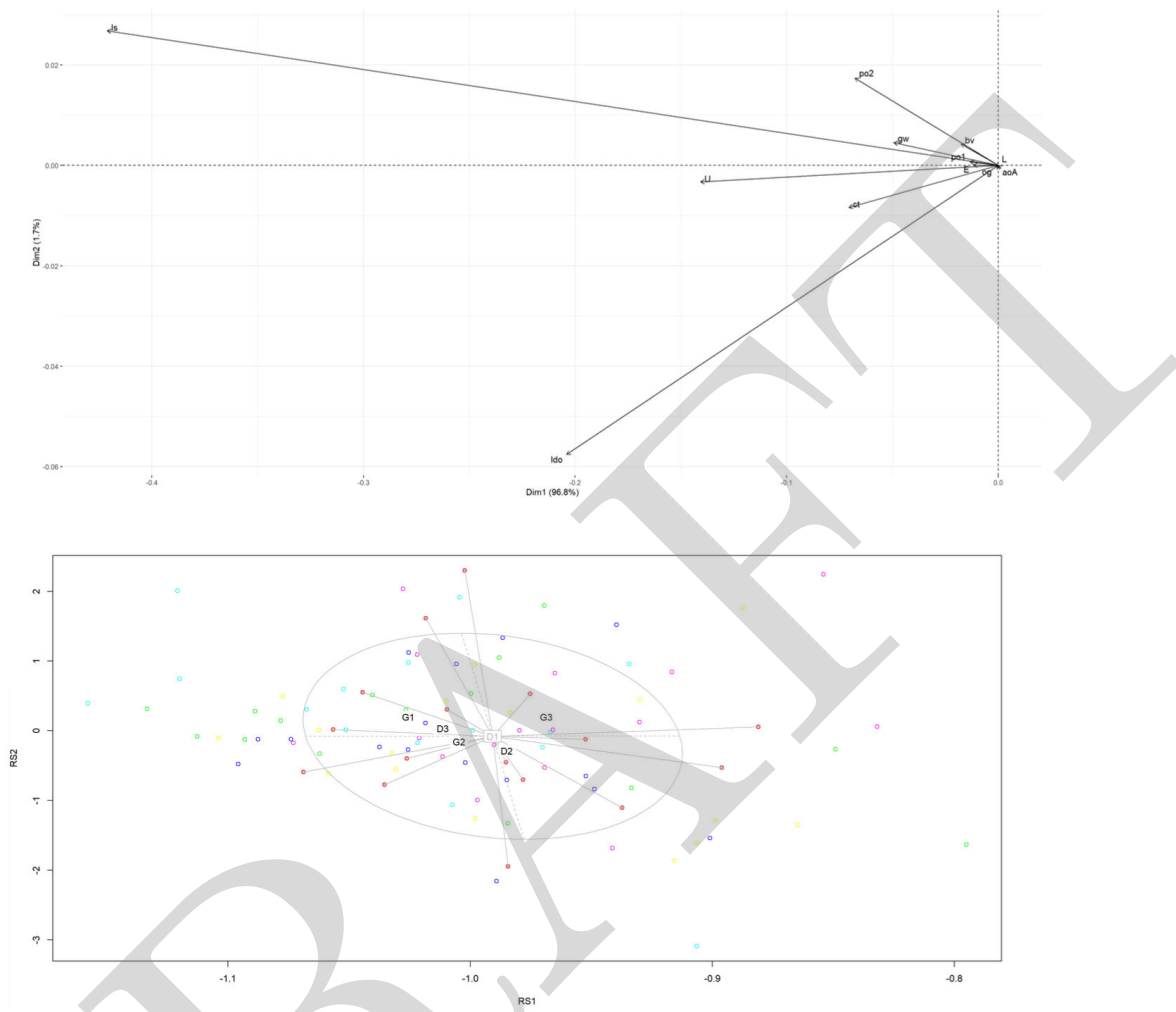


Figure 9: Principal component analysis (PCA) of the cellular structures quantified in 6 histological slides of different positions (D1, D2, 3, G1, G2, G3) for 16 *M. surmuletus* ovaries from the English Channel stock. With og: oogonium, po1: primary oocyte stage 1, po2: primary oocyte stage 2, ldo: lipid droplet oocyte, cao: cortical alveoli oocyte, vtg: oocyte in vitellogenesis, oih : oocyte in hydration, ho: hydrated oocyte, POF: Post-Ovulatory Follicle, aoA: atretic oocyte alpha, aoB: atretic oocyte beta

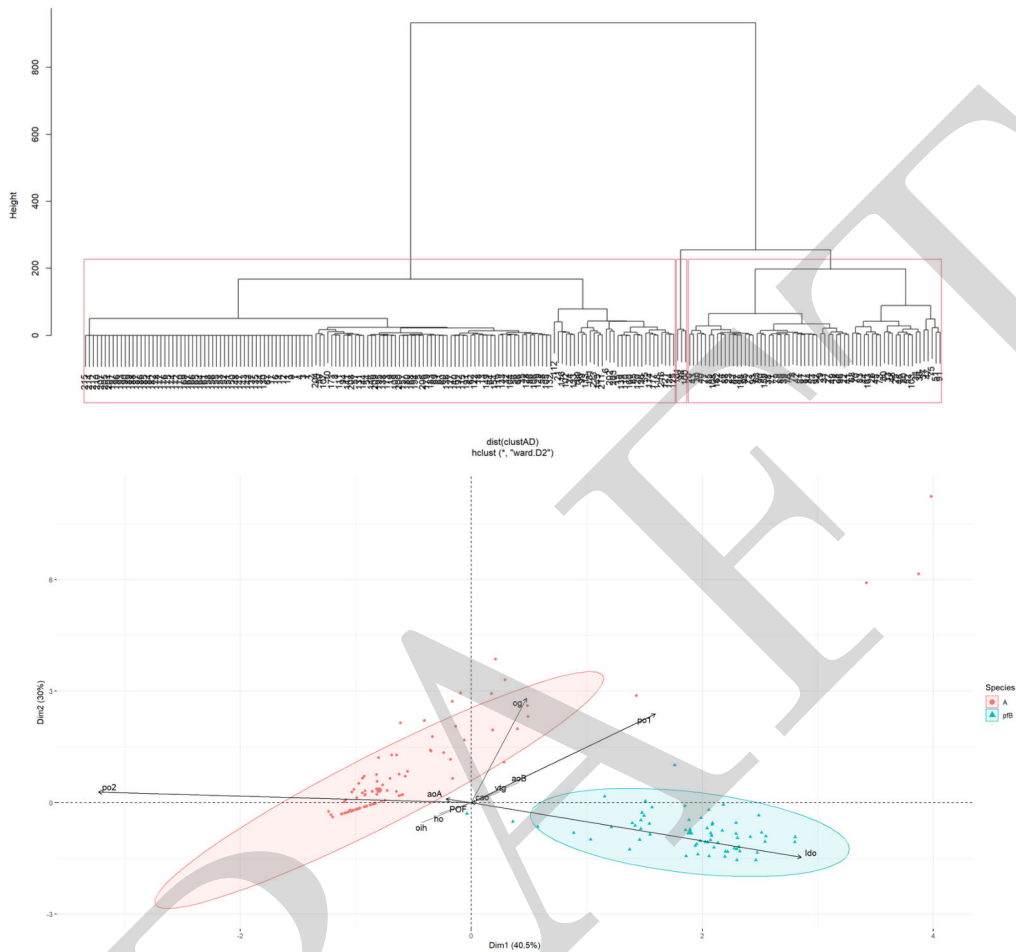


Figure 10: Dendrogram and principal component analysis (PCA) representations of the hierarchical clustering performed on the cellular structures quantified in all *M. surmuletus* individuals that were classified under the sexual maturity phase A (immature) under the stereological method, and reclassified either under A (immature) or pfB (potentially future developing). With og: oogonium, po1: primary oocyte stage 1, po2: primary oocyte stage 2, ldo: lipid droplet oocyte, cao: cortical alveoli oocyte, vtg: oocyte in vitellogenesis, oih : oocyte in hydration, ho: hydrated oocyte, POF: Post-Ovulatory Follicle, aoA: atretic oocyte alpha, aoB: atretic oocyte beta

7 Acknowledgements

Funding of the MATO project was provided by France Filière Pêche. Fish accessibility was possible through the Direction Scientifique of IFREMER, the International Bottom Trawl Surveys (CGFS, EVHOE and IBTS), Pêcheurs

d'Aquitaine and Port-en-Bessin's fish market. The authors would also like to thank Timothé Nivet for his contribution with the reading of histological slides during the calibration assessment.

8 Author contributions

Carine Sauger: Data collection, oogenesis description, slide processing, slide reading, statistical analyses. (Main author)

Kristell Kellner: Oogenesis description.

Clothilde Berthelin : Oogenesis description.

Valentine Martin : Data collection, oogenesis description, slide reading.

Anna Le Meleder : Data collection, slide processing, slide reading.

Nadège Villain-Naud: Slide processing.

Nicolas Elie: Image analyses and stereology grid processing.

Laurent Dubroca: Data collection, Statistical analyses.

All authors have contributed to the production of this document.

9 Competing interests

There are no significant competing financial, professional, or personal interests that might have influenced the performance or presentation of the work described in this paper.

References

- Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R. T., Murray, L. J., Coleman, H. G., James, J. A., Salto-Tellez, M., & Hamilton, P. W. 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*, **7**(1), 16878.
- Berthelin, C., Dubroca, L., Kellner, K., Le Meleder, A., Martin, V., & Sauger, C. 2023. Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the striped red mullet, *Mullus surmuletus* (Linnaeus, 1758). *IFREMER*, 33.
- Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. J., & Lowerre-Barbieri, S. K. 2011. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*, **3**(1), 52–70.

- Bucholtz, R. H., Tomkiewicz, J., Nyengaard, J. R., & Andersen, J. B. 2013. Oogenesis, fecundity and condition of Baltic herring (*Clupea harengus* L.): A stereological study. *Fisheries Research*, **145**(Aug.), 100–113.
- Burchard, K. A., Juanes, F., Rountree, R. A., & Roumillat, W. A. 2013. Staging ovaries of Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*): implications for maturity indices and field sampling practices. *Fishery Bulletin*, **111**(1), 90–106.
- Chessel, D., & Thioulouse, J. 2013. *Modèle linéaire généralisé*. Fiche n°5 d'utilisation du logiciel R. 38.
- Conger, A. J. 1980. Integration and Generalization of Kappas for Multiple Raters. *Psychological Bulletin*, **88**(2), 322–328.
- de Boois, I. J., Burt, G., Lecomte, J.-B., Masnadi, F., Panten, K., Raat, H., Sigurdsson, G. M., & Thorlacius, M. 2023. *ICES Survey Protocols – Offshore Beam Trawl Surveys, Coordinated by Working group on Beam Trawl Surveys*. Tech. rept. 69. ICES Techniques in Marine Environmental Science.
- Desbrosses, P. 1933. Contribution à la Connaissance de la Biologie du Rouget-barbet en Atlantique Nord. *Mullus barbatus* (rond) *surmuletus* (Fage). *Revue des Travaux de l'Office scientifique et technique des Pêches*, **8**(4), 351–376.
- Dorel, D. 1986. Poissons de l'Atlantique Nord-Est : Relations Taille-Poids. *DRV-86-001/RH/NANTES*, 183.
- Dubroca, L., Elie, N., Heude-Berthelin, C., Kellner, K., Le Meleder, A., Lepoittevin, M., Martin, V., Nivet, T., Sauger, C., & Villain-Naud, N. 2023. Stereology reading protocol when using quantitative histology for the determination of sexual maturity in fish ovaries. *SIH*, 40.
- Emerson, L. S., Walker, M. G., & Witthames, P. R. 1990. A stereological method for estimating fish fecundity. *Journal of Fish Biology*, **36**(5), 721–730.
- France. 2013. *Arrêté du 29 janvier 2013 modifiant l'arrêté du 26 octobre 2012 déterminant la taille minimale ou le poids minimal de capture des poissons et autres organismes marins (pour une espèce donnée ou pour une zone géographique donnée) effectuée dans le cadre de la pêche maritime de loisir*.

- Gabe, M. 1968. *Techniques Histologiques*. 2eme édition edn. Paris: Masson et C.
- Gerritsen, H. D., & McGrath, D. 2006. Variability in the assignment of maturity stages of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) and whiting (*Merlangius merlangus* L.) using macroscopic maturity criteria. *Fisheries Research*, **77**(1), 72–77.
- Glagolev, A. A. 1934. Quantitative analysis with the microscope by the ‘point’ method. *Minerals Engineering Journal*, **135**, 399–400.
- Goode, A., Gilbert, B., Harkes, J., Jukic, D., & Satyanarayanan, M. 2013. OpenSlide: A vendor-neutral software foundation for digital pathology. *Journal of Pathology Informatics*, **4**(1), 27.
- Gundersen, H. J. G., & Jensen, E. B. 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*, **147**(3), 229–263.
- Hallgren, K. A. 2012. Computing Inter-Rater Reliability for Observational Data: An Overview and Tutorial. *Tutorials in Quantitative Methods for Psychology*, **8**(1), 23–34.
- Hunter, J. R., & Macewicz, B. J. 1985. Measurement of Spawning Frequency in Multiple Spawning Fishes. *NOAA*, **36**, 79–94.
- ICES. 2012. Acronyms and terminology. *Page 4 of: ICES Advice 2012*, vol. Book 1. International Council for the Exploration of the Sea.
- ICES. 2014. *Report of the Workshop for maturity staging chairs (WK-MATCH)*. Workshop. International Council for the Exploration of the Sea, Split, Croatia.
- ICES. 2016. *Technical Guidelines - Advice on fishing opportunities*. ICES Technical Guidelines 12. International Council for the Exploration of the Sea.
- ICES. 2018. *Report of the Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF)*. Tech. rept. 38. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark.
- ICES. 2022a. *Working Group on the Assessment of Demersal Stocks in the North Sea and Skagerrak*. ICES Scientific Reports 4:43. International Council for the Exploration of the Sea.

- ICES. 2022b. *Working Group on Widely Distributed Stocks*. ICES Scientific Reports 4:73. International Council for the Exploration of the Sea.
- Johnson, R. B. 2009. Lipid Deposition in Oocytes of Teleost Fish During Secondary Oocyte Growth. *Reviews in Fisheries Science*, **17**(1), 78–89.
- Kjesbu, O. S., Fonn, M., Gonzáles, B. D., & Nilsen, T. 2010. Stereological calibration of the profile method to quickly estimate atresia levels in fish. *Fisheries Research*, **104**(1-3), 8–18.
- Laffargue, P., Salaun, M., Garren, F., Bellail, R., Mahé, K., & Poulard, J. C. 1987. EVHOE Evaluation Halieutique Ouest de l'Europe. *French Oceanographic Cruises*. Publisher: Sismar.
- Lang, E. T., Lyon, H. M., Fitzhugh, G. R., Walling, W. T., & Cook, M. 2013. An Evaluation of Sexual Macroscopic Staging Applied to Gulf of Mexico Fishes. *NOAA Technical Memorandum, NMFS-SEFSC*(649), 17.
- Lazard, C., & Auber, A. 2022. IBTS 2022 cruise, Thalassa R/V. *French Oceanographic Cruises*. Publisher: Sismar.
- Le Meleder, A. 2022. *Maturity Scale Tools*.
- Le Meleder, A., Sauger, C., & Dubroca, L. 2022. Fish gonads' photography protocol. *IFREMER*, 11.
- Le Roy, D., Martin-Baillet, V., & Giraldo, C. 2021. Compte-rendu de la campagne CGFS 2021 Sur le N/O Thalassa. Rapport intermédiaire. *PDG-RBE-HALGO-LBH/ RBE-HMMN-LRHBL*, 50.
- Mahé, K., Destombes, A., Coppin, F., Koubbi, P., Vaz, S., Le Roy, D., & Carpentier, A. 2005. Le rouget barbet de roche *Mullus surmuletus* (L. 1758) en Manche orientale et mer du Nord. *Rapport de Contrat IFREMER/CRPMEM Nord-Pas-de-Calais*, 187.
- Mahé, K., Coppin, F., Vaz, S., & Carpentier, A. 2013. Striped red mullet (*Mullus surmuletus*, Linnaeus, 1758) in the eastern English Channel and southern North Sea: growth and reproductive biology. *Journal of Applied Ichthyology*, **29**(5), 1067–1072.
- McHugh, M. L. 2012. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica*, **22**(3), 276–282.

- McPherson, L. R., Ganas, K., & Marshall, C. T. 2011. Inaccuracies in routinely collected Atlantic herring (*Clupea harengus*) maturity data and correction using a gonadosomatic index model. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **91**(7), 1477–1487.
- Midway, S. R., & Scharf, F. S. 2012. Histological Analysis Reveals Larger Size at Maturity for Southern Flounder with Implications for Biological Reference Points. *Marine and Coastal Fisheries*, **4**(1), 628–638.
- Murua, H., & Saborido-Rey, F. 2003. Female Reproductive Strategies of Marine Fish Species of the North Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, **33**(Dec.), 23–31.
- N'Da, K., & Deniel, C. 1993. Sexual cycle and seasonal changes in the ovary of the red mullet, *Mullus surmuletus*, from the southern coast of Brittany. *Journal of Fish Biology*, **43**(2), 229–244.
- Prince, J., Harford, W. J., Taylor, B. M., & Lindfield, S. J. 2022. Standard histological techniques systematically under-estimate the size fish start spawning. *Fish and Fisheries*, **23**(6), 1507–1516.
- Quéro, J.-C. 1984. Rouget-Barbets. *Pages 259–261 of: Grancher, Jacques (ed), Les Poissons de Mer des Pêches Françaises.*
- Sauger, C., Quinquis, J., Kellner, K., Heude-Berthelin, C., Lepoittevin, M., Elie, N., & Dubroca, L. 2020. A macroscopic and stereological imaging dataset of *Pleuronectes platessa* ovaries. *Scientific Data*, **7**(1), 165.
- Sauger, C., Kellner, K., Martin, V., Le Meleder, A., Berthelin, C., Villain-Naud, N., Elie, N., & Dubroca, L. 2023a. Macroscopic, histological and stereological image dataset of the Striped red mullet (*Mullus surmuletus*) ovaries from the Bay of Biscay (ICES area 27.7.g,j & 27.8.a-c) stock. *Zenodo*, [Data set] **v1.0**(June).
- Sauger, C., Kellner, K., Martin, V., Le Meleder, A., Berthelin, C., Villain-Naud, N., Elie, N., & Dubroca, L. 2023b. Macroscopic, histological and stereological image dataset of the Striped red mullet (*Mullus surmuletus*) ovaries from the English Channel (ICES area 27.7.d) stock. *Zenodo*, [Data set] **v1.0**(June).
- Stearns, S. C. 2000. Life history evolution: successes, limitations, and prospects. *Naturwissenschaften*, **87**(11), 476–486.

- Stearns, S.C. 1992. *The Evolution of Life Histories*. Great Clarendon Street, Oxford OX2 6DP: Oxford University Press.
- Torrejon-Magallanes, J. 2018. *sizeMat: An R Package to Estimate Size at Sexual Maturity*.
- West, G. 1990. Methods of Assessing Ovarian development in Fishes: a Review. *Marine and Freshwater Research*, **41**(2), 199–222.
- Whitehead, P. J. P., Bauchot, M.-L., Hureau, J.-C., Nielsen, J., & Tortonese, E. (eds). 1986. *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758. *Page 879 of: Whitehead, P. J. P., Bauchot, M.-L., Hureau, J.-C., Nielsen, J., & Tortonese, E. (eds), Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*, vol. II. Place de Fontenoy, Paris: United Nations Educational Scientific and Cultural Organization.
- Wiegand, M. D. 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **6**(3), 259–286.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Saveliev, A. A., & Smith, G. M. 2009. *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Statistics for biology and health. New York, NY: Springer. OCLC: 288985460.

5 Bilan

La mise en place d’un protocole d’histologie dans un contexte halieutique présente la difficulté d’allier la réalisation des blocs histologiques de qualité à un contexte d’échantillonnage très contraint : obtention de poissons frais non vidés et non congelés, transport et utilisation de produits toxiques à bord des navires ou encore difficulté d’effectuer des prélèvements destinés à l’histologie en mer. Les méthodes permettant le traitement d’organes par l’histologie ayant peu évolué (fixateur à base de formaldéhyde, inclusion dans paraffine, coupe manuelle au microtome), il n’existe pas de substituts efficaces au paraformaldéhyde pour la fixation des échantillons, la seule alternative limitant la toxicité pourrait être la réalisation de coupes congelées. Mais cela nécessiterait une congélation rapide à -80°C des échantillons, et donc, la mise à disposition de congélateurs à bord des navires. Finalement, la réalisation des coupes ne peut être encore que manuelle et nécessite temps et formation technique.

La coloration au trichrome de Prenant-Gabe, peu utilisée en halieutique à notre connaissance, a facilité le travail de description et d’identification des stades cellulaires et des structures ovariennes. Les contrastes au niveau des couleurs suggèrent la possibilité d’automatiser les lectures de lames par l’analyse d’image et l’apprentissage supervisé ([Chapitre 4](#)). Les structures décrites ont été répertoriées dans des lexiques espèces-spécifiques, incluant les longueurs moyennes des cellules de la lignée germinale et des *zona radiata*. Ces documents ont une double vocation : la mise à jour des connaissances sur l’ovogenèse et leur utilisation pour faciliter l’analyse stéréologique et la rendre reproductible entre laboratoires.

L’histologie quantitative, ou stéréologie, par la méthode de GLAGOLEV consiste à recouvrir la section ovarienne entière d’une grille de points équidistants pour évaluer les pourcentages des différentes structures cellulaires. L’homogénéité cellulaire a été vérifiée entre les 2 ovaires et au sein de chaque ovaire, ce qui a permis de limiter la lecture à une coupe par individu. Après avoir mis en place des exercices de calibration basés sur un ensemble de règles à appliquer lors de la lecture stéréologiques (DUBROCA et al., 2023a), un seuil d’erreur d’identification de moins de 3% a été obtenu pour chaque structure.

Finalement, en suivant les définitions du *Conseil International pour l’Exploration de la Mer (CIEM)* qui préconise une harmonisation des définitions à utiliser dans l’estimation des phases de maturité sexuelle chez les téléostéens, les pourcentages des cellules de la lignée germinale ont été pris en compte pour classer les individus dans différentes phases de maturité. Ce classement s’est révélé pertinent par rapport au classement macroscopique et a permis en outre d’identifier des individus en omission de ponte (E).

Le suivi temporel des pourcentages cellulaires moyens a permis de décrire le cycle

d'ovogenèse, mettant en évidence le type de développement ovarien de chaque espèce, la saison de reproduction et les événements de ponte. Ces données ont aussi révélées le risque d'erreur de classement pour les périodes où l'échantillonnage est réalisé en dehors de la saison de reproduction (cas du rouget barbet de roche). La comparaison des mesures de L_{50} et A_{50} obtenues par méthodes macroscopique et stéréologique pour *P. platessa*, *M. surmuletus* et *L. whiffiagonis* a permis de préciser l'importance de la période d'échantillonnage, mais également la validation de la méthode stéréologique comme une méthode plus objective d'estimation de la maturité.

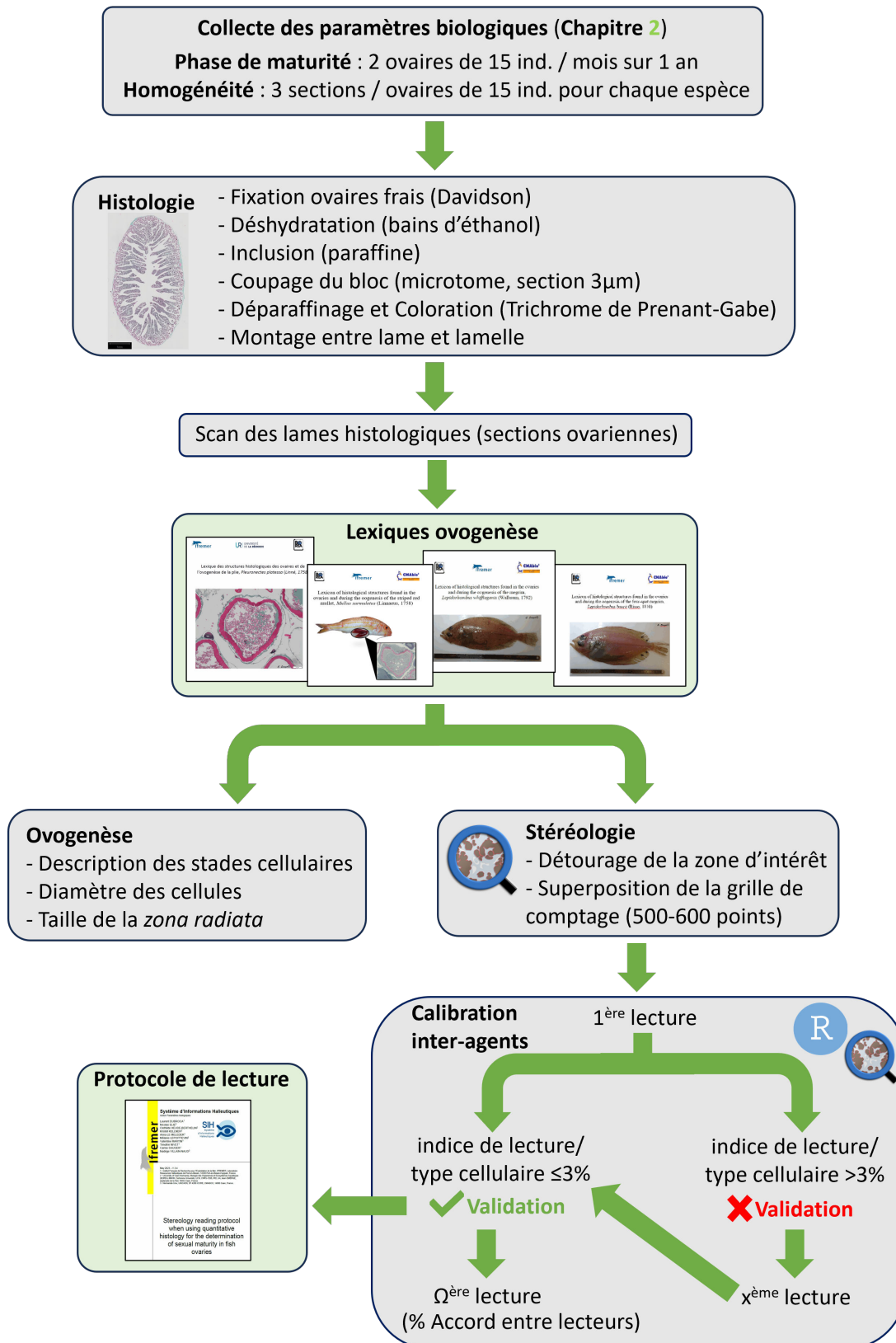
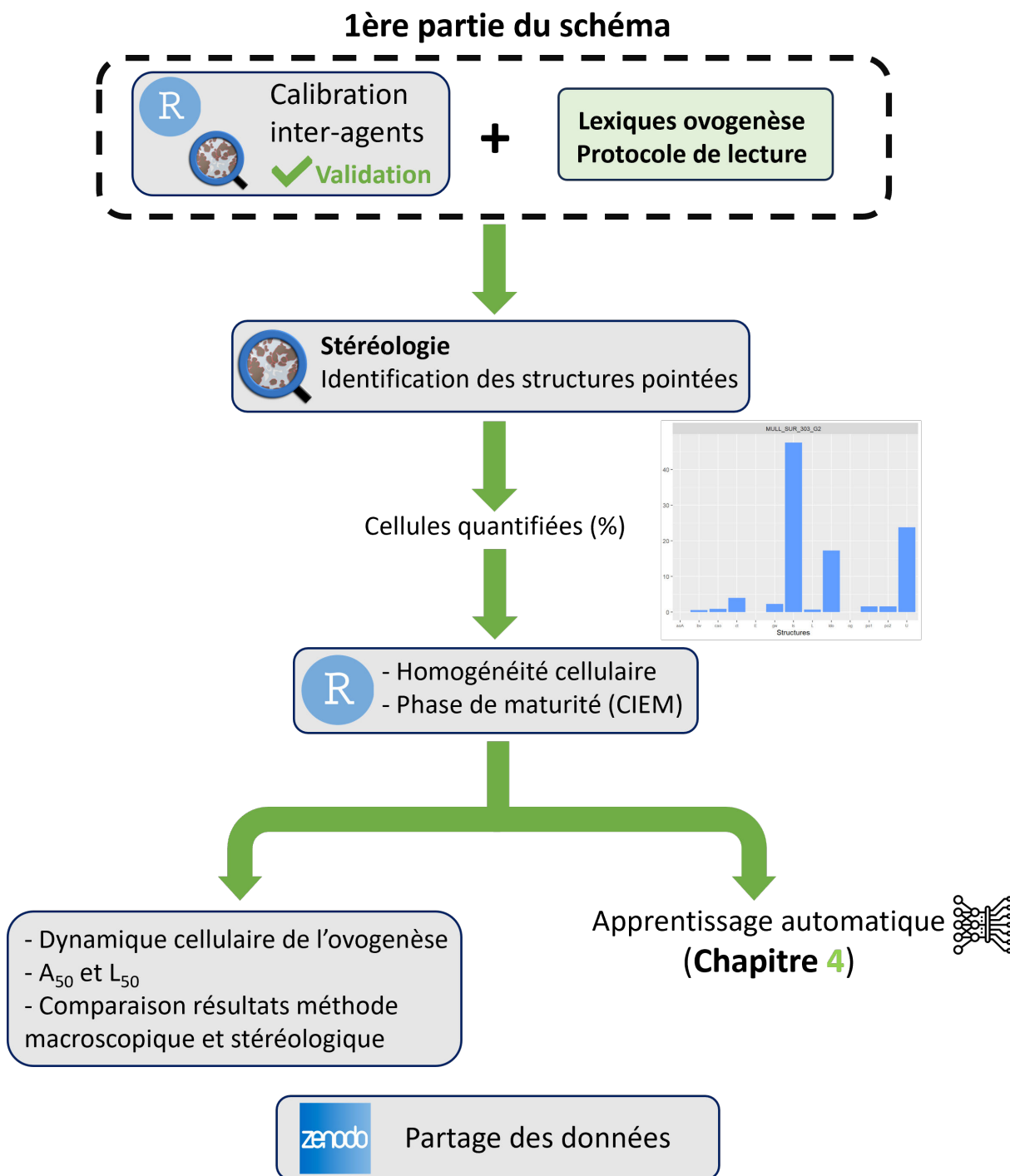


FIGURE 3.23 – Schéma de synthèse des méthodologies utilisées pour le traitement des ovaires par l'histologie et l'analyse de lames histologiques par stéréologie pour les espèces suivies



(Suite Figure 3.23) Schéma de synthèse des méthodologies utilisées pour le traitement des ovaires par l'histologie et l'analyse de lames histologiques par stéréologie chez les téléostéens

6 Annexes

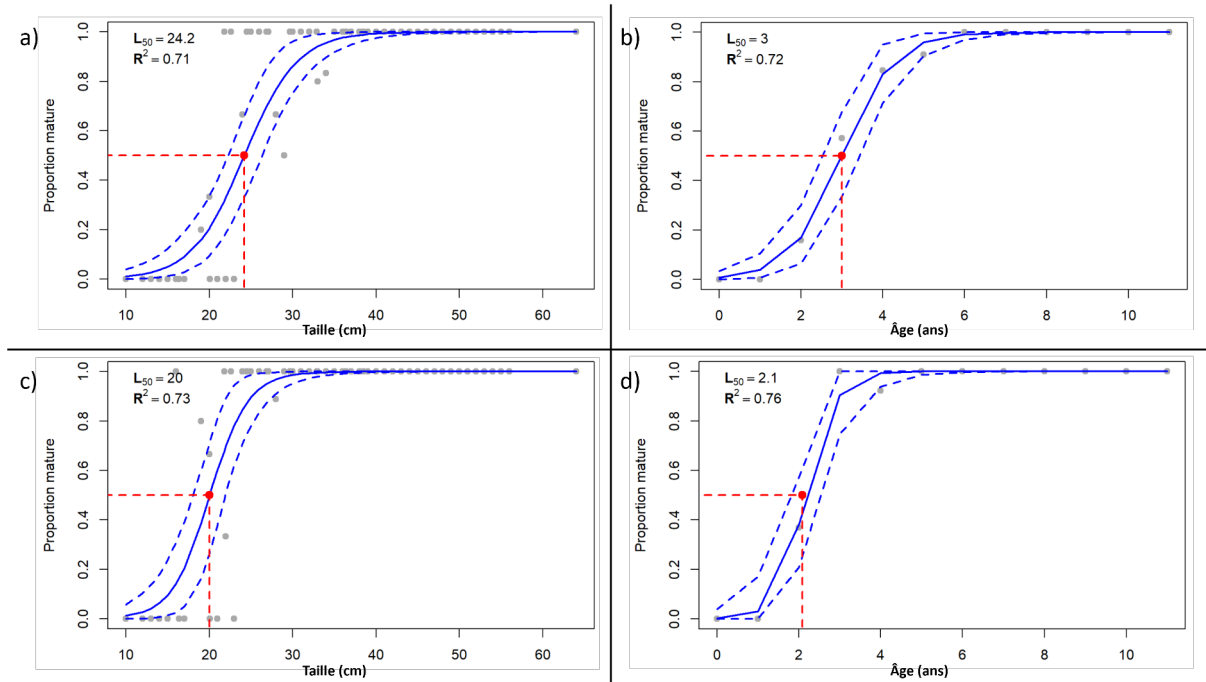


FIGURE 3.24 – Calculs de la longueur (L_{50}) et l'âge (A_{50}) auxquels 50% de la population atteint la maturité sexuelle, pour les femelles de cardine franche (*L. whiffiagonis*, $n = 142$) échantillonnées pendant la saison de reproduction (octobre à mars). a) L_{50} déterminée à partir des données d'observations macroscopiques. b) A_{50} déterminé à partir des données d'observations macroscopiques. c) L_{50} déterminée à partir des comptages stéréologiques. d) A_{50} déterminé à partir des comptages stéréologiques

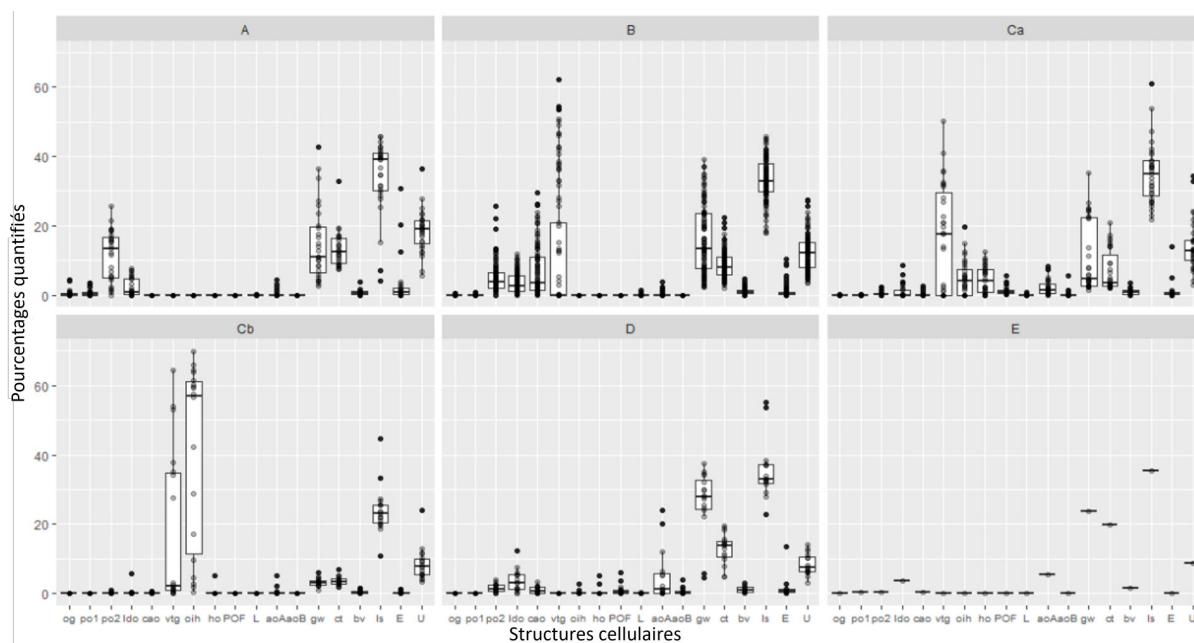


FIGURE 3.25 – Boxplot des pourcentages (%) des 18 structures cellulaires retrouvées sur les sections ovariennes médianes de cardines franches (*L. whiffiagonis*) en fonction de leurs phases de maturité sexuelle, déterminés par comptage stéréologique, avec : Immature (A), Développement (B), En ponte (Ca), En capacité de ponte (Cb), Régression / Régénération (D), Omission de ponte (E), ovogonie (**og**), ovocytes primaires stade 1 (**po1**), ovocytes primaires stade 2 (**po2**), ovocytes avec gouttelettes lipidiques (**ldo**), ovocytes à alvéoles corticales (**cao**), ovocytes en vitellogénèse (**vtg**), ovocytes en cours d’hydratation (**oih**), ovocytes hydratés (**ho**), follicules post-ovulatoires (**POF**), ovocyte en atrésie α (**aoA**), ovocyte en atrésie β (**aoB**), lyse (**L**), paroi gonadique (**gw**), tissu conjonctif (**ct**), vaisseaux sanguins (**bv**), espace intercellulaire (**ls**), indéterminées (**U**) et espace non naturel (**E**)

Chapitre 4

Identification automatique de structures cellulaires par apprentissage supervisé

Publication avec comité de lecture associée au Chapitre :

- ✧ [Article 4](#) : **Using deep learning to identify female germline cells of a flatfish species for sexual maturity determination.** *En préparation*, sera soumis dans *ICES Journal of Marine Science*

- Professeur Tournesol : Capitaine, est-ce un poisson, cet animal qui vient de sauter hors de l'eau, là-bas ?
- Capitaine Haddock : Non, c'est un piano à queue !
- Professeur Tournesol : Ah ! il me semblait bien que cela ne pouvait pas être un poisson...

Le trésor de Rackham le Rouge (Hergé, 1944)

1 Introduction

Quel que soit le tissu étudié, l'analyse stéréologique, qui s'appuie sur un échantillonnage statistique, fournit une très **grande quantité d'informations** sur chaque section histologique traitée. Lorsque l'opérateur humain supporte l'acquisition de cette information par l'analyse des images et l'identification des structures cellulaires, ce volume d'information suit une procédure de qualification rigoureuse implémentée dans le [Chapitre 3](#), afin de garantir la **reproductibilité des résultats** obtenus (voir **Publication 4** du **Volume II**). Le grand nombre de données acquises lors des lectures standardisées rend alors envisageable une **automatisation du processus d'identification cellulaire**. L'apprentissage automatique, une méthode en [Intelligence Artificielle \(IA\)](#), a été utilisé dans cet objectif, et les résultats obtenus par cette approche sont présentés dans ce [Chapitre 4](#).

1.1 L'intelligence artificielle (IA)

Le concept d'[Intelligence Artificielle](#) existe depuis les années cinquante, et l'on retrouve une première utilisation du terme [Intelligence Artificielle](#) en 1956 lors du *Dartmouth Summer Research Project on Artificial Intelligence*. CHOLLET et al. (2018) définissent le domaine de l'[Intelligence Artificielle](#) comme étant «l'effort d'automatiser des tâches intellectuelles qui sont normalement effectuées par des êtres humains». Ce concept s'appuie sur la capacité des machines à traiter de très grandes quantités d'information, en suivant toujours les mêmes règles. D'un point de vue scientifique, traiter de grandes quantités de données de manière standardisée présente l'avantage d'assurer la reproductibilité des analyses.

Plusieurs sous-domaines font appel à l'**IA** ([Figure 4.1](#)), comme la robotique, la planification et l'optimisation de systèmes, les systèmes experts qui utilisent des bases de données afin d'apporter de l'information sur un sujet, *etc.*. Les applications sont nombreuses comme le montre la [Figure 4.1](#).



FIGURE 4.1 – Diagramme présentant différents sous-domaines que l'on peut retrouver en intelligence artificielle et leurs applications

Ainsi, en posant la question *Qu'est-ce que l'intelligence artificielle ?* à ChatGPT (version 3.5, juillet 2023), une IA du domaine de traitement du langage naturel conçue par la société OPENAI et ayant pour fonction de répondre à des requêtes d'utilisateurs dans les domaines les plus variés, la réponse suivante est générée :

«L'intelligence artificielle (IA) concerne la capacité des machines à réaliser des tâches demandant habituellement une intelligence humaine. Elle implique la création de systèmes et de programmes informatiques capables d'apprendre, de raisonner, de résoudre des problèmes et de prendre des décisions de manière autonome, à la manière des êtres humains.

L'IA se divise en deux catégories principales : l'IA faible, qui se spécialise dans des tâches spécifiques comme la reconnaissance vocale ou les recommandations de produits, et l'IA forte, qui demeure une hypothèse, capable de comprendre, d'apprendre et de résoudre des problèmes dans divers domaines comme le ferait un être humain.

Les techniques utilisées en IA incluent l'apprentissage automatique, qui permet aux machines d'apprendre et de s'améliorer grâce aux données, ainsi que l'apprentissage profond, qui se sert de réseaux de neurones artificiels pour des tâches complexes.

L'IA est utilisée dans de nombreux domaines, tels que la santé, la finance, les transports, la robotique, les jeux, la reconnaissance vocale et faciale, entre autres. Elle offre un potentiel significatif pour automatiser des tâches, améliorer la prise de décision et résoudre des problèmes complexes, tout en soulevant des préoccupations éthiques concernant la confidentialité et l'impact sur l'emploi.»

OPENAI, 2023

Ainsi, il apparaît que dans le cadre de l'élaboration d'une définition d'une **Intelligence Artificielle**, une **IA** adaptée (ici le traitement du langage naturel) peut effectuer cette tâche d'une manière satisfaisante. On retrouve les notions exposées par ChatGPT dans CHOLLET et al. (2018), chapitre 1. Il est aussi à noter que si l'usage de l'**IA** interroge et remet en question les pratiques de certains champs disciplinaires (voir MILANO et al., 2023, en science de l'éducation par exemple), ce chapitre prend le parti pris inverse et utilise l'**IA** afin d'accélérer et améliorer le travail relativement fastidieux et complexe d'interprétation histologique. Les implications de ce choix éthique seront discutées dans les résultats.

1.2 L'apprentissage automatique

En 1950, TURING posait la question : *Les machines peuvent-elles réfléchir ?* À travers le «jeu de l'imitation», TURING théorisait que si un ordinateur pouvait engager une conversation avec un être humain et que l'être humain ne l'identifiait pas comme étant un ordinateur, alors ce dernier faisait preuve de la même intelligence que celle d'un être humain. TURING proposait alors le concept d'une machine qui apprend. Tout comme l'apprentissage infantile, on peut apprendre à une machine en utilisant un système de "punition" et de "récompense", cela jusqu'à ce que le professeur (ici le programmeur) soit satisfait du résultat. Dans ce contexte, la notion d'intelligence apparaît quand la machine arrive à déduire une information sans que cette dernière n'ait été implémentée par le programmeur. En 1959 le terme *machine learning* est popularisé par Arthur Samuel comme étant le domaine d'étude qui donne aux ordinateurs la capacité d'apprendre sans être explicitement programmés (SAMUEL, 1959).

Deux approches à l'**Intelligence Artificielle** sont alors mises en place. La première est l'**IA symbolique**, permettant de générer une réponse prédéfinie en fonction de règles pro-

grammées par un humain. Les premières machines "jouant" aux échecs utilisaient cette approche et suivaient simplement de nombreuses règles pré-programmées. La deuxième approche est celle de l'**apprentissage automatique** (ou *machine learning* en anglais) qui consiste à fournir des données et des résultats à une machine et à laisser la machine élaborer elle-même des règles liant données et résultats. Par la suite, ces règles sont appliquées à une autre base de données dans le but de produire de nouveaux résultats (CHOLLET et al., 2018). On ne parle alors plus de programmation mais d'entraînement.

L'**apprentissage automatique** peut être divisé en 4 branches (CHOLLET et al., 2018) :

- ✧ La première branche, la plus communément utilisée, est l'**apprentissage supervisé** qui a pour but d'apprendre à un modèle à relier des données à une instance connue (ou annotations), à l'aide d'exemples (annotés par des humains). Cette approche inclut principalement les classifications (regrouper des objets similaires) et les régressions (estimer/prédire un résultat en fonction de données).
- ✧ La deuxième branche est l'**apprentissage non-supervisé** qui permet la recherche d'information dans des données non annotées, sans objectif déterminé. L'apprentissage non-supervisé est utilisé principalement en analyses de données (visualisation de données multidimensionnelles, compression, dé-bruitage des données, mise en évidence de corrélations, *etc.*), et permet d'extraire d'un ensemble de données complexes les caractéristiques principales de l'ensemble. Par exemple, les techniques telles que l'**Analyse en Composantes Principales (ACP)** ou le *Clustering* sont des méthodes d'apprentissage non-supervisées (KUBAT, 2017).
- ✧ La troisième branche est celle de l'**apprentissage renforcé** qui est présentement la branche la moins développée avec des applications pour l'instant restreintes au domaine des jeux vidéos. Cette branche sera amenée à s'étendre dans les années à venir (voiture à conduite autonome, robotique, gestions de ressources, *etc.*). L'apprentissage renforcé a pour principe la mise en place d'un agent dans un environnement. L'agent va alors effectuer des actions qui seront récompensées ou punies en fonction de leur désidérabilité, lui permettant d'apprendre à choisir les actions qui maximiseront les récompenses.
- ✧ La dernière branche, l'**apprentissage auto-supervisé**, est considérée comme une instance de l'apprentissage supervisé, sans le système d'annotations manuelles par un humain. Les annotations sont auto-générées depuis les données d'entrées, et le modèle s'entraîne sur une partie de la donnée pour apprendre une autre partie de cette même base de données. Cette méthode est utilisée, par exemple, pour prédire le prochain mot dans une phrase en fonction des mots utilisés précédemment.

1.3 L'intelligence artificielle en halieutique

L'intérêt pour l'outil qu'est l'[Intelligence Artificielle](#) a aussi atteint le domaine de l'halieutique, avec l'automatisation de l'analyse de grandes bases de données, une application que l'on retrouve dans de nombreuses autres disciplines (RUBBENS et al., 2023). La mise en place de bases de données comportant des informations multi-espèces, multi-zones sur des échelles temporelles larges, et ce dans des formats hétérogènes incluant, en plus des tables classiques (mesures, coordonnées, etc.), des images, des vidéos ou des enregistrements sonores, a permis la mise en place de procédures analytiques s'appuyant sur l'intelligence artificielle. Ces applications concernent plus particulièrement le domaine de la reconnaissance de forme, domaine où l'annotation manuelle devient difficile à mettre en oeuvre par le volume de données à traiter et le caractère potentiellement biaisé de l'exercice dû à l'intervention d'un opérateur humain.

Toutes ces contraintes ont menées au développement de procédures automatisées pour différentes applications en halieutique. Par exemple, concernant les travaux d'échantillonnages en mer, les données récoltées requièrent systématiquement l'identification de l'espèce, ainsi que l'acquisition de données biométriques pour chaque individu. Des systèmes automatisés permettant l'identification de l'espèce et la mesure individuelle sur des flux d'images ont donc été développés. Dans ce cadre, l'identification des espèces peut s'appuyer sur des mesures prises sur les silhouettes d'individus (STRACHAN et al., 1990). L'identification automatisée des espèces sur des flux vidéo a été utilisée dans diverses applications, comme par exemple l'étude du comportement des individus par rapport aux engins de pêche. L'objectif était d'évaluer la sélectivité des engins et de l'améliorer afin de limiter la capture d'espèces non désirables ou vulnérables (SUGPATAN ABANGAN et al., 2023). Ce type d'application peut également être utilisé dans les fermes piscicoles, pour apprécier et contrôler le bien-être des individus. Il s'agit dans ce cas d'analyser leur masse et leur morphologie en utilisant les images issues de vidéos (SALEH et al., 2023).

Avec l'évolution des méthodes et techniques, des modèles d'identification de plus en plus performants ont été développés pour le grand public, avec des applications facilement accessibles et dédiées à l'identification d'espèces (*FishVerify*, *IDFish*, *Picture Fish*, *Fishbrain*, *Fishidy*, etc.). L'enrichissement des bases de données d'images d'espèces dans des environnements variables (luminosité, orientation de l'individu, intensité des couleurs) a facilité la détection et l'identification d'individus sur vidéos et photographies (LOULIDI et al., 2022).

Toutefois, même si le matériel de prise de vue est de plus en plus performant, ces améliorations atteignent leurs limites en eaux turbides ou profondes où la luminosité est moindre ou lors d'observation de regroupements d'un grand nombre d'individus. Les données acoustiques peuvent alors être utilisées pour pallier ces problèmes afin d'estimer les

biomasses et les abondances des espèces présentes (MOUSTAHDID et al., 2020). Depuis plus de deux décennies, différents modèles d'apprentissage automatique ont été développés pour la classification des espèces de poissons par acoustique, associant les données d'échosondeurs et les bandes sonores à des données annexes (prises du chalut effectuées en même temps des mesures acoustiques, caractéristiques morphologiques des amas de poissons, localisation géographique, distance par rapport à la surface et au fond) acquises par des navires de pêche ou de suivis scientifiques (YASSIR et al., 2023). Ces mêmes méthodes peuvent être utilisées à partir de bouées équipées d'échosondeurs pour détecter et prédire la présence et l'abondance de certaines espèces d'intérêt commercial telles que les thonidés, dans l'objectif par exemple de mieux définir les zones de pêches (BAIDAI et al., 2020; SONG et al., 2023). Enfin, un avantage indéniable des stratégies basées sur l'analyse combinée d'images et de données acoustique d'individus vivants dans leur environnement naturel, est qu'elles ne sont pas destructrices (par comparaison à celles nécessitant d'extraire les poissons de leur environnement pour les identifier) et peuvent décrire en temps réel l'abondance des espèces présentes.

Un autre pan de l'utilisation de l'IA en halieutique concerne la détermination de l'âge à partir des otolithes. L'âge est un paramètre biologique clé pour mieux comprendre l'écologie des espèces et la répartition en âge des captures est un élément majeur utilisé dans les modèles d'évaluation des stocks. Or, l'interprétation des stries de croissance sur un otolithe requiert le plus souvent deux estimations indépendantes, afin d'évaluer la précision et la répétabilité de la lecture. Pour faciliter l'identification des stries de croissance, différentes méthodes de préparation sont classiquement appliquées aux otolithes : en les brûlant légèrement (CHRISTENSEN, 1964), en les colorants au rouge neutre (BOUAIN et al., 1988) ou en réalisant une coupe fine pour les plus épais (BEDFORD, 1983; SMITH, 1968). L'automatisation de la lecture de l'âge par l'apprentissage automatisé a permis à BENSON et al. (2023) de coupler les paramètres biologiques (longueur, masse et sexe), les données de géo-spatialisation (latitude, profondeur et température) et les données d'absorption et d'émission du spectre infra-rouge des otolithes pour 9000 lieux d'Alaska (*Gadus chalcogrammus*). Les résultats obtenus par ce modèle en apprentissage supervisé mis en place se sont avérés semblables ou meilleurs que ceux obtenus par la méthode microscopique classique. Non seulement cette méthode est non destructive pour les otolithes, par rapport aux autres méthodes citées plus haut, mais elle a aussi permis de réduire le temps de validation de la lecture et elle assure une meilleure reproductibilité de la détermination des âges.

Dans le secteur de l'alimentaire issu de l'halieutique, l'évaluation de la qualité et de la fraîcheur du poisson s'appuie en partie sur l'estimation visuelle (et donc peu objective) effectuée par des agents. JAYASUNDARA et al. (2023) ont montré qu'automatiser cette pratique en utilisant l'analyse d'images permet une classification objective des pro-

duits dans une grille indiquant la qualité de fraîcheur sans destruction de l'échantillon, et permet un gain de temps et de coût par rapport aux méthodes basées sur l'analyse biochimique.

Des modèles en apprentissage automatique capables d'analyser de larges bases de données sont également utilisés dans des approches de suivis d'écosystèmes, par exemple pour faciliter l'identification d'habitats à fort potentiel de rétablissement dans des zones fortement exploitées, dans une optique de conservation (STAMOULIS et al., 2018). Ces modèles permettent également l'étude du comportement des flottilles, la détection et l'analyse des activités de pêche, l'identification en amont de risques potentiels (bloom algaux, météorologie) et l'amélioration de l'efficacité du trafic maritime avec même des applications suggérant des trajets optimisés (FERNANDES-SALVADOR et al., 2022 ; WANG et al., 2023). Enfin, l'apprentissage automatique a aussi été utilisé en gestion de stocks, avec des modèles prédisant la biomasse reproductrice d'un stock en fonction de données passées ou permettant d'identifier des facteurs impactant le recrutement. Ces indicateurs sont des éléments clés pour comprendre les facteurs conduisant à l'effondrement des stocks, et ainsi permettre une exploitation durable, minimisant le risque d'effondrement des populations même dans des conditions environnementales défavorables (CHEN et al., 1999 ; SMOLIŃSKI, 2019).

L'IA reste encore très rarement en histologie quantitative dans le domaine halieutique, alors même que la stéréologie (Tableau 3.2) est la méthode la plus précise pour estimer la fécondité. Des logiciels spécialisés dans l'analyse d'images d'ovocytes ont été développés ces dernières années, utilisant l'apprentissage non-supervisé pour la détection des ovocytes par détournement, suivi de leur classification qui regroupe automatiquement les ovocytes similaires. Ces logiciels quantifient les cellules germinales par analyse stéréologique et proposent une estimation de la fécondité. Toutefois, même si ces logiciels ont des taux de classification de plus de 80% pour les ovocytes matures, les étapes de détection et d'identification spécifique à une espèce donnée ou sur des ovocytes primaires requiert une modification et un nouvel entraînement du modèle (MBAIDIN et al., 2021 ; PINTOR et al., 2016).

L'automatisation de l'analyse d'images de synthèse d'ovaires de poissons en trois dimensions (3D) est très récente, avec seulement 2 travaux publiés cette année : LESAGE et al. (2023) ont mis en place un processus de segmentations de cellules sur des images 3D d'ovaires entiers, en utilisant uniquement un modèle généraliste de segmentation de cellules (Cellpose), sans avoir besoin d'entraîner un modèle sur une base de données en amont. Pour cela, deux jeux de données ont été utilisés. Le premier contient des images d'ovaires d'individus adultes avec fluorescence au niveau des membranes des ovocytes et le second des images d'ovaires de larves avec une fluorescence au niveau des cytoplasmes des

cellules germinales. Ce modèle a permis la quantification des cellules depuis les images 3D, avec comme objectif futur l'utilisation de cette méthodologie pour étudier le développement cellulaire. KUMAR et al. (2023) ont eux aussi mis en place un modèle généraliste en apprentissage supervisé permettant la mesure précise des volumes et surfaces de cellules ovariennes. Ce modèle a été appliqué sur des ovaires d'individus à différentes phases de maturité et il a été possible de suivre l'évolution morphologique des cellules de la lignée germinale au cours de l'ovogenèse. Le modèle détecte, annoté et analyse les cellules présentes dans les niches germinales depuis des images 3D. Les noyaux et cortex cellulaires des cellules germinales ont été annotés manuellement, avec l'utilisation de différentes colorations pour analyser l'effet des teintes sur la segmentation. Le modèle proposé par KUMAR et al. (2023) segmente correctement 81% des cellules de la gonade, pourcentage de précision également retrouvé avec Cellpose (STRINGER et al., 2021), outils permettant aussi la segmentation des cellules, et décrit plus loin dans ce [Chapitre 4](#).

Objectifs

Pour faciliter l'analyse stéréologique des espèces suivies dans ce travail, dont l'étape critique est la lecture des lames, nous avons dans ce [Chapitre 4](#) développé une méthodologie basée sur l'apprentissage supervisé en couplant l'[Intelligence Artificielle](#) à la stéréologie. La mise à disposition par la communauté scientifique d'outils de segmentation cellulaire ainsi que d'algorithmes d'apprentissage supervisé a permis l'entraînement d'un modèle permettant d'automatiser le processus des lectures stéréologiques. Le modèle a été développé dans un premier temps pour la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*), avec comme résultat final la détermination de la phase de maturité. Pour cela, nous avons :

- ✧ Développé une méthodologie utilisant des outils *open source* déjà disponibles dans le domaine de l'apprentissage supervisé pour automatiser la segmentation et l'identification des différents types cellulaires sur les lames histologiques, en reprenant les données de lectures stéréologiques.
- ✧ Validé la procédure pour la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*) en attribuant une phase de maturité individuelle en suivant les critères de classement du [CIEM](#).
- ✧ Utilisé le modèle pour estimer la longueur et l'âge à première maturité (L_{50} et A_{50}) d'après les phases de maturité nouvellement obtenues pour la cardine franche et comparé ces estimations à celles obtenues dans le [Chapitre 3](#).

2 Matériel et Méthodes

La méthodologie utilisée est décrite dans l'article associé au [Chapitre 4](#).

2.1 Échantillonnage et histologie quantitative

Les deux ovaires de 202 individus femelles cardine franche (*L. whiffiagonis*) ont été récoltés et au moins une section par ovaire a été traitée en histologie. Au total, 461 lames histologiques colorées au trichrome de Prenant-Gabe (GABE, 1968) ont été digitalisées et les images analysées sous QuPath (BANKHEAD et al., 2017).

Une calibration entre les deux agents lecteurs a été effectuée sur 15 lames histologiques pour valider le protocole de lecture et l'homogénéité cellulaire a été vérifiée sur 6 sections ovariennes de 17 individus.

Les structures cellulaires présentes ont été quantifiées par stéréologie (méthode de points par GLAGOLEV (1934)) pour un total de 217 lames histologiques. Par la suite, l'extension Cellpose (v.0.7.0) a été utilisée sous QuPath (v4.3) pour détourner les cellules et générer une banque d'images des cellules segmentées. Les résultats des lectures stéréologiques ont permis d'assigner les types cellulaires aux cellules segmentées en fonction des coordonnées des images. Le résultat obtenu est une base de données d'images avec des cellules segmentées annotées (CUTLER et al., 2022 ; PACHITARIU et al., 2022 ; STRINGER et al., 2021).

2.2 Apprentissage supervisé

Une fois les images annotées, l'algorithme d'apprentissage supervisé *You Only Look Once* (Ultralytics YOLOv5, REDMON et al., 2016 ; TERVEN et al., 2023) a été utilisé sur les données annotées pour apprendre à identifier les 18 catégories retrouvées dans les ovaires ([Tableau 3.3](#)). Sur les 48557 images annotées, 88.89% (43701) ont été utilisées pour l'apprentissage et 11.11% (4856) utilisées pour la validation. Par la suite, le modèle a été appliqué sur les 191594 images issues des 244 lames non annotées (pas de lectures en stéréologie), avec pour objectif de classer ces structures cellulaires dans une des 18 catégories.

3 Principaux résultats

Les résultats peuvent être retrouvés en version détaillée dans l'article associé au [Chapitre 4](#).

La calibration a permis la validation des règles mises en place dans le protocole de

lecture stéréologique (DUBROCA et al., 2023a). De plus, les deux agents ayant effectué les lectures stéréologiques ont un pourcentage d'accord allant de 79.7% à 95.8%. La vérification de l'homogénéité cellulaire a montré qu'aucune différence n'est observée entre les 2 gonades (droite et gauche) ni au sein d'une même gonade entre les 3 niveaux de coupe.

Le modèle entraîné sous YOLOv5 avec la base de données des cellules ovariennes annotées montre une précision de 81% d'identification correcte de la structure d'intérêt. En faisant analyser les images non annotées au modèle nouvellement entraîné, 77.6% des images ont été classées dans une des 18 catégories du [Tableau 3.3](#).

Une fois les 176 individus classés dans une phase de maturité, 76.7% des cardines franches ont été classées dans la même phase de maturité que par l'analyse stéréologique classique (donc issue des lectures stéréologiques "humaines"). À partir de ces résultats, les ogives de maturité ainsi que les longueurs (L_{50}) et âges (A_{50}) auxquels 50% de la population est sexuellement mature ont été calculés. La L_{50} estimée à 18.0 cm d'après la méthode stéréologique a été ré-évaluée à 19.9 cm avec la méthode automatisée d'identification cellulaire. Le même A_{50} de 2 ans est obtenu avec les deux approches.

Enfin, en classant les individus par longueur pour chaque période d'échantillonnage, il a été possible de retrouver la période du frai (janvier à mars). Les individus immatures avant la période du frai (octobre à décembre) ont aussi été correctement identifiés. Finalement, les grands individus (≥ 35 cm) après la ponte (mai à juin) qui avaient été classés en phase immature par la méthode stéréologique ont aussi été classés dans cette même phase suite à l'identification automatique des types cellulaires.

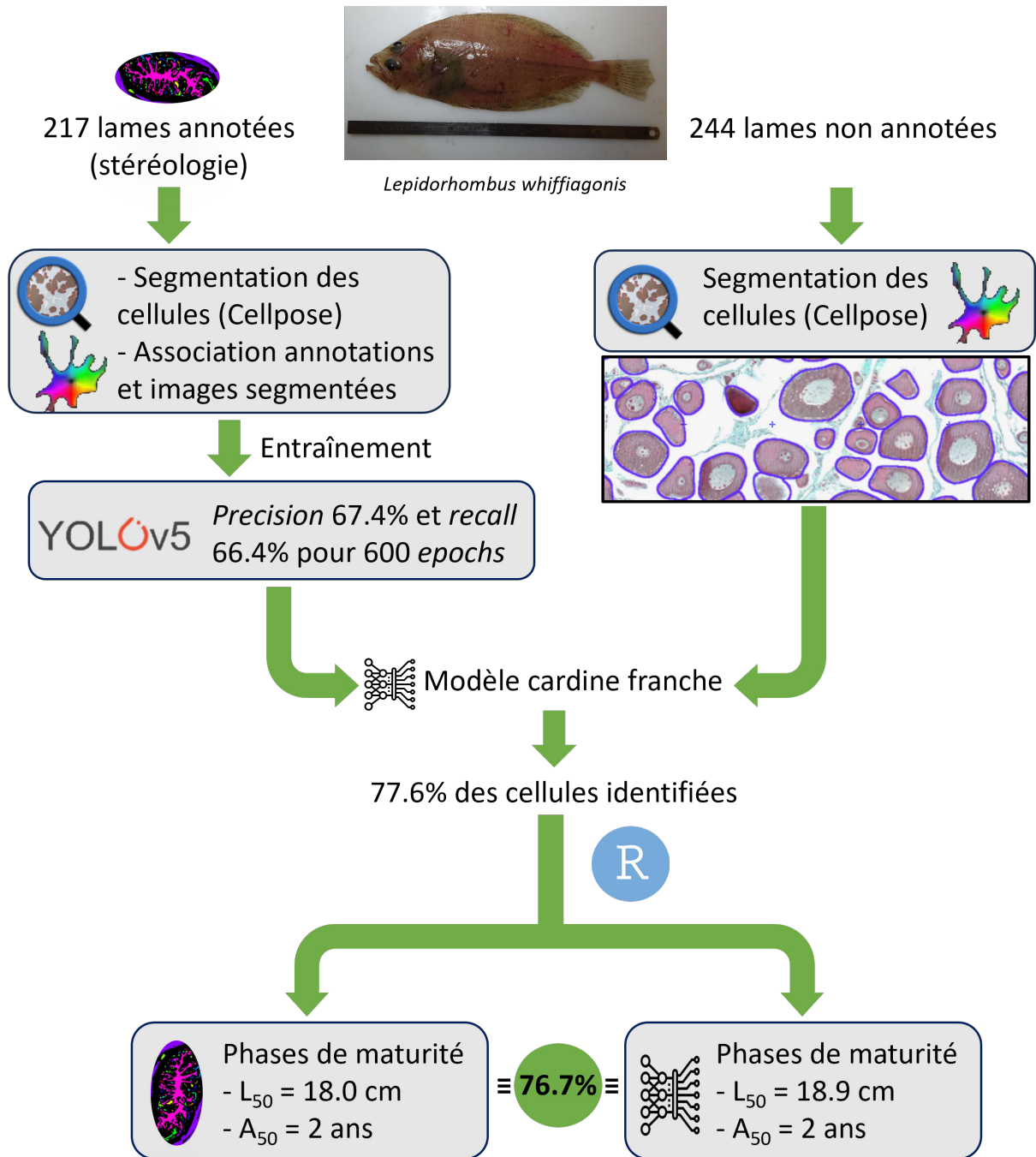


FIGURE 4.2 – Méthodologie et résultats pour l’automatisation d’identification des structures ovariennes chez la cardine franche (*L. whiffiagonis*)

4 Discussion

Cette section complète la discussion présente dans l'article associé au [Chapitre 4](#)

4.1 Données

La mise en place d'une section histologique d'ovaire requiert des moyens matériels importants, ce, sur un temps long. Pour ces travaux, il a été estimé que 7 jours sont nécessaires entre le moment où l'individu frais est disséqué et le moment où la lame histologique peut être exploitée. À cela s'ajoute la numérisation de la lame puis sa lecture par stéréologie estimée à 20 minutes en moyenne pour un lecteur expérimenté, exercé à reconnaître les différentes structures sans à avoir à se rapporter au lexique de l'espèce ou au protocole de lecture. Ainsi pour une vingtaine de lames, l'étape stéréologique prend une journée entière à un lecteur expérimenté. Or, avec plusieurs individus échantillonnés mensuellement pour assurer un suivi complet de la gamétogenèse, et les multiples sections gonadiques d'une quinzaine d'individus pour vérifier l'homogénéité cellulaire, le nombre de lames histologiques augmente rapidement pour une seule espèce. Ainsi, la vingtaine de lames lues quotidiennement se mue à plusieurs centaines de lames dont les lectures peuvent prendre plusieurs semaines.

La possibilité de mettre en place une automatisation de la lecture des lames apparaît donc essentielle en terme de gain de temps et d'efficacité pour des suivis réguliers. Cette approche permet également de limiter les erreurs de lecture entre agents et assure une identification reproductible des structures. EMERSON et al. (1990) avaient déjà suggérés que la stéréologie, de par la complexité et la longueur des lectures, se prêtait particulièrement bien à une analyse automatisée. Cela est d'autant plus vrai que la lecture des lames génère une somme considérable de données annotées nécessaires à l'apprentissage supervisé. D'ailleurs, des applications en cancérologie ont mené au développement de méthodes en apprentissage automatique, avec des modèles pouvant identifier des cellules tumorales qui n'avaient pas été détectées en microscopie (WEAVER et al., 2003). Cela montre la sensibilité de cette méthode, une fois cette dernière optimisée, et ses capacités à améliorer de façon substantielle l'identification des structures (ici les diagnostiques sur biopsies, MOALLEM et al., 2022).

Pour développer cette approche dans le cadre de l'identification des phases de maturité sexuelle des poissons, les cellules de la lignée germinale ont été précisément identifiées sur la base de critères objectifs et discriminants développés dans le protocole de lecture et les lexiques spécifiques d'espèces. De plus, cette identification a été facilitée par la coloration au trichrome de Prenant-Gabe (GABE, 1968) qui met en évidence des critères clés tels que les noyaux, les alvéoles corticales ou encore les gouttelettes de vitellus, critères qui

ont été validés à travers des exercices de calibration entre agents lecteurs avec des niveaux d'expériences différents (novices à experts).

4.2 Segmentation des ovocytes

Avant l'analyse des images par le modèle, il est nécessaire d'identifier les structures d'intérêt de la coupe ovarienne en les détournant et en les annotant. Plusieurs méthodes de segmentation existent. La méthode basique consiste à isoler manuellement chaque cellule (étape de segmentation) : cette approche est évidemment chronophage car très longue à mettre en oeuvre. Une alternative, dite semi-automatique, consiste à utiliser pour cette segmentation des méthodes statistiques de classification sur les valeurs de couleurs des images. L'utilisation du trichrome de Prenant-Gabe génère des gradients de couleurs qui peuvent faciliter la segmentation individuelle des ovocytes. L'application de cette stratégie sur les coupes de gonade de cardine n'a pas été possible sur toutes les lames, notamment celles présentant de la vitellogenèse avancée. En effet, le traitement d'images scannées de très grandes tailles demandait trop de ressource informatique. L'algorithme testé ici était l'algorithme *Kmeans* et les résultats préliminaires associés ont été présentés en conférence (World Fisheries Congress 2021 « *Turning a time consuming process into a few coded lines : How deep learning can shorten histology slide readings for maturity staging* »).

La segmentation automatique aurait aussi pu se faire sous YOLOv5, mais nous avons opté pour l'utilisation de Cellpose, un modèle généraliste pré-entraîné (*deep learning*) spécialisé en segmentation individuelle de cellules (CUTLER et al., 2022 ; PACHITARIU et al., 2022 ; STRINGER et al., 2021). En effet, utiliser un modèle pré-entraîné sur des images du même type que la base d'images que l'on souhaite faire analyser permet un traitement plus rapide de la donnée et assure une meilleure performance. Ainsi, par exemple, un modèle entraîné pour l'identification de cellules rondes de diamètres similaires et de coloration grise, sera moins performant quand il est opéré sur des images de cellules de morphologie complexe, comme par exemple des cytoplasmes colorés par fluorescence. Le modèle Cellpose a déjà été pré-entraîné sur une large base de données d'images de cellules issues de la microscopie, incluant des images d'immunocytochimie avec marquages cytoplasmiques en fluorescence d'un ou plusieurs types cellulaires aux colorations variées, des images microscopiques de coupes colorées (histochimie) et quelques images d'organismes entiers tels que des méduses, des fruits ou encore des cailloux pour généraliser le modèle aux formes rondes. Cellpose est donc un modèle généraliste particulièrement bien adapté pour la segmentation de cellules sans ajustement de paramètres (STRINGER et al., 2021).

Néanmoins, avec des cellules de diamètres très variables sur une même lame histologique, le modèle a montré ses limites. Notamment pour les sections ovariennes d'individus

en ponte ou venant de pondre, où les cellules de grands diamètres (*ovocytes hydratés*) masquent la détection des cellules germinales précoces (*ovogonie*) de plus petit diamètre qui se retrouvent le plus souvent regroupées et accolées au tissu conjonctif compact. Pour prendre en compte ces écarts de diamètre, il faudrait entraîner davantage le modèle généraliste en lui fournissant un plus grand nombre d'images annotées contenant des structures de petits diamètres. Cette problématique concerne tout particulièrement les espèces présentant un développement asynchrone, avec plusieurs cohortes d'ovocytes qui se développent en décalage, menant à une grande disparité de diamètres des follicules sur une même section ovarienne.

4.3 Apprentissage supervisé sous YOLOv5

Malgré le fait que certaines structures n'aient pas été suffisamment référencées dans la base de données d'apprentissage pour assurer leurs identifications optimales, un nombre conséquent de structures cellulaires a pu être identifié à travers les 244 lames histologiques non annotées. Pour améliorer la détection, il faudra par la suite fournir des images annotées de structures de petits diamètres (*og* et *po1*) qui ont été sous-échantillonnées. De plus, en ajoutant des images de *POF* et *ct* il devrait être possible d'améliorer l'identification de ces deux structures qui présentent des analogies visuelles (coloration verte). Enfin, il faudrait améliorer la performance du modèle sur la reconnaissance de la lyse cellulaire, notamment pour optimiser la discrimination d'*ovocyte en atrésie α (aoA)* et d'*ovocyte en atrésie β (aoB)*, structures clés pour la reconnaissance des individus en omission de ponte (phase E).

Même si les pistes d'amélioration sont nombreuses, il faut souligner que ce premier modèle s'est avéré robuste dans l'identification des types cellulaires des 176 individus de cardine franche. En effet, ces résultats ont permis le calcul d'une A_{50} similaire à celle de la méthode stéréologique (2 ans), ainsi qu'une L_{50} avec moins d'1 cm de différence entre les deux méthodes.

Article 4

Citation : Sauger, C., Elie, N., Le Meleder, A., Kellner, K., Berthelin, C., Villain-Naud, N., Dubroca, L. «Using deep learning to identify female germline cells of a flatfish species for sexual maturity determination». 22 pp. (*En préparation*)

Publication : Article en préparation pour soumission dans ICES Journal of Marine Science courant 2024

Résumé : «A deep learning algorithm was set up using Ultralytics' You Only Look Once (v5) to train a custom model for germline cell identification in histological sections of megrim ovaries (*Lepidorhombus whiffiagonis*). Cell segmentation was done using the pre-trained general model Cellpose. 217 histological slides were labeled using stereology and used as the training dataset, while 244 unlabeled slides were analyzed under the newly trained model. Agent calibration for the stereological readings showed a percentage agreement ranging from 79.7% to 95.8%, validating the use of a standardized reading protocol. The model was trained for 600 epoch, with a precision and recall of 67.4% and 66.4%, with a mAP_{0.5} of 67.8%. 77.6% of the unlabeled regions of interest (ROI) were categorized into one of 18 possible structures. When comparing the sexual maturity phase established through the stereological method or the automated cell identification method, 76.7% of individuals were classified into the same maturity phases. Finally, when computing the A₅₀, both methods gave a value of 2 years, and the stereological method yielded a L₅₀ of 18.0 cm while the deep learning method had an L₅₀ of 18.9 cm.»

Contribution : Échantillonnage des ovaires, préparation des lames histologiques, description de l'ovogenèse, lectures des lames histologiques en stéréologie, analyse des images avec Cellpose et YOLOv5, création, conception et rédaction du présent document

Using deep learning to identify female germline cells of a flatfish species for sexual maturity determination

Sauger Carine^{1,2}, Elie Nicolas², Le Meleder Anna¹, Kellner Kristell³, Berthelin Clothilde³, Villain-Naud Nadège³, and Dubroca Laurent¹

¹Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER). Laboratoire Ressources Halieutiques de Port en Bessin, Avenue du Général de Gaulle, 14520, Port en Bessin Huppain, France

²Normandie Univ, UNICAEN, Federative Structure 4207 "Normandie Oncologie", Service Unit PLATON, VIRTUAL'HIS, 14000 Caen, France

³University of Caen Normandie, Unity Biology of Organisms and Aquatic Ecosystems (UMR 8067 BOREA), MNHN, Sorbonne University, UCN, CNRS, IRD, UAG, Esplanade de la Paix, 14032 Caen, France

Abstract

A deep learning algorithm was set up using Ultralytics' You Only Look Once (v5) to train a custom model for germline cell identification in histological sections of megrim ovaries (*Lepidorhombus whiffiagonis*). Cell segmentation was done using the pre-trained general model Cellpose. 217 histological slides were labeled using stereology and used as the training dataset, while 244 unlabeled slides were analyzed under the newly trained model. Agent calibration for the stereological readings showed a percentage agreement ranging from 79.7% to 95.8%, validating the use of a standardized reading protocol. The model was trained for 600 epoch, with a precision and recall of 67.4% and 66.4%, with a mAP_0.5 of 67.8%. 77.6% of the unlabeled regions of interest (ROI) were categorized into one of 18 possible structures. When comparing the sexual maturity phase established through the stereological method or the automated cell identification method, 76.7% of individuals were classified into the same maturity phases. Finally, when computing the A_{50} , both methods gave a value of 2 years, and the stereological method yielded a L_{50} of 18 cm while the deep learning method had an L_{50} of 18.9 cm.

Keywords : *Lepidorhombus whiffiagonis*, maturity ogive, stereology, histology, machine learning, Cellpose, YOLOv5

1 Introduction

In fisheries, the usual process to estimate an individual's sexual maturity phase is based off a visual assessment of the gonad (de Boois *et al.*, 2023). Though this method is straightforward and convenient while out on the field, the identification of specific criteria used to identify a maturity phase can lead to uncertainties (Brown-Peterson *et al.*, 2011; West, 1990). Histology is another method to determine an individual's sexual maturity phase, method considered to be the most accurate despite being time and resource-consuming (Hunter & Macewicz, 1985; West, 1990). This method may be refined further by using stereology, a random, systematic sampling method to quantify the volume each structure takes within the organ (Andersen, 2003; Howard & Reed, 2005). Once the cellular structures within the sexual organ (gonad) have been quantified, a sexual maturity phase can be assigned to the individual.

The top fields in which stereology is used do not include fisheries (Kipanyula & Sife, 2018), and most of the literature on fish gonad studies through stereology are relatively recent (2000's). However, stereology is a method that yields a large quantity of labeled data, making it a good candidate for automatic image recognition through deep learning in artificial intelligence (AI). AI, or «the effort to automate intellectual tasks normally performed by humans», has found a new popularity for the past decade Chollet & Allaire (2018) and has been used in many disciplines within the field of fisheries management, with the development of methods and softwares made accessible to users that are not specialized in machine learning (Rubbens *et al.*, 2023).

Two such softwares have been developed in recent years for the segmentation and classification of ovarian follicles (Pintor *et al.*, 2016; Mbaidin *et al.*, 2021). However, these models used to estimate fecundity are generalized and would require further species specific training for a more efficient segmentation and more precise identification of the germline cell types. In his study, two open access tools were used : a pre-trained model specialized in cell segmentation (Cellpose) and a deep learning algorithm (YOLOv5) to set up a model for identifying the different ovarian cell types.

The sampled individuals were female megrims (*Lepidorhombus whiffiagonis*), a batch spawner flatfish species (Macdonald, 2014). Quantitative histology (stereology) was used to quantify and label cellular structures within full ovarian cross sections from individuals sampled during the entire reproductive cycle. Several points were addressed during this study, such as the influence of cross section position within the ovary, the human bias during

stereology readings, the difficulty of generalized models to segment cells with important size differences and the precision of a model learning from a custom dataset.

2 Materials and Methods

2.1 Histological samplings

A total of 202 female *Lepidorhombus whiffiagonis* were sampled from ICES divisions 7.b-k, 8.a-b, and 8.d (west and southwest of Ireland, Bay of Biscay), from November 2019 to May 2022. They were caught by bottom trawl, originating from either commercial fishing vessels or the scientific campaign EVHOE (EValuation Halieutique Ouest de l'Europe) (Laffargue *et al.*, 1987). For each individual, fresh ovaries were extracted and processed into histological slides as described in Sauger *et al.* (2020). For every fish, at least one cross section was produced for each ovary, yielding a total of 461 Prenant-Gabe trichrome stained (Gabe, 1968) slides. Finally, the slides were digitized using an automated whole slide imaging scanner (Aperio CS, Scan Scope Console software, v.10.2.0.2352).

2.2 Stereology and cellular homogeneity

Whole slide images (.svs) were analyzed under the QuPath software (v3.2) (Bankhead *et al.*, 2017). Cellular structures found within the ovarian section were quantified using stereology (Dubroca *et al.*, 2023). Based off Glagolev (1934)'s method, individual ovarian sections were outlined and a grid of 500 to 600 sampling points was placed within the outlined area. For 217 histological slides, the cellular structure under each sampling point was identified and labeled (Table 1). The method used by (Sauger *et al.*, 2020) to verify cellular homogeneity was used on 17 individuals. Each fish had both ovaries extracted, and 3 sections (anterior, median and posterior positions in the ovary) were processed into histological slides. The cellular structures of the 102 slides were quantified through stereology. A binomial GLM (General Linear Model) (Chessel & Thioulouse, 2013; Zuur *et al.*, 2009) was realized on the structure ratios and their individual deviations were tested through the *drop1* function. Finally, a principal component analysis (PCA) was established for a visual representation of the cellular homogeneity.

Out of the 202 individuals, 176 had at least one histological section read under stereology and one slide that was not. Once the follicles were quantified for at least once slide for all 202 individuals, a maturity phase was associated

to each histological slide following ICES (2014, 2018) and Brown-Peterson *et al.* (2011) definitions. A maturity ogive, the length at which 50% of the population has reached sexual maturity (L_{50}) and the age at which 50% of the population has reached sexual maturity (A_{50}), were calculated using the sizeMat package (Torrejon-Magallanes, 2018).

Table 1: Labels for identifiable structures within the ovarian histological slides of *Lepidorhombus whiffiagonis*. * = main germline cells

Abbreviation	Name
og*	oogonium
po1*	primary oocyte stage 1
po2*	primary oocyte stage 2
ldo*	lipid droplet oocyte
cao*	cortical alveoli oocyte
vtg*	oocyte in vitellogenesis
oih*	oocyte in hydration
oh*	hydrated oocyte
POF*	Post-Ovulatory Follicle
aoA*	atretic oocyte alpha
aoB*	atretic oocyte beta
L	lysis
bv	blood vessel
Is	intercellular space
gw	gonadal wall
ct	connective tissue
E	unnatural emptiness
U	undetermined

2.3 Training data acquisition

To assure the quality of cell images used in the training, rules were set up to assure the reproducibility of the identifications (Heude-Berthelin *et al.*, 2023), with the label **U** (undetermined) used for all structures that could not be identified with absolute certainty (image too blurry, missing nucleus, doubt in follicle identity,...). To validate these rules, calibration between two and three readers were performed. Fifteen histological slides, with the same sampling grid, were read multiple times until the reading error index for each cellular structure showed a difference of less than 3%. With the reading error index for a cell type being the ratio of the difference between the highest and lowest quantified number for that cell type. Once the reading

error index for each cellular structure showed a difference of less than 3%, the reading protocol was validated (Heude-Berthelin *et al.*, 2023) and inter-rater reliability indexes were calculated, with the percentage agreement between readers (McHugh, 2012), and Fleiss’s kappa (Conger, 1980; Hallgren, 2012).

After the stereology reading process, the Cellpose extension (v.0.7.0) (Stringer *et al.*, 2021; Pachitariu & Stringer, 2022; Cutler *et al.*, 2022) was used under QuPath (v4.3) for the segmentation of individual oocytes. This generalist model is a deep learning based segmentation method that outlines of the oocytes, overlaying them with a mask. However, with ovarian slides from individuals of different maturity phases the follicle sizes greatly varied, with mean oocyte diameters of $30\mu\text{m}$ for immature individuals to over $600\mu\text{m}$ in mean diameter in spawning individuals. Because of this, we were compelled to implement a parameter to take into consideration the oocyte diameter sizes limit depending on the slide, with 3 categories : small (mask diameter of $30\mu\text{m}$), medium (mask diameter of $100\mu\text{m}$) and big (mask diameter of $300\mu\text{m}$).

The coordinates of the masks were cross-referenced with the coordinates of the labeled sampling points. When the coordinates matched, a picture (.tif) the shape of the mask was extracted and a text file with the matching label ID was set up. In this study, 48557 labeled ROI (regions of interest) were acquired and directly set up for training without label verification.

2.4 Unlabeled data acquisition

All remaining histological slides that were not labeled (n=244) were run under QuPath’s Cellpose extension as described previously, with the three size categories taken into account. Individual follicles were segmented and 191594 ROI (.tif) were extracted.

2.5 Ultralytics’ YOLOv5 on custom data

The deep learning algorithm Ultralytics’ You Only Look Once (YOLOv5) (Redmon *et al.*, 2016; Terven & Cordova-Esparza, 2023) was used on the labeled training data to learn the 18 classes (Table 1). From the training data, 88.89% (43701) ROI were used in training and 11.11% (4856) was used for validation, for over 600 epochs on an Intel Xeon Processor W-2223 4C (3.6 GHz). Personal computer provided 64 Go of random access memory, and 16 GO from a NVIDIA RTX A4000.

Once the model was trained, the 191954 unlabeled ROI were analyzed, with a confidence threshold (minimum score that the model will consider the prediction to be a true prediction) of 0.5.

3 Results

3.1 Reading calibration

The percentage agreements and Fleiss' kappas for the calibration readings are shown in Table 2. The first readings were assigned to 3 agents, with a percentage agreement ranging from 54.4% to 82.7% (58.3% to 83.3% for Fleiss' kappa). For the last calibration reading, the results taken into consideration were from the 2 agents that would be doing the stereological readings for this study. The percentage agreements spanned from 79.7% to 95.8% (74.3% to 94.6% for Fleiss' kappa). There was an increase in the percentage agreement and Fleiss' kappa for all slides that were read multiple times.

Table 2: Agreement percentages (Agree %) and Fleiss' kappa percentage agreement (Kappa %) for the first (1-) and last (Ω -) calibration readings of the 15 slides (histological sections of megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) ovaries), for 2 or 3 reading agents (Agents (n))

Slide n°	1-Agents (n)	Ω -Agents (n)	1-Agree (%)	Ω -Agree (%)	1-Kappa (%)	Ω -Kappa (%)
1	3	2	78.9	95.8	80.7	94.5
2	3	2	71.8	93.1	74.8	91.0
3	3	2	76.4	92.8	79.2	91.0
4	3	NA	70.7	NA	73.1	NA
5	3	2	82.7	92.8	83.3	89.8
6	3	2	59.9	89.0	65.8	86.0
7	3	2	54.4	79.7	58.3	74.3
8	3	2	70.4	93.6	74.6	92.0
9	3	2	80.9	95.9	82.8	94.6
10	3	2	74.0	94.1	74.5	92.2
11	3	2	73.6	94.9	75.1	93.3
12	3	2	73.5	92.2	73.7	89.4
13	3	2	72.1	86.3	74.6	82.3
14	3	2	62.7	84.5	64.7	79.1
15	3	2	71.6	95.7	74.0	94.1

3.2 Cellular homogeneity

For the 17 sampled megrim individuals, 15 different structures were quantified. Table 3 shows that the variance that best explains the model are the individuals themselves, except for the **aoB** (atretic oocyte beta) and **L** (ly-

sis) structures which are best explained by the position of the section within the ovary. Small germinal cells (oogonium (**og**) and primary oocyte stage 1 (**po1**)) appeared with a lower deviance, and may have been present on the histological, but not always quantified. The principal component analysis (PCA) allow for a visual validation of the cellular homogeneity, with 95.5% of variation explained on two axis, with **Is** (intercellular space) and **vtg** (oocyte in vitellogenesis) as the main structures influencing the model. Indeed, the two groups observed in Figure 1 are separated by a higher ratio (>25%) of oocytes in vitellogenesis for the bottom most group, compared to the top most group (<14%).

Table 3: Results of the *drop1 function* (R package) for generalized linear models (GLM binomial logit link) of the histological structures identified throughout the 102 ovarian cross sections of the megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*). With Fish_ID = sampled individuals (n=17), position = the position of the cross section in the ovaries (n=6), df = degrees of freedom, deviance = the residual deviance of the model, AIC = Akaike information criterion, P(Chi) = Chi² p-value. With **og**: oogonium, **po1**: primary oocyte stage 1, **po2**: primary oocyte stage 2, **ldo**: lipid droplet oocyte, **cao**: cortical alveoli oocyte, **vtg**: oocyte in vitellogenesis, **aoA**: atretic oocyte alpha, **aoB**: atretic oocyte beta, **bv**: blood vessel, **ct**: connective tissue, **E**: unnatural emptiness, **U**: undetermined

		df	deviance	AIC	P(Chi)
og	Intercept		46.48	124.54	
	Fish_ID	16	80.02	126.08	6.25e-03 **
	position	5	59.17	127.23	0.03 *
po1	Intercept		64.45	191.90	
	Fish_ID	16	101.76	197.21	1.89e-03 **
	position	5	65.83	183.28	0.93
po2	Intercept		139.34	652.21	
	Fish_ID	16	493.55	974.41	<2.2e-16 ***
	position	5	155.32	658.18	6.91e-03 **
ldo	Intercept		143.21	540.56	
	Fish_ID	16	643.85	1009.20	<2.2e-16 ***
	position	5	163.19	550.54	1.26e-03 **
cao	Intercept		100.40	634.90	
	Fish_ID	16	3372.60	3875.10	<2e-16 ***
	position	5	105.70	630.10	0.38
vtg	Intercept		177.40	602.70	
	Fish_ID	16	11909.60	12302.90	<2e-16 ***
	position	5	218.00	633.30	1.12e-07 ***
aoA	Intercept		64.27	197.38	
	Fish_ID	16	496.97	598.09	<2.2e-16 ***
	position	5	83.39	206.51	1.82e-03 **
aoB	Intercept		0.00	46.61	
	Fish_ID	16	11.18	25.79	0.79
	position	5	7.16	43.77	0.21
bv	Intercept		65.29	427.76	
	Fish_ID	16	223.03	553.50	<2.2e-16 ***
	position	5	112.81	465.27	4.47e-09 ***
ct	Intercept		225.53	791.24	
	Fish_ID	16	639.59	1173.30	<2.2e-16 ***
	position	5	263.69	819.40	3.51e-07 ***
E	Intercept		1445.20	1813.70	
	Fish_ID	16	2260.90	2597.40	<2.2e-16 ***
	position	5	1571.50	1930.00	<2.2e-16 ***
gw	Intercept		309.32	914.81	
	Fish_ID	16	1338.74	1912.22	<2.2e-16 ***
	position	5	329.91	925.39	9.69e-04 ***
Is	Intercept		485.99	1177.50	
	Fish_ID	16	797.41	1457.00	<2.2e-16 ***
	position	5	595.58	1277.10	<2.2e-16 ***
L	Intercept		13.32	70.54	
	Fish_ID	16	33.61	58.82	0.21
	position	5	24.55	71.77	0.04 *
U	Intercept		236.62	855.96	
	Fish_ID	16	1778.14	2365.47	<2.2e-16 ***
	position	5	247.20	856.53	0.06

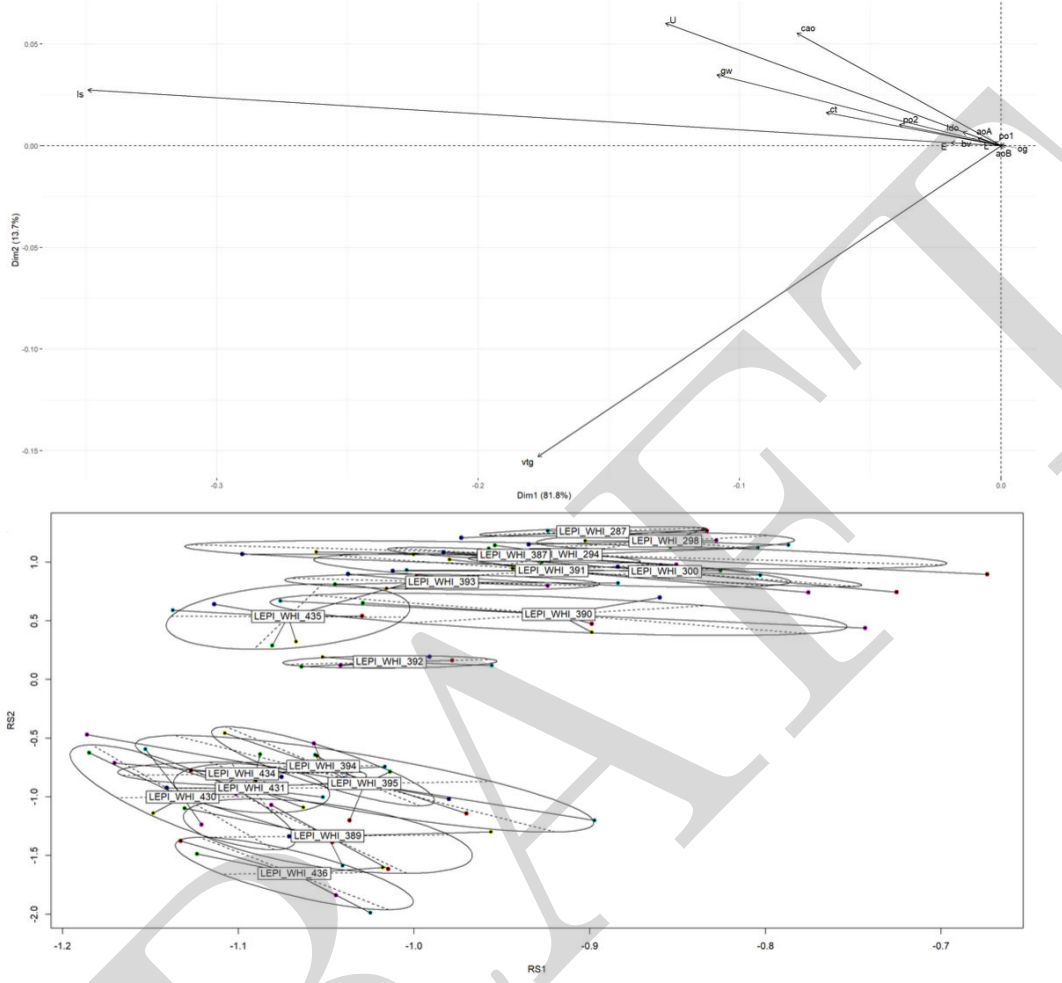


Figure 1: Principal component analysis (PCA) of the cellular structures quantified in 3 histological slides of different positions (anterior, median and posterior) for both ovaries (ventral and dorsal), for 17 megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*). With **og**: oogonium, **po1**: primary oocyte stage 1, **po2**: primary oocyte stage 2, **ldo**: lipid droplet oocyte, **cao**: cortical alveoli oocyte, **vtg**: oocyte in vitellogenesis, **aoA**: atretic oocyte alpha, **aoB**: atretic oocyte beta, **bv**: blood vessel, **ct**: connective tissue, **E**: unnatural emptiness, **U**: undetermined

3.3 Validation

The model was trained for 600 epoch, with the labeled dataset (Figure 2). When comparing precision against recall curve for the best model for all classes, the mean average precision (mAP) is of 67.8% for a confidence threshold at 0.5. The compromise between the recall value and a high precision assures that the risk of false positives are lowered. The precision (accuracy %

of the model's correct positive predictions) was of 67.4%. The recall (portion % of correctly identified positive cases) has a value of 66.4%. However, past 340 epoch, the precision greatly decreases (from 84% to 66%).

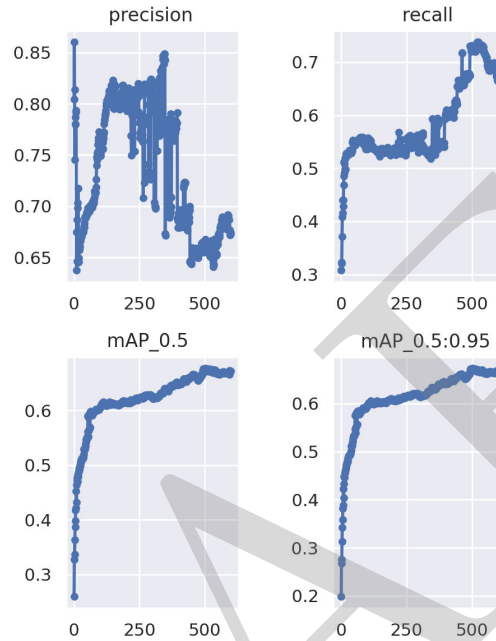


Figure 2: Trained model values for the precision (%), recall (%) and mean average precision (mAP) at different epoch (0 to 600), with a confidence threshold of 0.5 (mAP_0.5) and averaged over the Intersection Over Union (IOU) thresholds from 0.5 to 0.95 (mAP_0.5:0.95)

When taking into account both Figure 3 and Figure 4, there is a clear correlation between low instances and low prediction values for true positives. This gives a good insight on the structures that were under represented in the labeled dataset used for training (**og**, **po1**, **ho**, **POF**, **aoA**, **aoB**, **L**, **bv**, **E**).

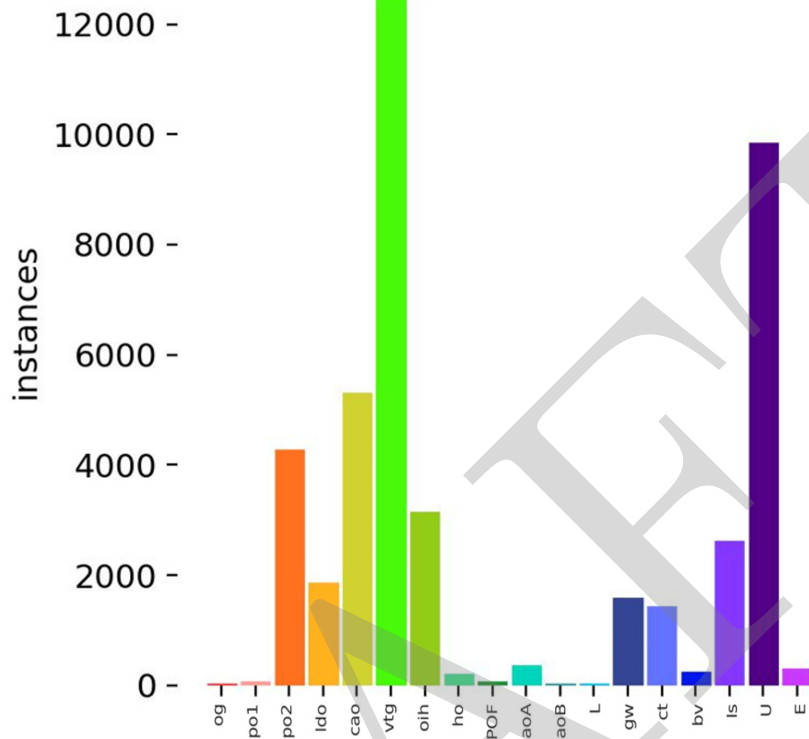


Figure 3: Number of instances found by the model for each cellular structure, with **og**: oogonium, **po1**: primary oocyte stage 1, **po2**: primary oocyte stage 2, **ldo**: lipid droplet oocyte, **cao**: cortical alveoli oocyte, **vtg**: oocyte in vitellogenesis, **oih**: oocyte in hydration, **ho**: hydrated oocyte, **POF**: Post-Ovulatory Follicle, **aoA**: atretic oocyte alpha, **aoB**: atretic oocyte beta, **L**: lysis, **gw**: gonadal wall, **ct**: connective tissue, **bv**: blood vessels, **Is**: intercellular space, **U**: undetermined, **E**: unnatural emptiness

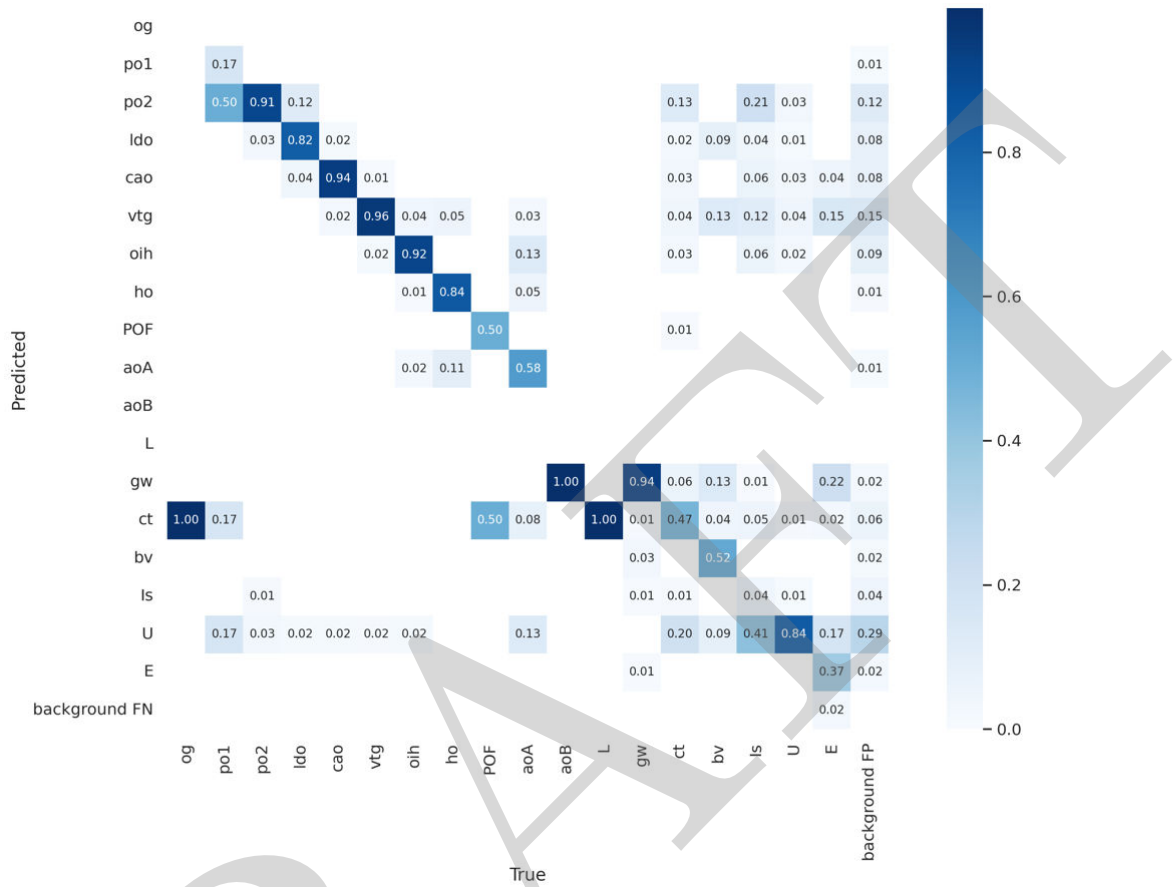


Figure 4: Confusion matrix of the predicted structures found by the model with the labeled dataset and the true positives, with **og**: oogonium, **po1**: primary oocyte stage 1, **po2**: primary oocyte stage 2, **ldo**: lipid droplet oocyte, **cao**: cortical alveoli oocyte, **vtg**: oocyte in vitellogenesis, **oih**: oocyte in hydration, **ho**: hydrated oocyte, **POF**: Post-Ovulatory Follicle, **aoA**: atretic oocyte alpha, **aoB**: atretic oocyte beta, **L**: lysis, **gw**: gonadal wall, **ct**: connective tissue, **bv**: blood vessels, **Is**: intercellular space, **U**: undetermined, **E**: unnatural emptiness

3.4 Estimating sexual maturity phases

When using the model to identify the 191954 unlabeled ROI, 149006 (77.6%) were classified into a 15 different categories, with **og**, **aoB** and **L** never identified. The time frame for one ROI analysis was of 51 milliseconds. The cellular structures quantified for 176 individuals were used to classify these individuals into a maturity phase. In Table 4, the confusion matrix shows that 76.7% of individuals were classified into the correct maturity phase.

Table 4: Confusion matrix comparing maturity phase reading results between the automated (top row) and stereological (first column) method for 176 *Lepidorhombus whiffiagonis*. The circled data are the number of individuals correctly estimated through the automatic method, with A: Immature, B: Developing, Ca: Actively spawning, Cb: Spawning capable, D: Regression/Regeneration and E: Omitted spawning

	A	B	Ca	Cb	D
A	16	0	1	0	1
B	3	76	3	4	6
Ca	0	1	26	4	0
Cb	0	1	2	15	0
D	1	7	3	3	2
E	0	0	1	0	0

When establishing a maturity ogive (Table 5) in fisheries, the individuals are separated into 2 groups: those that will participate in the current spawning season (B, Ca, Cb, D) and those that will not (A). Miss-classifying individuals between phases B, C and D will not impact the estimations. In this study, out of 176 total individuals, 4 sexually mature individuals were classified into immature, and 2 immature individuals were classified as sexually mature. When estimating the L_{50} and A_{50} with the maturity phases established after the identification of the ovarian cellular structures by stereology and deep learning method, the results are similar. With an A_{50} at 2 years of age for both methods, and an L_{50} of 18 cm by the stereological method and 18.9 cm by the automated cell identification method.

Table 5: Size (L_{50}) and age (A_{50}) at which 50% of the population has reached sexual maturity for the megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*). Indexes calculated from 176 individuals with their sexual maturity phase established through the stereological method and germline cells identification through Deep learning (DL). With L_{50} stereology confidence interval [10.7:21.4] cm, A_{50} stereology confidence interval [0.4:2.6] years, L_{50} DL confidence interval [12.3:22.3] cm, A_{50} DL confidence interval [1.2:2.8] years

	Stereology	Deep learning
L_{50}	18 cm ($r^2=0.41$)	18.9 cm ($r^2=0.41$)
A_{50}	1.9 years ($r^2=0.42$)	2.2 years ($r^2=0.46$)

When comparing megrim individuals classified into the different maturity

phases depending on the cell identification method (Figure 5), the spawning period (January, February, March) can be identified (fish in phase C, spawning). The model was also able to identify **POF** (post-ovulatory follicles), distinguishing between individuals in ca (actively spawning) and Cb (spawning capable). Before the spawning period (November and December), immature individuals are correctly classified into phase A. right after the spawning period (May and June), both methods found large (≥ 35 cm) immature individual.

4 Discussion

4.1 Inter-agent calibration

Calibration between both agents that did the stereological readings paved the way to a standardized identification of the cellular structures. First of all, the implementation of a reading protocol (Dubroca *et al.*, 2023) during the calibration exercises greatly limited the possibility of subjective inputs, favoring the undetermined (**U**) category when there was a doubt for the identification of the structure. Even though this lowered the number of identified germline cells, the structures that were labeled were identified after following a set of rules that assured they could not be identified as another structure. This point is important for it warrants a labeled database of well defines structures, with a trained model that will classify any questionable structures into the **U** category.

Secondly, calculating the percentage agreements between the two agents gave an indication on what biais could be present between different readers. In this case, the **U** category allowed less experienced readers to classify structures they had doubts on. Even if this lowered the general count of the other identified structures, it would not impact the input of 'easy to identify' structures into the labeled database. Moreover, the use of Prenant-Gabe's trichrome (Gabe, 1968) greatly helped in the identification of germline cells, as well as highlighted core elements like oocyte nucleus, vitellus droplets or cortical alveoli, easing the identification through colorful contrasts. Finally, this calibration allowed for a minimization of reading differences between readers, as well as setting up a protocol that played a key role in setting up a database with standardized cellular structure identification criteria, limiting future model inputs.

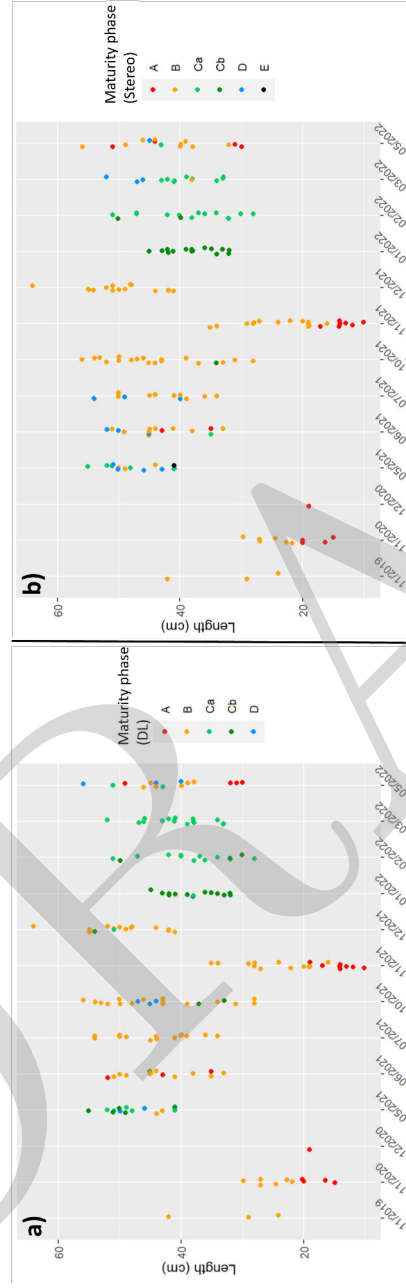


Figure 5: Megrin (*Lepidorhombus whiffiagonis*) individuals (n=176) by length (cm) and date of sampling (month/year) classified into a maturity after cellular identification through the a) deep learning method or b) stereology method. With A: Immature, B: Developing, Ca: Actively spawning, Cb: Spawning capable, D: Regression/Regeneration and E: Omitted spawning, **og**: oogonium, **po1**: primary oocyte stage 1, **po2**: primary oocyte stage 2, **ldo**: lipid droplet oocyte, **cao**: cortical alveoli oocyte, **vtg**: oocyte in vitellogenesis, **oih**: oocyte in hydration, **ho**: hydrated oocyte, **POF**: Post-Ovulatory Follicle, **aoA**: atretic oocyte alpha, **aoB**: atretic oocyte beta, **L**: lysis, **gw**: gonadal wall, **ct**: connective tissue, **bv**: blood vessels, **Is**: intercellular space, **U**: undetermined, **E**: unnatural emptiness

4.2 Cellular homogeneity

While the cellular homogeneity was validated, atretic oocytes beta **aoB** and lysis **L** are uncommon structures found only in certain individuals. Moreover, oogonium (**og**) and primary stage oocytes (*po1*) are small sized germline cells that were under quantified in larger ovaries (maturing oocytes). This underlines the problem that even if these uncommon or rare structures will be quantified, they might not be enough of these labeled structures for a proper training in their identification.

4.3 Cell segmentation

With the megrim (*lepidorhombus whiffiagonis*) being an asynchronous batch spawner (Macdonald, 2014), germinal cell sizes will vary greatly during the spawning season, which lead to the use of 3 different mask sizes during the segmentation process. While Cellpose managed to extract enough structures per slides to estimate a maturity phase, there was a clear lost in oocyte detection, especially for fish that were spawning or that had just finished spawning. Indeed, after spawning big ($700+\mu\text{m}$) and small ($10-40\mu\text{m}$) oocytes were present, however Cellpose showed difficulty segmenting all cells with such size disparity. In these cases, the detection of the smaller oocytes was favored. Though this problem was noticed only in fish that had already spawned for the megrim, this could be problematic with other batch spawners if oocyte cohorts show important differences in sizes at much earlier stages. If the information searched is the most advanced germline stage to classify an individual into a maturity phase, then this method is acceptable. However, if the objective is to quantify all oocytes to estimate a fecundity, then the segmentation algorithm would have to be trained to detect these oocytes with important size differences. Softwares that segment and classifies cells exist (Pintor *et al.*, 2016; Mbaidin *et al.*, 2021), and even estimate fecundity, but they also show limits when oocyte size differences are too great and would also require to be trained on species specific datasets.

4.4 Model training

The overall detection results of the YOLOv5 (Figure 2) model show an initial rapid increase in precision, recall and mAP. As the number of epochs increase the precision, recall and mAP curves tend to stabilize around 150 epochs. The model is over-trained and should be lowered to 340 epoch, but should also be trained on more ROI of underrepresented structures. To further improve the the training dataset, labeled ROI should be reviewed for mislabels,

and small structures (**og** and **po1**), difficult to differentiate structures (**POF** and **ct**), and hard to identify structures (**aoA**, **aoB** and **L**) should have more labeled ROI added to the trained model. In addition, individuals that have not spawned and show a high amount of atretic oocytes (**aoA**>50%) are classified under the omitted spawning (**E**) phase and should not be included in maturity ogive estimations. It is thus important to accurately identify atresia to remove omitted spawning individuals. Finally, since the segmentation detects a structure and associates it the closest labeled coordinates, the intercellular space (**Is**) and unnatural emptiness (**E**) should be removed since they are, by definition, instances of void on the histological slide.

Finally, out of the 202 sampled megrims, 26 did not have unlabeled slides, and were thus not analyzed by the trained model. This choice was made to see how the model managed data it had never seen. Once the model has been re-trained with an improved dataset, the slides of these 26 individuals could be analyzed as unlabeled and the results used to estimate an A_{50} and L_{50} with a higher sampling pool.

4.5 Maturity phase estimations

After the spawning period, during the regressing/regeneration (**D**) phase, the ovary undergoes important metabolic and physiological activity ([ICES, 2014](#)), which may lead to a difficulty in identifying the right structures to classify the individual into the right maturity phase. This issue must be taken into account when estimating the sexual maturity phase of a species, regardless of the method used (histology, stereology, macroscopic,..). Sexual maturity determination should be avoided outside of the species' spawning period.

5 Conclusion

Histology is the most accurate mean to determine sexual maturity, a valuable data in fisheries management. However this method requires time, resources and knowledge on cellular structure identification. The first appeal in automating germline cell identification is the possible time save, over using the histological or stereological methods. Though a lot of labeled data is needed to assure the high precision of the model, stereology brings forth this vast amount data, though it must be acquired in a standardized way to ease the training. This does take a considerable amount of work to set up, however, this method could be carried out routinely. Even if sexual maturity is established through stereology just once every 3 to 5 years for commercially

important species. This would at least refresh maturity ogive datas that, for most species, have not been updated for the past few years. Moreover, using the same model ensures consistent quality of cell identification, and if a better model is trained, then it could be used on the digitized slides to correct already existing reading.

When taking into account all the possible improvements previously stated, and the fact that this first model has proven itself quite robust with the estimation of a similar A_{50} and a L_{50} with less than 1 cm difference, we believe that this approach will be of great value in fisheries management.

6 Supplementary materials

All macroscopic ovarian pictures, scanned histological slides, stereology reading results and sampling data are available on the Zenodo data repository ([Sauger *et al.*, 2023](#)). For an access to the model and training data, contact the authors.

7 Acknowledgements

Funding of the MATO project was provided by France Filière Pêche. Fish accessibility was possible through the Direction Scientifique of IFREMER, the International Bottom Trawl Surveys (CGFS, EVHOE and IBTS) and SCAPECHE Bretagne Ouest.

8 Author contributions

Carine Sauger: Data collection, oogenesis description, slide processing, slide reading, image analyses. (Main author)

Nicolas Elie: Image analyses and stereology grid processing.

Anna Le Meleder : Data collection, slide processing, slide reading.

Kristell Kellner: Oogenesis description.

Clothilde Berthelin : Oogenesis description.

Nadège Villain-Naud: Slide processing.

Laurent Dubroca: Data collection, image analyses.

All authors have contributed to the production of this document.

9 Competing interests

There are no significant competing financial, professional, or personal interests that might have influenced the performance or presentation of the work described in this paper.

References

- Andersen, T. E. 2003. Unbiased stereological estimation of cell numbers and volume fractions: the disector and the principles of point counting. *Pages 11–18 of: Kjesbu, O. S., Hunter, J. R., & Witthames, P. R. (eds), Report of the Working Group on Modern Approaches to Assess Maturity and Fecundity of warm- and cold- water fish and squids.* Bergen, Norway: Institute of Marine Research.
- Bankhead, Peter, Loughrey, Maurice B., Fernández, José A., Dombrowski, Yvonne, McArt, Darragh G., Dunne, Philip D., McQuaid, Stephen, Gray, Ronan T., Murray, Liam J., Coleman, Helen G., James, Jacqueline A., Salto-Tellez, Manuel, & Hamilton, Peter W. 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*, **7**(1), 16878.
- Brown-Peterson, Nancy J., Wyanski, David M., Saborido-Rey, Fran, Macewicz, Beverly J., & Lowerre-Barbieri, Susan K. 2011. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*, **3**(1), 52–70.
- Chessel, D., & Thioulouse, J. 2013. *Modèle linéaire généralisé*. Fiche n°5 d'utilisation du logiciel R. 38 p.
- Chollet, François, & Allaire, Joseph J. 2018. *Deep learning with R*. Shelter Island, NY: Manning. OCLC: 1022850710.
- Conger, Anthony J. 1980. Integration and Generalization of Kappas for Multiple Raters. *Psychological Bulletin*, **88**(2), 322–328.
- Cutler, K. J., Stringer, C., Lo, T. W., Rappez, L., Stroustrup, Nicholas, Brook Peterson, S., Wiggins, P. A., & Mougous, J. D. 2022. Omnipose: a high-precision morphology-independent solution for bacterial cell segmentation. *Nature Methods*, **19**(11), 1438–1448.

- de Boois, I. J., Burt, G., Lecomte, J.-B., Masnadi, F., Panten, K., Raat, H., Sigurosson, G. M., & Thorlacius, M. 2023. *ICES Survey Protocols – Offshore Beam Trawl Surveys, Coordinated by Working group on Beam Trawl Surveys (WGBEAM)*. Tech. rept. 69. International Council for the Exploration of the Sea. Artwork Size: 4937759 Bytes.
- Dubroca, Laurent, Elie, Nicolas, Heude-Berthelin, Clothilde, Kellner, Kristell, Le Meleder, Anna, Lepoittevin, Mélanie, Martin, Valentine, Nivet, Timothé, Sauger, Carine, & Villain-Naud, Nadège. 2023. Stereology reading protocol when using quantitative histology for the determination of sexual maturity in fish ovaries. *SIH*, 40.
- Gabe, Manfred. 1968. *Techniques Histologiques*. 2eme édition edn. Paris: Masson et C.
- Glagolev, A. A. 1934. Quantitative analysis with the microscope by the ‘point’ method. *Minerals Engineering Journal*, **135**, 399–400.
- Hallgren, Kevin A. 2012. Computing Inter-Rater Reliability for Observational Data: An Overview and Tutorial. *Tutorials in Quantitative Methods for Psychology*, **8**(1), 23–34.
- Heude-Berthelin, C., Kellner, K., & Sauger, C. 2023. Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the megrim, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792). *IFREMER*, 33.
- Howard, C. V., & Reed, M. G. 2005. *Unbiased Stereology. Three-Dimensional Measurements in Microscopy*. 2nd edn. New York, USA: Garland Science/Bios Scientific.
- Hunter, J Roe, & Macewicz, Beverly J. 1985. Measurement of Spawning Frequency in Multiple Spawning Fishes. *NOAA*, **36**, 79–94.
- ICES. 2014. *Report of the Workshop for maturity staging chairs (WK-MATCH)*. Workshop. International Council for the Exploration of the Sea, Split, Croatia.
- ICES. 2018. *Report of the Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF)*. Tech. rept. 38. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark.
- Kipanyula, M. J., & Sife, A. S. 2018. Global Trends in Application of Stereology as a Quantitative Tool in Biomedical Research. *BioMed Research International*, **2018**(Sept.), 1–9.

- Laffargue, P., Salaun, M., Garren, F., Bellail, R., Mahé, J.C., & Poulard, J.C. 1987. EVHOE Evaluation Halieutique Ouest de l'Europe. *French Oceanographic Cruises*. Publisher: Sismar.
- Macdonald, P. 2014. *Increasing understanding of a data poor species to improve resource management: megrim (Lepidorhombus whiffiagonis) in the northern North Sea*. Doctorate, University of Aberdeen, United Kingdom.
- Mbaidin, A., Rábade-Uberos, S., Dominguez-Petit, R., Villaverde, A., González-Rufino, M. E., Formella, A., Fernández-Delgado, M., & Cernadas, E. 2021. STERapp: Semiautomatic Software for Stereological Analysis. Application in the Estimation of Fish Fecundity. *Electronics*, **10**(June), 1–15.
- McHugh, Mary L. 2012. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica*, **22**(3), 276–282.
- Pachitariu, M., & Stringer, C. 2022. Cellpose 2.0: how to train your own model. *Nature Methods*, **19**(12), 1634–1641.
- Pintor, J. M., Carrión, P., Cernadas, E., González-Rufino, E., Formella, A., Fernández-Delgado, M., Domínguez-Petit, R., & Rábade-Uberos, S. 2016. Govocitos: A software tool for estimating fish fecundity based on digital analysis of histological images. *Computers and Electronics in Agriculture*, **125**(July), 89–98.
- Redmon, J., Divvala, S., Girshick, R., & Farhadi, A. 2016. You Only Look Once: Unified, Real-Time Object Detection. *Pages 779–788 of: 2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. Las Vegas, NV, USA: IEEE.
- Rubbens, P., Brodie, S., Cordier, T., Barcellos, D. D., Devos, P., Fernandes-Salvador, J. A., Fincham, J. I., Gomes, A., Handegard, O., Howell, K., Jamet, C., Kartveit, K. H., Moustahfid, H., Parcerisas, C., Politikos, D., Sauzède, R., Sokolova, M., Uusitalo, L., Watson, J. T., Welch, H., Beltran-Perez, O., Chaffron, S., Greenberg, D. S., Kühn, B., Kiko, R., Lo, M., Lopes, R. M., Möller, K. O., Michaels, W., Pala, A., Romagnan, J.-B., Schuchert, P., Seydi, V., Villasante, S., Malde, K., & Irisson, J.-O. 2023. Machine learning in marine ecology: an overview of techniques and applications. *ICES Journal of Marine Science*, **80**, 1829–1853.
- Sauger, C., Quinquis, J., Kellner, K., Heude-Berthelin, C., Lepoittevin, M., Elie, N., & Dubroca, L. 2020. A macroscopic and stereological imaging dataset of Pleuronectes platessa ovaries. *Scientific Data*, **7**(1), 1–8.

- Sauger, C., Le Meleder, A., Kellner, K., Heude-Berthelin, C., Villain-Naud, N., Elie, N., & Dubroca, L. 2023. Macroscopic, histological and stereological image dataset of Megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) ovaries from the ICES Celtic Seas, south of Greater North sea or Bay of Biscay Ecoregions. *Zenodo*, [Data set] v1.0.
- Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M., & Pachitariu, M. 2021. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nature Methods*, **18**(1), 100–106.
- Terven, J., & Cordova-Esparza, D. 2023 (June). *A Comprehensive Review of YOLO: From YOLOv1 and Beyond*. Tech. rept. arXiv:2304.00501. arXiv. arXiv:2304.00501 [cs].
- Torrejon-Magallanes, Josymar. 2018. *sizeMat: An R Package to Estimate Size at Sexual Maturity*.
- West, G. 1990. Methods of Assessing Ovarian development in Fishes: a Review. *Marine and Freshwater Research*, **41**(2), 199–222.
- Zuur, Alain F., Ieno, Elena N., Walker, Neil J., Saveliev, Anatoly A., & Smith, Graham M. 2009. *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Statistics for biology and health. New York, NY: Springer. OCLC: 288985460.

5 Bilan

De plus en plus d'outils en apprentissage automatique sont mis en accès libre et à disposition de la communauté scientifique, mais l'utilisation de l'apprentissage supervisé sur des lames histologiques d'ovaires pour la détermination de la phase de maturité d'espèces commerciales en halieutique n'était pas encore développée. Seuls quelques logiciels généralistes (MBAIDIN et al., 2021 ; PINTOR et al., 2016) étaient disponibles et aucune méthodologie n'a été trouvée dans la littérature. La méthodologie présentée dans ce [Chapitre 4](#) utilise des outils généralistes reconnus dans le domaine de la segmentation et la reconnaissance d'images, et nous avons pu montrer que leur utilisation est pertinente pour la question scientifique que nous nous étions posées, ce en utilisant les informations issues d'une approche stéréologique classique.

Cellpose, un modèle d'apprentissage supervisé pré-entraîné spécialisé dans la détection et la segmentation des cellules, a permis la mise en place d'une base d'images annotées grâce au travail préalable de stéréologie. Il faut cependant noter que même si la plupart des cellules ont été segmentées, le modèle perd en performance quand les diamètres des cellules présentent de trop grands écarts.

Sous YOLOv5, un algorithme en apprentissage supervisé de reconnaissance d'images, la base d'images annotées a rendu possible l'entraînement d'un modèle pour l'identification des différentes structures retrouvées dans les ovaires de la cardine franche (*L. whiffiagonis*). Même s'il est possible d'améliorer le modèle, le calcul d'indices de valeurs semblables à celles obtenues suite aux lectures manuelles par la stéréologie montre la pertinence et la validité de cette approche. Avec une L_{50} de 18.0 cm et 18.9 cm pour la méthode stéréologique et en apprentissage supervisé, respectivement, ainsi qu'un A_{50} de deux ans pour ces deux méthodes.

Cette méthode, certes longue à mettre en place, garantit donc une reproductibilité des lectures d'une lame à l'autre. C'est un outil pertinent dans la mise en place d'un suivi des phases de maturité par l'histologie quantitative, en routine et sur le long terme. Il pourrait être particulièrement intéressant dans le domaine de l'halieutique où de nombreuses espèces sont suivies annuellement. Cela permettrait de réaliser un suivi de la maturité sur plusieurs années avec une précision constante, tout en mettant à jour les informations telles que les périodes du frai, les ogives de maturité ou encore les longueurs/âges à première maturité. Enfin, la méthodologie développée ici permet d'atténuer drastiquement les temps nécessaires aux déploiements d'une approche stéréologique pour quantifier objectivement la maturité sexuelle.

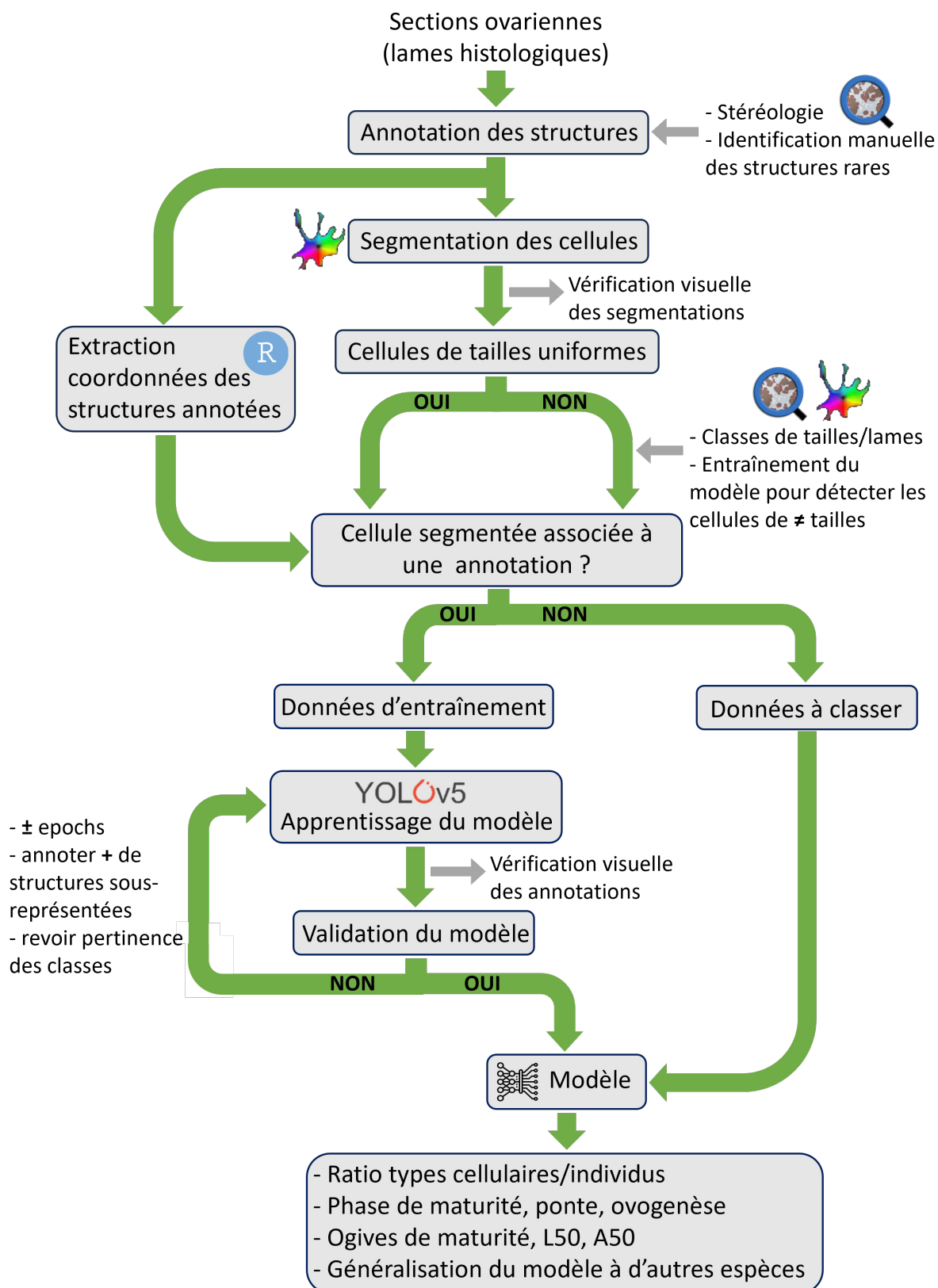


FIGURE 4.3 – Schéma de synthèse de la méthodologie proposée pour l'identification automatique des structures ovariennes chez les téléostéens

Conclusion et perspectives

«Les grandes découvertes impliquent
constamment la coopération de nombreux esprits.»

Alexander Graham Bell

Ce travail avait pour objectif principal de déterminer des critères objectifs permettant d'estimer la maturité sexuelle de quatre espèces de téléostéens : la plie (*Pleuronectes platessa*), le rouget barbet de roche (*Mullus surmuletus*), la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*) et la cardine à quatre taches (*Lepidorhombus boscii*). La collecte de paramètres biologiques (masse, longueur totale, maturité sexuelle et âge du poisson) ainsi que le prélèvement, la pesée et la prise de photographies des ovaires ont permis la mise en place et la comparaison de procédures de détermination de la phase de maturité au niveau individuel, le calcul d'indicateurs populationnels utilisés pour la gestion des stocks (L_{50} et A_{50}), ainsi que l'automatisation des lectures stéréologiques (Tableau 5.1). Les travaux associés incluent un protocole de prise de photographies, les fiches d'aides à l'identification de la phase de maturité par critères macroscopiques, les protocoles d'échantillonnage en histologie et en stéréologie, ainsi que des lexiques descriptifs des cellules de la lignée germinale femelle pour chaque espèce.

Ces travaux ont permis de mettre à jour des données biologiques pour les espèces décrites. Ils soulignent également les incertitudes qui existent dans la détermination de la maturité sexuelle des poissons sur la seule base de critères macroscopiques. La subjectivité dans leur appréciation entraîne des erreurs de classements pour certaines phases. L'approche stéréologique permet quant à elle d'objectiver la détermination mais reste longue à mettre en oeuvre et comporte également certains écueils. Son automatisation par apprentissage supervisé décrit dans cette thèse réduit considérablement le temps de mise en oeuvre et supprime les biais entre agents.

TABLEAU 5.1 – Tableau récapitulatif des différentes études réalisées sur 4 espèces, le rouget barbet de roche (*Mullus surmuletus*), la plie (*Pleuronectes platessa*), la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*) et la cardine à quatre taches (*Lepidorhombus boscii*)

	Rouget barbet de roche	Plie	Cardine franche	Cardine à quatre taches
Histologie	X	X	X	X
Stéréologie	X	X	X	
Apprentissage automatique			X	

Au delà du calcul des paramètres d'intérêts pour ces quatre espèces, ce travail démontre aussi l'importance du plan d'échantillonnage à mettre en oeuvre pour collecter les individus supportant la détermination de la maturité. Il propose un ensemble de protocoles normés et testés dans un cadre pluri-spécifique, qui facilitent et encadrent la détermination des phases de maturité. Par ailleurs, la précision de la stéréologie confirme que cet outil est efficace pour assurer la détermination objective des phases, et que son couplage à une procédure de lecture automatisée est indispensable pour une utilisation dans le cadre d'un suivi régulier. Enfin, les procédures présentées dans ce manuscrit ont pour

but d'être généralisées à d'autres espèces, en prenant en compte les éléments présentés ci-dessous.

Nous avons vu qu'un échantillonnage adapté doit être réalisé pour garantir la capture d'individus matures et immatures pour l'obtention de données permettant le calcul de la L_{50} et du A_{50} . L'échantillonnage mensuelle de 15 individus est suffisante pour la vérification de l'homogénéité, mais cet effectif peut être adapté en fonction du nombre de classes de taille d'individus récoltés. Un plan d'échantillonnage incluant l'ensemble des gammes de longueur présentes dans la population, notamment pour les espèces au cycle de reproduction peu décrit, assure l'obtention et donc l'analyse d'individus immatures et matures. Il s'agira en particulier de prendre en compte les individus dont les longueurs se situent à la transition entre les états immatures et matures. De plus, dans le cas où des événements de ponte sont associés à des longueurs différentes, cet élément devra permettre d'identifier plus précisément la période de ponte.

Pour une première analyse d'une espèce, un suivi annuel permet d'obtenir des informations nécessaires à la détermination de la maturité, telles que :

- ✧ la saison de reproduction : temps durant lequel le développement cellulaire gonadique est en plein essor, avec maturation des cellules de la lignée germinale (présence de **vtg** chez les femelles) jusqu'à l'émission des gamètes (et la résorption des **POF** chez les femelles). Pour les espèces tropicales, la saison de reproduction peut couvrir l'ensemble de l'année.
- ✧ la période de la ponte : période durant laquelle les gamètes sont émis lors d'un événement de ponte unique (*total spawner*) ou multiple (*batch spawner*).
- ✧ la dynamique de l'ovogenèse : pour les espèces qui se reproduisent au moins une fois par an, cela permet l'observation du cycle complet de l'ovogenèse et la détermination du type de développement gonadique (synchrone, asynchrone ou groupe synchrone). Le temps d'étude devra bien sûr être adapté si le développement se fait sur une période supérieure à un an (comme par exemple pour le flétan du Groenland, *Reinhardtius hippoglossoides*).
- ✧ la validation par l'histologie des critères macroscopiques d'identification des phases de maturité.

Pour les espèces présentant des phases de maturité courtes, telle que la phase de régression/régénération (D) chez le rouget barbet de roche qui ne dure qu'un mois, ou pour les espèces dites *total spawner* qui émettent leurs ovocytes lors d'un seul événement de ponte, un échantillonnage mensuel peut être insuffisant. En contrepartie, si les données de l'espèce à l'étude le permettent et que la saison de reproduction est connue, un suivi plus court peut alors être réalisé. D'après nos résultats, initier l'échantillonnage 3 mois avant la période de ponte assure l'obtention d'individus femelles avec des ovocytes secondaires

(**cao** et en début de vitellogenèse) qui permettront de séparer les individus immatures des individus matures. Les prélèvements pourront ensuite s'arrêter 1 mois après la fin de la ponte. Il est à noter qu'un échantillonnage sur un temps plus court doit comporter l'acquisition d'un nombre suffisant d'individus (de longueurs et d'âges variés de surcroît) pour supporter l'estimation de métriques au niveau de la population telles que la L_{50} et l' A_{50} . De plus, si l'étude vise aussi les mâles, il faut prendre en compte le fait que leur cycle de reproduction peut débuter et ou se terminer en décalage par rapport à celui des femelles.

Dans le cadre d'études d'espèces soumises à une longueur minimale de capture, les prélèvements lors de campagnes scientifiques permettent l'accès aux individus en dessous de ces longueurs minimales. Si les campagnes halieutiques n'opèrent pas sur les zones d'études lors de la période d'échantillonnage prévue, l'échantillonnage devra s'appuyer sur un approvisionnement en individus issus des captures commerciales.

Le travail présenté au travers de ces pages peut être encore amélioré. Par exemple, l'analyse du développement cellulaire pourrait prendre en compte les longueurs des individus, et non leurs phases de maturité, ce, afin de vérifier si des différences sont observées entre groupes de tailles (période de ponte ou ratios des types cellulaires à une même période). Il serait aussi possible d'explorer davantage de critères macroscopiques, autre que l'**IGS** et les âges/longueurs, sur les individus récoltés lors des saisons de reproduction pour les relier aux phases de maturité. Enfin, il est à noter que les lames histologiques acquises pour *Lepidorhombus boscii* n'ont pas été traitées. Malgré le faible nombre échantillonné, il serait possible de les analyser par stéréologie pour vérifier l'homogénéité cellulaire et classer les individus dans une phase de maturité. Si les effectifs d'individus immatures et matures sont suffisants, une première estimation d'une longueur et d'un âge à première maturité pourra être calculé. Ces données seront dans tous les cas mises à disposition sur la plateforme de partage de données Zenodo.

Dans le cadre de l'étude utilisant l'apprentissage supervisé, une suite possible de ces travaux devrait inclure l'amélioration de la base de données d'apprentissage en ajoutant les structures sous-représentées pour parfaire les entraînements du modèle de segmentation (prise en compte des écarts de diamètres des ovocytes) et du modèle de classement des structures cellulaires. La méthodologie présentée pourra être ainsi appliquée aux autres espèces suivies dans ce travail (*M. surmuletus* et *P. platessa*), afin de tester l'algorithme sur des ovaires présentant des schémas organisationnels différents, dans le but d'évaluer la possibilité de généraliser cette approche à d'autres espèces.

À plus long terme, les travaux initiés par le projet *MATurité Objective des poissons par l'histologie quantitative (MATO)* ont pour objectif de proposer des outils et procédures de suivi dans le domaine de l'halieutique pluri-spécifique. La prise de la donnée relative à

la maturité est le plus souvent délaissée pour l'âge, avec des ogives de maturité présentées en fonction de l'âge des individus. Or, de nombreuses mesures de gestion de la pêche portent sur la longueur pour la majorité des espèces. Renseigner la maturité devrait non seulement être une priorité dans les plans d'échantillonnages, mais devrait aussi bénéficier d'amélioration dans les techniques et outils pour assurer des mesures de maturité les plus fiables possibles.

Parmi les méthodes utilisées pour déterminer la phase de maturité d'un individu, la méthode la plus commune en halieutique est l'estimation visuelle à partir de paramètres macroscopiques. Elle permet l'analyse à coût réduit d'un grand nombre d'individus lors des campagnes en mer ou de l'échantillonnage sur les captures commerciales, cadre dans lequel plusieurs centaines de kilos de poisson peuvent être traités quotidiennement, incluant la prise de paramètres biologiques par espèce. Les fiches d'aides à l'identification de ces critères (validées préalablement par l'histologie) avec des photographies de bonne qualité et des échelles simplifiées et claires constituent un support essentiel pour réduire les erreurs de détermination. Pour le calcul des ogives de maturité, il est à noter que la seule information requise, relative à la maturité, est la possibilité des individus à participer ou non à la saison de reproduction en cours. Dans ce cadre, il serait donc possible de simplifier les critères en constituant seulement deux classes (mature et immature). Enfin, il est à noter que le développement de la gonade est continu et l'identification d'une phase de maturité pour un individu en transition entre deux phases comportera toujours une part d'incertitude. L'utilisation de l'histologie dans ce cadre permet de lever cette incertitude.

L'histologie quantitative, ou stéréologie, apporte non seulement un ensemble de données qui améliore les connaissances du développement gonadique des espèces, mais renseigne aussi l'effort de reproduction. Une étude en stéréologie sur quelques espèces, tous les 3 à 5 ans, en parallèle du suivi macroscopique, permettrait une mise à jour des ogives de maturité basée sur des critères plus objectifs que les critères macroscopiques. L'étude stéréologique pourra être couplée à l'[Intelligence Artificielle](#), avec la mise en place d'un modèle d'identification automatisée des types cellulaires, afin d'accélérer le processus de lecture, d'alléger le travail d'analyse des données et d'assurer sa reproductibilité. Les outils et algorithmes de *machine learning* sont de plus en plus accessibles et adaptés pour entraîner les modèles sur des bases de données dédiées. En travaillant sur la phase d'entraînement, il devrait être possible de développer des modèles de plus en plus performants et adaptés à un grand nombre d'espèces. Au-delà de l'estimation de la maturité individuelle, cette approche devrait permettre d'établir en routine des estimations de la fécondité individuelle, et donc de renseigner plus précisément le devenir reproductif d'un stock soumis à une pression de pêche.

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse participent à l'estimation fiable de la maturité sexuelle individuelle, dans un cadre halieutique. Cette fiabilité est essentielle pour appréhender les mécanismes en jeu dans l'exploitation des ressources naturelles et assurer sa durabilité, mais aussi pour alimenter les observations visant à mieux comprendre la théorie des traits d'histoire de vie et leurs influences sur la dynamique des populations marines. La généralisation de l'approche déployée ici est possible grâce à l'ensemble des procédures, des documents et des travaux publiés. D'une manière fortuite, ce manuscrit répond aussi parfaitement aux besoins européens actuels en halieutique dans le domaine de l'estimation de la maturité : la feuille de route 2024 - 2026 du groupe de travail du [CIEM](#) dédié à ces questions ([WGBIOP](#), écriture en cours d'élaboration, Dubroca, *com. pers.*) contient l'ensemble des éléments développés ici.

Autres activités en lien avec la formation doctorale, l'enseignement, la vulgarisation, la diffusion des résultats auprès des organisations professionnelles

Comités de Thèse

Trois comités de thèse ont eu lieu pendant la thèse, réunissant les acteurs du projet et en particulier des différents partenaires du projet **MATO** financé par *France Filière Pêche* (FFP)

Décembre 2020 Définition des attendus pour la communication avec les professionnels de la pêche :

- ✧ Favoriser les supports numériques
- ✧ Favoriser les fiches synthétiques
- ✧ Vulgariser l'information et toujours définir/redéfinir les termes scientifiques
- ✧ Mettre en place un site qui centralise toutes les informations/publications/résultats du projet
- ✧ Mettre en place des vidéos courtes montrant la méthodologie utilisée, expliquer le rôle de la maturité dans la gestion des stocks, répondre à 5 questions sur le projet **MATO**.

Janvier 2021 Présentation des méthodologies et des données acquises. Mise en place d'un Blog pour que les partenaires suivent les avancées <https://fishmaturity.wordpress.com/>

Autres activités en lien avec la formation doctorale, l'enseignement, la vulgarisation, la diffusion des résultats auprès des organisations professionnelles

Janvier 2022 Présentation des résultats pour les quatre espèces du projet (*Mullus surmuletus*, *Lepidorhombus whiffiagonis*, *Lepidorhombus boscii* et *Micromesistius poutassou*).

Participations à des colloques et congrès - présentations

Septembre 2021 World Fisheries Congress 2021 (Adelaide en visio-conférence). Présentation orale : « Turning a time consuming process into a few coded lines : How deep learning can shorten histology slide readings for maturity staging » https://youtu.be/f_f7Az43_04?si=u4B9qAY1aNZtLc88.

Novembre 2021 EVOLECO (La Rochelle en présentiel). Présentation orale : « Séries historiques des traits d'histoire de vie des populations halieutiques : un exemple utilisant la maturité sexuelle d'une espèce de rouget dans les zones de pêche française ».

Juillet 2022 Colloque de l'Association Française de l'Halieutique (Brest en présentiel). Mise en place et co-animation d'un Atelier sur la maturité sexuelle des poissons par l'histologie quantitative.

Septembre 2022 Workshop Imaginecology 2 (Lyon en présentiel). Participation au workshop sur l'analyse d'image et application de modèles en *Machine learning* en écologie, présidé par V. Miele.

Octobre 2022 Journées Manche-Mer du Nord (Cherbourg en présentiel). Présentation orale des résultats sur les lectures des lames de rougets barbet de roche aux collègues de l'[Ifremer](#) en Manche Mer du Nord.

Octobre 2023 3^{ème} Congrès des Sciences Aquatiques (Saint Pierre et Miquelon en présentiel). Présentation orale : « L'histologie, la stéréologie et l'intelligence artificielle : une histoire de maturité ». Co-chair pour la session **Biodiversité Aquatique**.

Implications dans le CIEM

Octobre 2020 Participation au *Working Group on BIOlogical Parameters (WGBIOP)* 2020 du *Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM)*. Échange sur la détermination de la maturité chez la plie (*Pleuronectes platessa*) effectué sous SmartDots ([SmartDots Maturity Manual.pdf](#)) et dont les images utilisées provenaient en partie de la base de données déposée sur Zenodo par SAUGER et al. (2020).

Autres activités en lien avec la formation doctorale, l'enseignement, la vulgarisation, la diffusion des résultats auprès des organisations professionnelles

Octobre 2021 Campagne de promotion des *Early Career Scientists* : Publication par le *Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM)* d'une vidéo présentant mes travaux. <https://youtu.be/MsT11kl3Rbo>.

Septembre 2023 Annual Science Conference du *CIEM* (Bilbao en présentiel). Présentation orale : « Maturity and Stereology, relationship status : It's complicated » <https://youtu.be/pA6FnSFaqnM>

Co-encadrements

Septembre 2021 Co-encadrement de 1 an, avec L. Dubroca, de A. Le Meleder, technicienne en contrat à durée déterminée sur le thème de la maturité.

Février 2022 Co-encadrement de 5 mois, avec L. Dubroca, de V. Martin. Stage de Master 2 - projet *ACOST* « Comparaison des méthodes de détermination de la maturité sexuelle - Étude des liens entre l'environnement, l'exploitation et la maturité sexuelle du rouget barbet de roche femelle (*Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758) ».



FIGURE 6.4 – Extraction d'ovaires de *Mullus surmuletus*

Mars 2023 Co-encadrement de 7 mois, avec L. Dubroca, de A. Le Meleder, technicienne en contrat à durée déterminée sur le thème de la maturité.

Parlons Maturité à l'Ifremer

Mars 2021 Demande d'une mise aux normes de la nouvelle nomenclature (ABCDEF) pour les clés de maturité utilisées en campagnes, avec priorité pour les campagnes en Atlantique. Demande d'information sur la nouvelle nomenclature avec présentation de l'échelle WKSMSF aux chefs de campagnes. Des référents pour la maturité doivent être choisis dans les différents sites *Ifremer*, aussi bien pour les prélèvements en mer (campagnes) que sur terre (paramètres biologiques > SIH).

Septembre 2021 Présentation et explication de l'échelle *CIEM* (2018) pour le projet *ACquisition de COnnaisances sur les paramètres BIologiques des ressources marines*

Autres activités en lien avec la formation doctorale, l'enseignement, la vulgarisation, la diffusion des résultats auprès des organisations professionnelles

exploitées en Outre-Mer (Accobiom). Les correspondances entre l'échelle utilisée actuellement à l'Ifremer de la Réunion (et dans les DOM/TOM) et celle du **CIEM** ont été établies.

Avril 2023 Mise en place d'un laboratoire histologique à la station **Ifremer** de Port-en-Bessin, sous la direction de L. Dubroca, et S. Parrad. Mise en place d'un protocole d'extraction et de préparation de lames histologiques pour les gonades de différentes espèces (*Solea solea*, *Argyrosomus regius*, *Pleuronectes platessa* et *Mytilus edulis*) <https://doi.org/10.13155/96087>)

Formations doctorales - formation à l'enseignement

- ✧ Enseignements L1 - Biologie végétale et mycologie TP (51h)
- ✧ Enseignements L1 - Biologie végétale et mycologie TD (20h)
- ✧ Voix, corps et communication
- ✧ Règles et usages rédaction d'un papier scientifique
- ✧ Lecture rapide
- ✧ Formation Dynamiser ses présentations
- ✧ Intégrité scientifique, éthique et déontologie
- ✧ Médiation et présentation de sujet de thèse
- ✧ Procédure de gestion des conflits d'intérêts de l'Ifremer en lien avec les risques d'atteinte à la probité
- ✧ Recherche bibliographique et veille
- ✧ Formation Gestes et Posture
- ✧ Qualification sécurité en laboratoire (NEO)
- ✧ Maniement extincteurs
- ✧ Doctoriales **Ifremer**

Miscellaneous

Juin 2023 Analyse par échographie de la gonade de 15 plies femelles et 2 plies mâles. Les gonades ont été ensuite disséquées pour la réalisation

Autres activités en lien avec la formation doctorale, l'enseignement, la vulgarisation, la diffusion des résultats auprès des organisations professionnelles

de lames histologiques, afin de relier les phases de maturité aux images d'échographies.

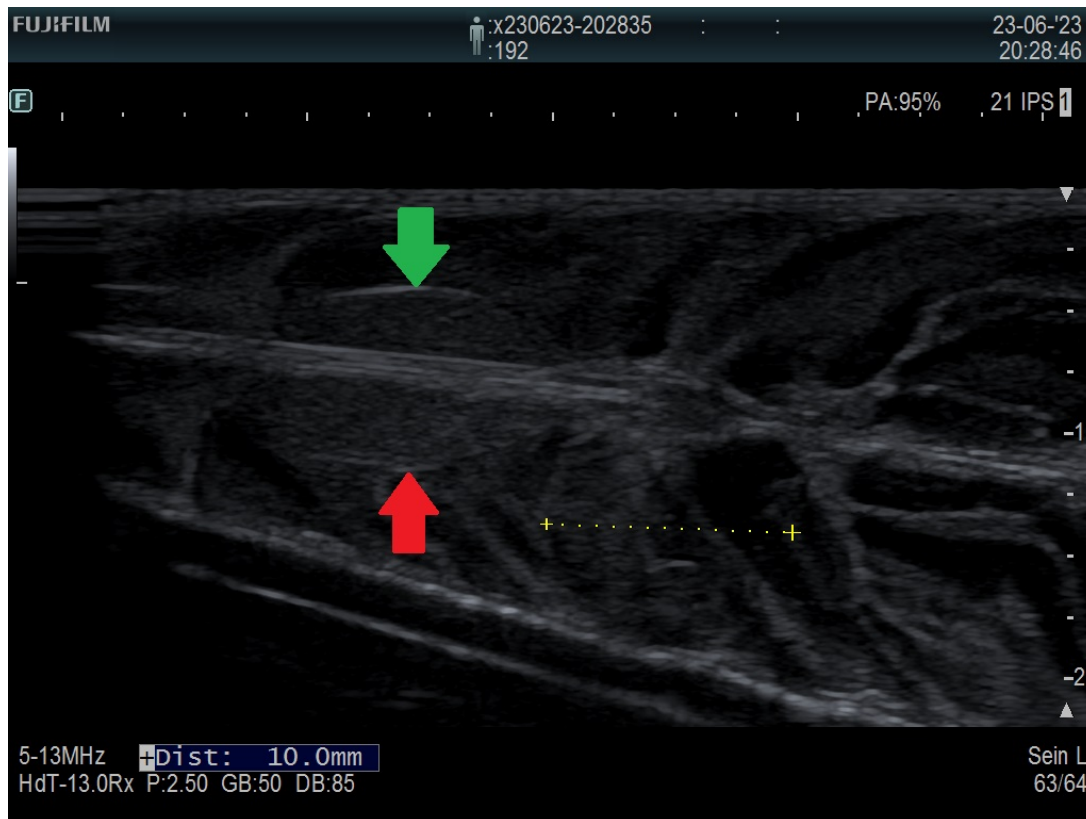


FIGURE 6.5 – Échographie transversale d'ovaire de plie (*Pleuronectes platessa*) avec flèche verte : ovaire ventrale; flèche rouge : ovaire dorsale

Bibliographie

- AGRAWAL, A. A. (2001). « Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species ». *Science* 294, p. 321-326. DOI : [10.1126/science.1060701](https://doi.org/10.1126/science.1060701) (cf. p. 16).
- ALVAREZ-FARIÑA, P., O. GALLI, W. NORBIS et P. PRESA (2015). « Stereological Quantifying Oocytes and its Application to the Argentine Hake *Merluccius hubbsi* (Merlucciidae, Marini, 1933) ». *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay* 24, p. 1-10 (cf. p. 87).
- ARAGÓN, L., G. ARANDA, A. SANTOS et A. MEDINA (2010). « Quantification of ovarian follicles in bluefin tuna *Thunnus thynnus* by two stereological methods ». *Journal of Fish Biology* 77, p. 719-730. DOI : [10.1111/j.1095-8649.2010.02713.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02713.x) (cf. p. 85).
- ARANDA, G., L. ARAGÓN, A. CORRIERO, C. C. MYLONAS, F. de la GÁNDARA, A. BELMONTE et A. MEDINA (2011). « GnRH α -induced spawning in cage-reared Atlantic bluefin tuna : An evaluation using stereological quantification of ovarian post-ovulatory follicles ». *Aquaculture* 317, p. 255-259. DOI : [10.1016/j.aquaculture.2011.04.030](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.030) (cf. p. 83, 86).
- BADDELEY, A. et E. B. VEDEL JENSEN (2004). *Stereology for Statisticians*. Taylor & Francis Group, LLC (cf. p. 81, 125).
- BAIDAI, Y, L. DAGORN, M. J. AMANDE, D. GAERTNER et M. CAPELLO (2020). « Machine learning for characterizing tropical tuna aggregations under Drifting Fish Aggregating Devices (DFADs) from commercial echosounder buoys data ». *Fisheries Research* 229, p. 1-9. DOI : [10.1016/j.fishres.2020.105613](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2020.105613) (cf. p. 238).
- BANKHEAD, P., M. B. LOUGHREY, J. A. FERNÁNDEZ, Y. DOMBROWSKI, D. G. MCART, P. D. DUNNE, S. MCQUAID, R. T. GRAY, L. J. MURRAY, H. G. COLEMAN, J. A. JAMES, M. SALTO-TELLEZ et P. W. HAMILTON (2017). « QuPath : Open source software for digital pathology image analysis ». *Scientific Reports* 7, p. 1-7. DOI : [10.1038/s41598-017-17204-5](https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5) (cf. p. 96, 126, 241).
- BARR, W.A. (1963a). « The endocrine control of the sexual cycle in the Plaice, *Pleuronectes platessa* (L). I. Cyclical changes in the normal ovary ». *General and Comparative Endocrinology* 3, p. 197-204 (cf. p. 125, 127).
- BARR, W.A. (1963b). « The endocrine control of the sexual cycle in the Plaice, *Pleuronectes platessa* (L). II The endocrine Control of Oogenesis ». *General and Comparative Endocrinology* 3, p. 205-215 (cf. p. 125).
- BARR, W.A. (1963c). « The Endocrine Control of the Sexual Cycle in the Plaice, *Pleuronedes platessa* (L). III. The Endocrine Control of Spermatogenesis ». *General and Comparative Endocrinology* 3, p. 216-225 (cf. p. 125).
- BEDFORD, B. C. (1983). « A method for preparing sections of large numbers of otoliths embedded in black polyester resin ». *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer* 41, p. 4-12 (cf. p. 238).
- BENSON, I. M., T. E. HELSER, G. MARCHETTI et B. K. BARNETT (2023). « The future of fish age estimation : deep machine learning coupled with Fourier transform near-infrared spectroscopy of otoliths ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 80, p. 1482-1494. DOI : [10.1139/cjfas-2023-0045](https://doi.org/10.1139/cjfas-2023-0045) (cf. p. 238).
- BENZINOU, A., S. CARBINI, K. NASREDDINE, R. ELLEBOODE et K. MAHÉ (2013). « Discriminating stocks of striped red mullet (*Mullus surmuletus*) in the Northwest European seas using three automatic shape classification methods ». *Fisheries Research* 143, p. 153-160. DOI : [10.1016/j.fishres.2013.01.015](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.01.015) (cf. p. 64).

- BERTHELIN, C., L. DUBROCA, K. KELLNER, A. LE MELEDER, V. MARTIN et C. SAUGER (2023). « Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the striped red mullet, *Mullus surmuletus* (Linnaeus, 1758) ». *IFREMER*, p. 1-33. DOI : [10.13155/75174](https://doi.org/10.13155/75174).
- BEVERTON, R. J. H. et S. J. HOLT (1993). *On the Dynamics of Exploited Fish Populations*. Dordrecht : Springer Netherlands. DOI : [10.1007/978-94-011-2106-4](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2106-4). URL : <http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-2106-4> (visité le 14/06/2023) (cf. p. 8).
- BICHAT, X. (1801). *Anatomie générale appliquée à la physiologie et à la médecine*. Brosson. Paris, France (cf. p. 77).
- BISEAU, A. (2021). *Résumé graphique des diagnostics et avis émis par le CIEM en 2021*. URL : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00742/85433/90493.pdf> (visité le 18/11/2023) (cf. p. 7).
- BISWAS, S., S. GHOSH, U. MUKHERJEE, A. SAMANTA, S. DAS et S. MAITRA (2021). « Hormonally Active Agents : A Menace for Oogenesis and Fertility in Teleosts ». *Recent updates in molecular Endocrinology and Reproductive Physiology of Fish*. Singapore : Springer Nature. URL : https://doi.org/10.1007/978-981-15-8369-8_19 (cf. p. 22, 27).
- BOOIS, I. J. de, G. BURT, J.-B. LECOMTE, F. MASNADI, K. PANTEN, H. RAAT, G. M. SIGUROSSON et M. THORLACIUS (2023). *ICES Survey Protocols – Offshore Beam Trawl Surveys, Coordinated by Working group on Beam Trawl Surveys (WGBEAM)*. Rapp. tech. 69. International Council for the Exploration of the Sea, 80 pp. URL : https://ices-library.figshare.com/articles/report/ICES_Survey_Protocols_Offshore_Beam_Trawl_Surveys_Coordinated_by_Working_group_on_Beam_Trawl_Surveys_WGBEAM_/21603336 (cf. p. 10, 33).
- BORISOV, V. M. (1978). « The selective effect of fishing on the population structure of species with a long life cycle ». *Journal of Ichthyology* 18, p. 896-904 (cf. p. 16, 17).
- BOUAIN, A. et Y. SIAU (1988). « A new technique for staining fish otoliths for age determination ». *Journal of Fish Biology* 32, p. 977-978 (cf. p. 238).
- BOYCE, R. W., K.-A. DORPH-PETERSEN, L. LYCK et H. J. G. GUNDERSEN (2010). « Design-based Stereology : Introduction to Basic Concepts and Practical Approaches for Estimation of Cell Number ». *Toxicologic Pathology* 38, p. 1011-1025. DOI : [10.1177/0192623310385140](https://doi.org/10.1177/0192623310385140) (cf. p. 80, 81, 86, 93).
- BROMAGE, N., M. PORTER et C. RANDALL (2001). « The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin ». *Aquaculture* 197, p. 63-98 (cf. p. 15, 16).
- BROMLEY, P. J. (2000). « Growth, sexual maturation and spawning in central North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.), and the generation of maturity ogives from commercial catch data ». *Journal of Sea Research*. Elsevier 44, p. 27-43. DOI : [10.1016/S1385-1101\(00\)00043-5](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(00)00043-5) (cf. p. 67, 128).
- BROWN-PETERSON, N. J., D. M. WYANSKI, F. SABORIDO-REY, B. J. MACEWICZ et S. K. LOWERRE-BARBIERI (2011). « A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes ». *Marine and Coastal Fisheries : Dynamics, Management, and Ecosystem Science* 3, p. 52-70. DOI : [10.1080/19425120.2011.555724](https://doi.org/10.1080/19425120.2011.555724) (cf. p. 9, 34, 75, 76, 99, 124, 130).
- BRULE, T. (1987). « The reproductive biology and the pathological changes of the plaice *Pleuronectes platessa* (L.) after the ‘Amoco Cadiz’ oil spill along the north-west coast of Brittany ». *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 67, p. 237-247. DOI : [10.1017/S0025315400026564](https://doi.org/10.1017/S0025315400026564) (cf. p. 36, 125).
- BUCHOLTZ, R. H., J. TOMKIEWICZ, J. R. NYENGAARD et J. B. ANDERSEN (2013). « Oogenesis, fecundity and condition of Baltic herring (*Clupea harengus* L.) : A stereological study ». *Fisheries Research* 145, p. 100-113. DOI : [10.1016/j.fishres.2013.02.003](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.02.003) (cf. p. 82, 83, 86, 129).
- BURCHARD, K. A., F. JUANES, R. A. ROUNTREE et W. A. ROUMILLAT (2013). « Staging ovaries of Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) : implications for maturity indices and field sampling practices ». *Fishery Bulletin* 111, p. 90-106. DOI : [10.7755/FB.111.1.8](https://doi.org/10.7755/FB.111.1.8) (cf. p. 130).
- CASTILHO, R., M. T. DINIS et K. ERZINI (1993). « Age and growth of megrim *Lepidorhombus boscii*, Risso of the Portuguese continental coast ». *Fisheries Research* 16, p. 339-346. DOI : [10.1016/0165-7836\(93\)90145-W](https://doi.org/10.1016/0165-7836(93)90145-W) (cf. p. 47, 63, 67).
- CENGIZ, O., U. OZEKINCI, A. ISMEN et A. OZTEKIN (2013). « Age and growth of four-spotted megrim (*Lepidorhombus boscii* Risso, 1810) from Saros Bay (Northern Aegean Sea, Turkey) ». *Mediterranean Marine Science* 14, p. 36-44. DOI : [10.12681/mms.328](https://doi.org/10.12681/mms.328) (cf. p. 47, 67).
- CERDÀ, J., F. MERCEDES et R. DEMETRIO (2007). « Chapter 12 : Physiological and molecular basis of fish oocyte hydration ». *The Fish Oocyte*. Sous la dir. de P. J. BABIN, J. CERDÀ et E. LUBZENS.

- Dordrecht : Springer, p. 349-396. URL : https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6235-3_12 (cf. p. 26).
- CHALKLEY, H. W. (1943). « Method for the quantitative morphologic analysis of tissues ». *Journal of the National Cancer Institute* 4, p. 47-53 (cf. p. 79).
- CHALKLEY, H. W., J. CORNFIELD et H. PARK (1949). « A method for estimating volume-surface ratios ». *Science* 110, p. 295-297 (cf. p. 79).
- CHEN, D. G. et D. M. WARE (1999). « A neural network model for forecasting fish stock recruitment ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, p. 2385-2396 (cf. p. 239).
- CHOLLET, F. et J. J. ALLAIRE (2018). *Deep learning with R*. Shelter Island, NY : Manning (cf. p. 233, 235, 236).
- CHRISTENSEN, J. M. (1964). « Burning of Otoliths, a Technique for Age Determination of Soles and Other Fish ». *ICES Journal of Marine Science* 29, p. 73-81 (cf. p. 238).
- CLARK, F. M. (1934). « Maturity of the California sardine (*Sardina caerulea*), determined by ova diameter measurements ». *California Department of Fish and Game Fish Bulletin* 42, p. 1-49 (cf. p. 11).
- COBRENORD (2023). *L'évaluation des stocks*. URL : <https://www.cobrenord.com/evaluation-des-stocks/> (visité le 18/11/2023) (cf. p. 7).
- COMMISSION~EUROPÉENNE (2023). *Food, Farming, Fisheries*. URL : https://oceans-and-fisheries.ec.europa.eu/index_en (visité le 15/10/2023) (cf. p. 3).
- CONGER, A. J. (1980). « Integration and Generalization of Kappas for Multiple Raters ». *Psychological Bulletin* 88, p. 322-328 (cf. p. 98).
- COOPER, D. W., K. E. PEARSON et D. R. GUNDERSON (2005). « Fecundity of shortspine thornyhead (*Sebastolobus alascanus*) and longspine thornyhead (*S. altivelis*) (Scorpaenidae) from the northeastern Pacific Ocean, determined by stereological and gravimetric techniques ». *Fishery Bulletin* 103, p. 15-22. URL : <https://aquadocs.org/handle/1834/26245> (cf. p. 82, 85).
- COSTA, E. F. S., J. F. DIAS et H. MURUA (2016). « Closely Related Fishes Inhabiting Different Ecosystems Exhibit the Same Oocyte Production and Recruitment Pattern ». *The Biological Bulletin* 230, p. 96-109. DOI : [10.1086/BBLv230n2p96](https://doi.org/10.1086/BBLv230n2p96) (cf. p. 82, 87).
- COWARD, K. et N. R. BROMAGE (1998). « Histological classification of oocyte growth and the dynamics of ovarian recrudescence in *Tilapia zillii* ». *Journal of Fish Biology* 53, p. 285-302. DOI : [10.1111/j.1095-8649.1998.tb00981.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb00981.x) (cf. p. 84).
- COWARD, K. et N. R. BROMAGE (2001). « Stereological validation of ovarian biopsy as a means of investigating ovarian condition in broodstock tilapia in vivo ». *Aquaculture* 195, p. 183-188. DOI : [10.1016/S0044-8486\(00\)00544-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00544-5) (cf. p. 84).
- COWARD, K. et N. R. BROMAGE (2002a). « Quantification of ovarian condition in fish : a safer, more precise alternative to established methodology ». *Aquatic Living Resources* 15, p. 259-261. DOI : [10.1016/S0990-7440\(02\)01177-4](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(02)01177-4) (cf. p. 84).
- COWARD, K. et N. R. BROMAGE (2002b). « Stereological point-counting ; an accurate method for assessing ovarian function in tilapia ». *Aquaculture* 212, p. 383-401. DOI : [10.1016/S0044-8486\(02\)00051-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00051-0) (cf. p. 84).
- CRUZ-ORIVE, L. M. (2017). « Stereology : A Historical Survey ». *Image Analysis & Stereology* 36, p. 1-153. DOI : [10.5566/ias.1767](https://doi.org/10.5566/ias.1767) (cf. p. 80, 81).
- CRUZ-CASTÁN, R., S. SABER, C. MEINERS-MANDUJANO, M. J. G. VIVES, S. CURIEL-RAMIREZ, G. GALINDO-CORTES et D. MACÍAS (2023). « Oocyte dynamics for Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the southern Gulf of Mexico : a comparative assessment with Mediterranean spawners by two stereological methods ». *Journal of Fish Biology*, p. 1-19. DOI : [10.1111/jfb.15504](https://doi.org/10.1111/jfb.15504) (cf. p. 88).
- CUTLER, K. J., C. STRINGER, T. W. LO, L. RAPPEZ, N. STROUSTRUP, S. BROOK PETERSON, P. A. WIGGINS et J. D. MOUGOUS (2022). « Omnipose : a high-precision morphology-independent solution for bacterial cell segmentation ». *Nature Methods* 19, p. 1438-1448. DOI : [10.1038/s41592-022-01639-4](https://doi.org/10.1038/s41592-022-01639-4). URL : <https://www.nature.com/articles/s41592-022-01639-4> (visité le 06/07/2023) (cf. p. 241, 245).
- DANANCHER, D. et E. GARCIA-VAZQUEZ (2009). « Population differentiation in megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) and four spotted megrim (*Lepidorhombus boscii*) across Atlantic and Mediterranean waters and implications for wild stock management ». *Marine Biology* 156, p. 1869-1880. DOI : [10.1007/s00227-009-1219-9](https://doi.org/10.1007/s00227-009-1219-9) (cf. p. 45, 63).

- DAWES, B. (1930). « Growth and Maintenance in the Plaice (*Pleuronectes platessa* L.). Part I ». *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 17, p. 103-174. DOI : [10.1017/S002531540005181X](https://doi.org/10.1017/S002531540005181X) (cf. p. 36).
- DE VEEN, J. F. (1978). « On selective tidal transport in the migration of North Sea Plaice (*Pleuronectes platessa*) and other flatfish species ». *Netherlands Journal of Sea Research* 12, p. 115-147. DOI : [10.1016/0077-7579\(78\)90001-7](https://doi.org/10.1016/0077-7579(78)90001-7) (cf. p. 38).
- DE VLAMING, V., G. GROSSMAN et F. CHAPMAN (1982). « On the use of the gonosomatic index ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Physiology* 73, p. 31-39 (cf. p. 10, 68).
- DELESSE, M. A. (1847). « Procéde mécanique pour déterminer la composition des roches ». *Les Comptes Rendus de l'Académie des sciences* 25, p. 544-545 (cf. p. 79, 81, 88).
- DESBROSSES, P. (1933). « Contribution à la Connaissance de la Biologie du Rouget-barbet en Atlantique Nord. *Mullus barbatus* (rond) surmuletus (Fage) ». *Revue des Travaux de l'Office scient!fique et technique des Pêches* 8.4, p. 351-376 (cf. p. 41, 66, 128).
- DHILLON, R. S. et M. G. FOX (2004). « Growth-independent effects of temperature on age and size at maturity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) ». *Copeia* 2004, p. 37-45 (cf. p. 16).
- DIECKMANN, U. et M. HEINO (2007). « Probabilistic maturation reaction norms : their history, strengths, and limitations ». *Marine Ecology Progress Series* 335, p. 253-269. DOI : [10.3354/meps335253](https://doi.org/10.3354/meps335253) (cf. p. 17).
- DOMINGUEZ-PETIT, R., A. ANASTASOPOULOU, L. CUBILLOS, H. D. GERRITSEN, P. GONÇALVES, M. HIDALGO, J. KENNEDY, M. KORTA, G. MARTEINSDOTTIR, C MORGADO, M. MUÑOZ, I. QUINCOSES, M. SAINZA, A. THORSEN et F. VITALE (2017). « Chapter 3 : Maturity ». *Handboof of Applied Fisheries Reproductive Biology for Stock Assessment and Management*. Sous la dir. de R. DOMÍNGUEZ-PETIT, H. MURUA, F. SABORIDO-REY et E. TRIPPEL. Vigo, Spain : Digita CSIC, p. 4-47. URL : <http://hdl.handle.net/10261/87787> (cf. p. 18).
- DOMINGUEZ-PETIT, R., J. LANDA, J. C. FERNÁNDEZ et E. ABAD (2022). *Updated maturity parameters based on histology of megrim (Lepidorhombus whiffiagonis) and four spot megrim (L. boscii) stocks in Atlantic Iberian waters (Div. 8.c, 9.a) and in Celtic Seas (Div. 7.b-k)* (cf. p. 67, 130).
- DOMINGUEZ-PETIT, R., J. LANDA, J. C. FERNÁNDEZ, P. GUTIERREZ, E. ABAD, B. GARCIA et M. B. SANTOS (2018). *Maturity parameters of the megrim (Lepidorhombus whiffiagonis) and the four spot megrim (L. boscii) stocks in Atlantic Iberian waters (Div. 8.c-9.a) and in Celtic Seas and northern Bay of Biscay (Div. 7.b-k, 8.abd)*. Rapp. tech. International Council for the Exploration of the Sea, 11 pp. (Cf. p. 8, 45, 129).
- DOMÍNGUEZ-PETIT, R., M. SAÍNZA, L. SILVA et C. MORGADO (2009). *IV Workshop on Gonadal Histology of Fishes. Importance of histological information in the assessment of southern stock of Hake*. Powerpoint presentation. Cádiz (cf. p. 36).
- DOREL, D. (1986). « Poissons de l'Atlantique Nord-Est : Relations Taille-Poids ». *DRV-86-001/RH/NANTES*, p. 183. URL : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1289/> (cf. p. 41).
- DRINKWATER, K. F. et N. A. MCGINN (2002). « A Review of the Role of Climate Variability ». T. 32. Phoenix, Arizona : American Fisheries Society, p. 113-130 (cf. p. 16).
- DU BUIT, Marie Henriette (1992). « Alimentation de la Cardine, *Lepidorhombus whiffiagonis* en Mer Celtique ». *Cahiers de Biologie Marine* 33, p. 501-514 (cf. p. 44).
- DUBROCA, L., N. ELIE, C. HEUDE-BERTHELIN, K. KELLNER, A. LE MELEDER, M. LEPOITTEVIN, V. MARTIN, T. NIVET, C. SAUGER et N. VILLAIN-NAUD (2023a). « Stereology reading protocol when using quantitative histology for the determination of sexual maturity in fish ovaries ». *SIH*, p. 1-40. DOI : [10.13155/75173](https://doi.org/10.13155/75173) (cf. p. 224, 242).
- DUBROCA, L., N. ELIE, K. KELLNER, A. LE MELEDER, S. PARRAD, C. SAUGER et N. VILLAIN-NAUD (2023b). *Sample collection protocol for maturity staging of marine fish through histology*. Rapp. tech. Ifremer, p. 1-35. URL : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00849/96087/> (visité le 19/09/2023).
- EDWARDS, R. et J. H. STEELE (1968). « The Ecology of 0-Group Plaice and Common Dabs et Loch Ewe - I. Population and Food ». *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2, p. 215-238 (cf. p. 38).
- ELIAS, H. et D. M. HYDE (1980). « An elementary introduction to stereology (quantitative microscopy) ». *American Journal of Anatomy* 159, p. 411-446. DOI : [10.1002/aja.1001590407](https://doi.org/10.1002/aja.1001590407) (cf. p. 79, 81).
- EMERSON, L. S., M. G. WALKER et P. R. WITTHAMES (1990). « A stereological method for estimating fish fecundity ». *Journal of Fish Biology* 36, p. 721-730. DOI : [10.1111/j.1095-8649.1990.tb04326.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1990.tb04326.x) (cf. p. 82, 84, 86, 87, 244).

- ERNANDE, B., U. DIECKMANN et M. HEINO (2004). « Adaptive changes in harvested populations : plasticity and evolution of age and size at maturation ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences* 271, p. 415-423 (cf. p. 16).
- EUROPEAN UNION, The Council of the (2001). *Regulation 2001/724 - Amendment of Regulation (EC) No 850/98 for the conservation of fishery resources through technical measures for the protection of juveniles of marine organisms* (cf. p. 38).
- FAO (2022). *La Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2022. Vers une transformation bleue*. L'Etat du Monde. Rome : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. URL : <https://doi.org/10.4060/cc0461fr> (cf. p. 3, 8).
- FAO (2023a). *À propos de la FAO*. URL : <https://www.fao.org/about/about-fao/fr/> (visité le 17/11/2023) (cf. p. 3).
- FAO (2023b). *FAO Fisheries and Aquaculture Department. CWP Data Collection*. URL : https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/fishing-areas/fao-area-27_en (cf. p. 4).
- FEIDANTISIS, K., A. NTOUKOU et B. MICHAELIDIS (2020). « Effect of Seasonality on Oocyte Growth, Oocyte Maturity Stages, and Reproductive Capacity in the Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) in Relation with depth ». *Acta Veterinaria Eurasia* 46, p. 87-98. DOI : 10.5152/actavet.2020.20005 (cf. p. 82, 88).
- FERNANDES-SALVADOR, J. A., G. A. OANTA, A. OLIVERT-AMADO, I. GOIENETXEA, L. IBAIBARRIAGA, M. ARANDA, E. CUENDE, G. FOTI, I. OLABARRIETA, J. MURUA, R. PRELLEZO, B. IÑARRA, I. QUINCOSES, A. CABALLERO et J. M. SOBRINO-HEREDIA (2022). *Research for PECH Committee : Artificial Intelligence and the fisheries sector*. Rapp. tech. European Parliament, Policy Department for Structural et Cohesion Policies, Brussels, p. 1-104. URL : [http://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document/IPOL_STU\(2022\)699643](http://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document/IPOL_STU(2022)699643) (cf. p. 239).
- FLORES, A., R. WIFF et E. DÍAZ (2015). « Using the gonadosomatic index to estimate the maturity ogive : application to Chilean hake (*Merluccius gayi gayi*) ». *ICES Journal of Marine Science* 72, p. 508-514. DOI : 10.1093/icesjms/fsu155 (cf. p. 68).
- FORDHAM, S. E. et E. A. TRIPPEL (1999). « Feeding behaviour of cod (*Gadus morhua*) in relation to spawning ». *Journal of Applied Ichthyology* 15, p. 1-9. DOI : 0175-8659/99/1501-0001 (cf. p. 18).
- FRANCE (2013). *Arrêté du 29 janvier 2013 modifiant l'arrêté du 26 octobre 2012 déterminant la taille minimale ou le poids minimal de capture des poissons et autres organismes marins (pour une espèce donnée ou pour une zone géographique donnée) effectuée dans le cadre de la pêche maritime de loisir*. URL : <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000027093867> (cf. p. 42, 130).
- FREERER, R. H. et E. R. WEIBEL (1967). « Stereologic techniques in microscopy ». *Journal of the Royal Microscopical Society* 87, p. 25-34. DOI : 10.1111/j.1365-2818.1967.tb04489.x (cf. p. 85).
- FROESE, R. et D. PAULY, éd. (2000). *FishBase 2000 : concepts, design and data sources* (cf. p. 37, 39, 41, 43, 44, 46, 47).
- GABE, M. (1968). *Techniques Histologiques*. 2eme édition. Paris, France : Masson et Cie (cf. p. 77, 78, 90, 91, 124, 241, 244).
- GARCIA-RUBIES, A. et E. MACPHERSON (1995). « Substrate use and temporal pattern of recruitment in juvenile fishes of the Mediterranean littoral ». *Marine Biology* 124, p. 35-42 (cf. p. 41).
- GERRITSEN, H. D. et D. MCGRATH (2006). « Variability in the assignment of maturity stages of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) and whiting (*Merlangius merlangus* L.) using macroscopic maturity criteria ». *Fisheries Research*. Elsevier 77, p. 72-77. DOI : 10.1016/j.fishres.2005.08.007 (cf. p. 124).
- GERRITSEN, H. D., D. MCGRATH, C. LORDAN et X. HARLAY (2010). « Differences in habitat selection of male and female megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*, Walbaum) to the west of Ireland. A result of differences in life-history strategies between the sexes? » *Journal of Sea Research* 64, p. 487-493. DOI : 10.1016/j.seares.2010.01.011 (cf. p. 47, 68).
- GIBSON, R. N. (1973). « Tidal and circadian activity rhythms in juvenile plaice, *Pleuronectes platessa* ». *Marine Biology* 22, p. 379-386. DOI : 10.1007/BF00391398 (cf. p. 38).
- GLAGOLEV, A. A. (1934). « Quantitative analysis with the microscope by the 'point' method ». *Minerals Engineering Journal* 135, p. 399-400 (cf. p. 79, 81, 88, 89, 93, 96, 224, 241).
- GLENTEN, F., E. TERWINGHE et A. DANGUY (2010). *Histologie illustrée du Poisson*. Versailles, France : Quae (cf. p. 27).

- GOODALL, J. A., M. F. CAPRA et A. W. BLACKSHAW (1987). « Quantitative histology of the seasonal changes in the gonads of summer whiting, *Sillago ciliata* ». *Journal of Fish Biology* 30, p. 589-595. DOI : [10.1111/j.1095-8649.1987.tb05786.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1987.tb05786.x) (cf. p. 82, 84).
- GUNDERSEN, H. J. G. (1989). « Stereology of arbitrary particles – a review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones ». *Journal of Microscopy* 143, p. 3-45 (cf. p. 86).
- GUNDERSEN, H. J. G., P. BAGGER, T. F. BENDTSEN, S. M. EVANS, L. KORBO, N. MARCUSSEN, A. MØLLER, K. NIELSEN, J. R. NYENGAARD, B. PAKKENBERG, F. B. SØRENSEN, A. VESTERBY et M. J. WEST (1988). « The new stereological tools : Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis ». *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 96, p. 857-881 (cf. p. 86, 87).
- GUNDERSEN, H. J. G. et E. B. JENSEN (1987). « The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction ». *Journal of Microscopy* 147, p. 229-263. DOI : [10.1111/j.1365-2818.1987.tb02837.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1987.tb02837.x) (cf. p. 82, 126).
- GURAYA, S. S. (1986). *The Cell and molecular Biology of Fish Oogenesis*. Sous la dir. de H. W. SAUER. T. 18. Monographs in developmental biology. New York : Karger (cf. p. 27).
- HALLGREN, K. A. (2012). « Computing Inter-Rater Reliability for Observational Data : An Overview and Tutorial ». *Tutorials in Quantitative Methods for Psychology* 8, p. 23-34. URL : <http://www.tqmp.org/RegularArticles/vol08-1/p023> (cf. p. 98).
- HEINO, M., B. DÍAZ PAULI et U. DIECKMANN (2015). « Fisheries-Induced Evolution ». *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 46, p. 461-480. DOI : [10.1146/annurev-ecolsys-112414-054339](https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-112414-054339) (cf. p. 16).
- HEINO, M. et U. DIECKMANN (2008). « Detecting fisheries-induced life-history evolution : an overview of the reaction-norm approach ». *Bulletin of Marine Science* 83, p. 69-93 (cf. p. 17).
- HEINO, M. et O. R. GODO (2002). « Fisheries-induced selection pressures in the context of sustainable fisheries ». *Bulletin of Marine Science* 70, p. 639-656 (cf. p. 17).
- HEUDE-BERTHELIN, C., K. KELLNER et C. SAUGER (2023a). « Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the four-spot megrim, *Lepidorhombus boschii* (Risso, 1810) ». *IFREMER*, p. 1-32. DOI : doi.org/10.13155/74844.
- HEUDE-BERTHELIN, C., K. KELLNER et C. SAUGER (2023b). « Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the megrim, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792) ». *IFREMER*, p. 1-33. DOI : doi.org/10.13155/75170.
- HOAR, W. S. (1957). « The gonads and reproduction ». *The Physiology of Fishes* 1. Sous la dir. de M. E. BROWN, p. 287-321 (cf. p. 20).
- HOAR, W. S. et Y. NAGAHAMA (1978). « The cellular sources of sex steroids in teleost gonads ». *Annales Biologiques des Animaux en Biochimie et Biophysologie* 18, p. 893-898 (cf. p. 25).
- HOARAU, G., A. M.-T. PIQUET, H. W. van der VEER, A. D. RIJNSDORP, W. T. STAM et J. L. OLSEN (2004). « Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe : a comparison of resolving power between microsatellites and mitochondrial DNA data ». *Journal of Sea Research* 51, p. 183-190. DOI : [10.1016/j.seares.2003.12.002](https://doi.org/10.1016/j.seares.2003.12.002) (cf. p. 37, 38, 64).
- HOARAU, G., A. D. RIJNSDORP, H. W. VAN DER VEER, W. T. STAM et J. L. OLSEN (2002). « Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe : microsatellites revealed large-scale spatial and temporal homogeneity ». *Molecular Ecology*. Blackwell Science Ltd 11, p. 1165-1176. DOI : [10.1046/j.1365-294X.2002.01515.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01515.x) (cf. p. 38, 64).
- HOWARD, C. V. et M. G. REED (2005). *Unbiased Stereology. Three-Dimensional Measurements in Microscopy*. 2nd. New York, USA : Garland Science/Bios Scientific (cf. p. 86).
- HOWARD, C. V. et M. G. REED (2010). « Chapter 1 - Concepts ». *Unbiased Stereology. Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. Seconde. Liverpool, UK : QTP Publications, p. 1-17. URL : <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2818.1999.0429a.x> (cf. p. 80).
- HUNTER, J. R. et B. J. MACEWICZ (1985a). « Measurement of Spawning Frequency in Multiple Spawning Fishes ». *NOAA* 36, p. 79-94 (cf. p. 130).
- HUNTER, J. R. et B. J. MACEWICZ (1985b). « Rates of atresia in the ovary of captive and wild northern anchovy, *Engraulis mordax* ». *Fishery Bulletin* 83, p. 119-136 (cf. p. 27, 28).
- HUNTER, J. R., B. J. MACEWICZ et C. A. KIMBRELL (1992). « Fecundity, spawning, and maturity of female Dover sole *Microstomus pacificus*, with an evaluation of assumptions and precision ». *Fishery Bulletin* 90, p. 101-128 (cf. p. 19, 28).

- HUTCHINGS, J. A. (2000). « Collapse and recovery of marine fishes ». *Nature* 406, p. 882-885. DOI : [10.1038/35022565](https://doi.org/10.1038/35022565) (cf. p. 17).
- ICES (2007). *Report of the Workshop on Sexual Maturity Sampling (WKMAT)*. Rapp. tech. ICES CM 2007/ACFM :03. Lisbon, Portugal : International Council for the Exploration of the Sea, 85 pp. (Cf. p. 33).
- ICES (2008). *Report of the Workshop on Sexual Maturity Staging of Cod, Whiting, Haddock and Saithe (WKMSCWHS)*. Rapp. tech. ICES CM 2007/ACFM :33. Copenhagen, Denmark : International Council for the Exploration of the Sea, 62 pp. (Cf. p. 33).
- ICES (2012a). *Report of the Benchmark Workshop on Flatfish Species and Anglerfish (WKFLAT)*. ICES Advisory Committee 46. Bilbao, Spain : International Council for the Exploration of the Sea, 283 pp. (Cf. p. 67).
- ICES (2012b). *Report of the Workshop 2 on Sexual Maturity Staging of sole, plaice, dab and flounder (WKMSSPDF)*. Workshop. Oostende, Belgium : International Council for the Exploration of the Sea, 64 pp. (Cf. p. 36).
- ICES (2013). *Report of the Workshop on sexual maturity staging of cod, whiting, haddock, saithe and hake (WKMSGAD)*. Workshop. San Seastian, Spain : International Council for the Exploration of the Sea, 55 pp. (Cf. p. 36).
- ICES (2014). *Report of the Workshop for maturity staging chairs (WKMATCH)*. Workshop. Split, Croatia : International Council for the Exploration of the Sea, 59 pp. (Cf. p. 8, 12, 34, 65, 76, 99, 124).
- ICES (2016). *Technical Guidelines - Advice on fishing opportunities*. ICES Technical Guidelines 12. International Council for the Exploration of the Sea, 1 pp. URL : <https://doi.org/10.17895/ices.advice.8339> (visité le 10/05/2023) (cf. p. 38, 45).
- ICES (2018). *Report of the Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF)*. Rapp. tech. 38. Copenhagen, Denmark : International Council for the Exploration of the Sea, p. 1-75 (cf. p. 9, 10, 12, 34, 76, 99).
- ICES (2019). *Working Group on the Assessment of demersal stocks in the North Sea and Skagerrak*. Rapp. tech. Volume 1, Issue 7. International Council for the Exploration of the Sea, 1271 pp. URL : <http://www.ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Forms/DispForm.aspx?ID=35718> (visité le 09/06/2020) (cf. p. 66, 67).
- ICES (2020). *Working Group on Biological Parameters (WGBIOP)*. Rapp. tech. 2 :117. International Council for the Exploration of the Sea, 115 pp. URL : <http://doi.org/10.17895/ices.pub.7651> (cf. p. 36).
- ICES (2022a). « Four-spot megrim (*Lepidorhombus boscii*) in divisions 7.b-k, 8.a-b, and 8.d (west and southwest of Ireland, Bay of Biscay) ». *Report of the ICES Advisory Committee, 2022*. ICES Advice 2022 ldb.27.7b-k8abd. International Council for the Exploration of the Sea, p. 1-4. URL : <https://doi.org/10.17895/ices.advice.19448033> (cf. p. 48).
- ICES (2022b). *Working Group on the Assessment of Demersal Stocks in the North Sea and Skagerrak*. ICES Scientific Reports 4 :43. International Council for the Exploration of the Sea, 1367 pp. URL : https://ices-library.figshare.com/articles/report/Working_Group_on_the_Assessment_of_Demersal_Stocks_in_the_North_Sea_and_Skagerrak_WGNSSK_/19786285 (visité le 11/05/2023) (cf. p. 36, 39, 42, 63).
- ICES (2022c). *Working Group on Widely Distributed Stocks (WGWIDE)*. ICES Scientific Reports 4 :73. International Council for the Exploration of the Sea, 922 pp. URL : https://ices-library.figshare.com/articles/report/Working_Group_on_Widely_Distributed_Stocks/21088804 (visité le 11/05/2023) (cf. p. 36, 39, 42, 43, 63).
- ICES (2023a). *Benchmark workshop on selected megrim stocks (WKMEGRIM; outputs from 2022 meeting)*. Rapp. tech. 5 :61. International Council for the Exploration of the Sea, 240 pp. URL : <https://doi.org/10.17895/ices.pub.21769325> (cf. p. 45, 48, 63).
- ICES (2023b). « Megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) in divisions 7.b-k, 8.a-b, and 8.d (west and southwest of Ireland, Bay of Biscay) ». *Report of the ICES Advisory Committee, 2023*. ICES Advice 2023 meg.27.7b-k8abd. International Council for the Exploration of the Sea, p. 1-7. URL : <https://doi.org/10.17895/ices.advice.21840930> (cf. p. 45, 46).
- ICES (2023c). *Plaice (*Pleuronectes platessa*) in Division 7.d (eastern English Channel)*. Report of the ICES Advisory Committee, 2023 ple.27.7d. International Council for the Exploration of the Sea, 11 pp. URL : <https://doi.org/10.17895/ices.advice.21840987> (cf. p. 36, 38, 39, 63, 67).

- IFREMER (2011). *Biologie de la Plie commune (Pleuronectes platessa)*. URL : <https://wwz.ifremer.fr/peche/Le-monde-de-la-peche/Les-ressources/Lesquelles/Poissons/Osseux/Plies> (visité le 22/02/2019) (cf. p. 37, 38, 66).
- IFREMER (2018). *Qu'est-ce qu'un stock ?* URL : <https://wwz.ifremer.fr/peche/Le-role-de-1-Ifremer/Expertise/Diagnostics/Notions-de-base/Definition-d-un-stock> (visité le 20/02/2019) (cf. p. 3).
- IFREMER (2022a). *Le Monde de la Pêche*. URL : <https://peche.ifremer.fr/Le-monde-de-la-peche/La-gestion/ou/Zones-CIEM> (cf. p. 4).
- IFREMER (2022b). *Le Monde de la pêche*. URL : <https://peche.ifremer.fr/Le-monde-de-la-peche/La-gestion> (cf. p. 5).
- JALABERT, B. (2005). « Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals ». *Reproduction Nutrition Development* 45, p. 261-279. DOI : [10.1051/rnd:2005019](https://doi.org/10.1051/rnd:2005019) (cf. p. 18-20, 22).
- JAYASUNDARA, J. M. V. D. B., R. M. L. S. RAMANAYAKE, H. M. N. B. SENARATH, H. M. S. L. HERATH, G. M. R. I. GODALIYADDA, M. P. B. EKANAYAKE, H. M. V. R. HERATH et S. ARIYAWANSA (2023). « Deep learning for automated fish grading ». *Journal of Agriculture and Food Research* 14, p. 1-11. DOI : [10.1016/j.jafr.2023.100711](https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100711) (cf. p. 238).
- JOHNSON, R., J. WOLF et T. BRAUNBECK (2009). *Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads*. Rapp. tech. OECD, 96 pp. (Cf. p. 88, 128).
- JØRGENSEN, C., K. ENBERG, E. S. DUNLOP, R. ARLINGHAUS, D. S. BOUKAL, K. BRANDER, B. ERNANDE, A. G. GÅRDMARK, F. JOHNSTON et S. MATSUMURA (2007). « Ecology : managing evolving fish stocks ». *Science* 318, p. 1247-1248. DOI : [10.1126/science.1148089](https://doi.org/10.1126/science.1148089) (cf. p. 16).
- JØRGENSEN, T. (1990). « Long-term changes in age at sexual maturity of Northeast Arctic cod (*Gadus morhua* L.) ». *ICES Journal of Marine Science* 46, p. 235-248. DOI : [10.1093/icesjms/46.3.235](https://doi.org/10.1093/icesjms/46.3.235) (cf. p. 16, 17).
- JUNQUERA, S., E. ROMAN, J. MORGAN, M. SAINZA et G. RAMILO (2003). « Time scale of ovarian maturation in Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*, Walbaum) ». *ICES Journal of Marine Science* 60, p. 767-773. DOI : [10.1016/S1054a33139\(03\)00073-0](https://doi.org/10.1016/S1054a33139(03)00073-0) (cf. p. 25).
- KAGAWA, H. (2013). « Oogenesis in Teleost Fish ». *Aqua-BioScience Monographs* 6, p. 99-127. DOI : [10.5047/absm.2013.00604.0099](https://doi.org/10.5047/absm.2013.00604.0099) (cf. p. 20, 21, 23, 25, 26).
- KAGAWA, H., G. YOUNG et Y. NAGAHAMA (1983). « Relationship Between Seasonal Plasma Estradiol-17 β and Testosterone Levels and In Vitro Production by Ovarian Follicles of Amago Salmon (*Onchorhynchus rhodurus*) ». *Biology of Reproduction* 29, p. 301-309 (cf. p. 13).
- KIDERLEN, M. (2016). *Design- and Model-Based Stereology*. Powerpoint presentation. University of Aarhus, DK. URL : <https://pure.au.dk/portal/files/98739698/stereology.pdf> (visité le 03/08/2023) (cf. p. 80).
- KIPANYULA, M. J. et A. S. SIFE (2018). « Global Trends in Application of Stereology as a Quantitative Tool in Biomedical Research ». *BioMed Research International* 2018, p. 1-9. DOI : [10.1155/2018/1825697](https://doi.org/10.1155/2018/1825697) (cf. p. 82).
- KJESBU, O. S., M. FONN, B. D. GONZÁLES et T. NILSEN (2010). « Stereological calibration of the profile method to quickly estimate atresia levels in fish ». *Fisheries Research* 104, p. 8-18. DOI : [10.1016/j.fishres.2010.03.013](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2010.03.013) (cf. p. 28, 82, 85).
- KLEBS, E. (1869). *Handbuch der pathologischen Anatomie*. T. 1. Berlin, Allemagne : August Hirschwald (cf. p. 78).
- KNAPP, J. M., G. ARANDA, A. MEDINA et M. LUTCAVAGE (2014). « Comparative Assessment of the Reproductive Status of Female Atlantic Bluefin Tuna from the Gulf of Mexico and the Mediterranean Sea ». *PLoS ONE* 9. Sous la dir. de M. CASTONGUAY, p. 1-9. DOI : [10.1371/journal.pone.0098233](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098233) (cf. p. 87).
- KORTA, M., H. MURUA, Y. KURITA et O. S. KJESBU (2010). « How are the oocytes recruited in an indeterminate fish? Applications of stereological techniques along with advanced packing density theory on European hake (*Merluccius merluccius* L.) ». *Fisheries Research* 104, p. 56-63. DOI : [10.1016/j.fishres.2010.01.010](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2010.01.010) (cf. p. 82, 86-88).
- KORTNER, T. M., E. ROCHA, P. SILVA, L. F. C. CASTRO et A. ARUKWE (2008). « Genomic approach in evaluating the role of androgens on the growth of Atlantic cod (*Gadus morhua*) previtellogenic oocytes ». *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D : Genomics and Proteomics* 3, p. 205-218. DOI : [10.1016/j.cbd.2008.04.001](https://doi.org/10.1016/j.cbd.2008.04.001) (cf. p. 82, 83, 85).

- KUBAT, M. (2017). *An Introduction to Machine Learning*. Second. Cham : Springer International Publishing. URL : <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-63913-0> (visité le 12/06/2020) (cf. p. 236).
- KUMAR, V. et Y. M. ELKOUBY (2023). « Tools to analyze the organization and formation of the germline cyst in zebrafish oogenesis ». *Development* 150, p. 1-14. DOI : [10.1242/dev.201349](https://doi.org/10.1242/dev.201349) (cf. p. 240).
- KUPARINEN, A. et J. MERILÄ (2007). « Detecting and managing fisheries-induced evolution ». *Trends in Ecology & Evolution* 22, p. 652-659. DOI : [10.1016/j.tree.2007.08.011](https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.08.011) (cf. p. 17).
- KURITA, Y. et O. S. KJESBU (2009). « Fecundity estimation by oocyte packing density formulae in determinate and indeterminate spawners : theoretical considerations and applications ». *Journal of Sea Research* 61, p. 188-196 (cf. p. 86, 88).
- LAFFARGUE, P., M. SALAUN, F. GARREN, R. BELLAIL, K. MAHÉ et J. C. POULARD (1987). « EVHOE Evaluation Halieutique Ouest de l'Europe ». *French Oceanographic Cruises*. DOI : [10.18142/8](https://doi.org/10.18142/8).
- LAMBERT, J. G. D. (1970). « The Ovary of the Guppy, *Poecilia reticulata*. The Atretic Follicle, a *Corpus atreticum* or a *Corpus luteum praeovulationis* ». *Z. Zellforsch* 107, p. 54-57 (cf. p. 28).
- LANDA, J. et J. FONTENLA (2016). « Age and growth of four spot megrim (*Lepidorhombus boscii*) in northern Iberian waters corroborated by cohort tracking ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 179, p. 181-188. DOI : [10.1016/j.ecss.2016.01.010](https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.01.010) (cf. p. 67).
- LANDA, J., N. PÉREZ et C. PIÑEIRO (2002). « Growth patterns of the four spot megrim (*Lepidorhombus boscii*) in the northeast Atlantic ». *Fisheries Research* 55, p. 141-152. DOI : [10.1016/S0165-7836\(01\)00302-2](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(01)00302-2) (cf. p. 47, 67).
- LANDA, J., C. PIÑEIRO et N. PÉREZ (1996). « Megrim (*Lepidorhombus Whiffiagonis*) growth patterns in the northeast Atlantic ». *Fisheries Research* 26, p. 279-294. DOI : [0165-7836/96](https://doi.org/0165-7836/96) (cf. p. 45).
- LANG, E. T., H. M. LYON, G. R. FITZHUGH, W. T. WALLING et M. COOK (2013). « An Evaluation of Sexual Macroscopic Staging Applied to Gulf of Mexico Fishes ». *NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC.649* (cf. p. 130).
- LAW, R. (2000). « Fishing, selection, and phenotypic evolution ». *ICES Journal of Marine Science* 57, p. 659-668 (cf. p. 16, 17).
- LAW, R. et D. R. GREY (1989). « Evolution of yields from populations with age-specific cropping ». *Evolutionary Ecology* 3, p. 343-359. DOI : [10.1007/BF02285264](https://doi.org/10.1007/BF02285264) (cf. p. 17).
- LAZARD, C. et A. AUBER (2022). « IBTS 2022 cruise, Thalassa R/V ». *French Oceanographic Cruises*. DOI : [10.17600/18001811](https://doi.org/10.17600/18001811).
- LE MELEDER, A. (2022). *Maturity Scale Tools*. URL : <https://lm-anna.github.io/MaturityScaleTools/> (cf. p. 50, 62).
- LE MELEDER, A., C. SAUGER et L. DUBROCA (2022). « Fish gonads' photography protocol ». *IFREMER*, p. 1-11. DOI : <https://doi.org/10.13155/89703> (cf. p. 50, 66).
- LE MENN, F., J. CERDÀ et P. J. BABIN (2007). « Chapter 1 : Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles ». *The Fish Oocyte*. Sous la dir. de P. J. BABIN, J. CERDÀ et E. LUBZENS. Dordrecht : Springer, p. 1-37. URL : https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6235-3_1 (cf. p. 25).
- LE ROY, D., V. MARTIN-BAILLET et C. GIRALDO (2021). « Compte-rendu de la campagne CGFS 2021 Sur le N/O Thalassa. Rapport intermédiaire ». *PDG-RBE-HALGO-LBH/ RBE-HMMN-LRHBL*, p. 1-50. URL : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00746/85817/>.
- LESAGE, M., M. THOMAS, T. PÉCOT, L. TU-KY, N. HINFRAY, R. BEAUDOUIN, M. NEUMANN, R. LOVELL-BADGE, J. BUGEON et V. THERMES (2023). « An end-to-end pipeline based on open source deep learning tools for reliable analysis of complex 3D images of ovaries ». *Development* 150, p. 1-13. DOI : [10.1242/dev.201185](https://doi.org/10.1242/dev.201185) (cf. p. 239).
- LISON, L. (1960). *Histochimie et cytochimie animales : Principes et méthodes par L. Lison*. 2ème édition (cf. p. 74).
- LORENZEN, K. et K. ENBERG (2002). « Density-dependent growth as a key mechanism in the regulation of fish populations : evidence from among-population comparisons ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences* 269, p. 49-54. DOI : [10.1098/rspb.2001.1853](https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1853) (cf. p. 17).
- LOULIDI, A., R. HOUSSA, L. BUHL-MORTENSEN, H. ZIDANE et H. RHINANE (2022). « Automatic fish detection from different marine environments video using deep learning ». *International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences* 46, p. 191-198 (cf. p. 237).
- LOWERRE-BARBIERI, S. K., N. J. BROWN-PETERSON, H. MURUA, J. TOMKIEWICZ, D. M. WYANSKI et F. SABORIDO-REY (2011). « Emerging Issues and Methodological Advances in Fisheries Reproductive

- Biology ». *Marine and Coastal Fisheries* 3, p. 32-51. DOI : [10.1080/19425120.2011.555725](https://doi.org/10.1080/19425120.2011.555725) (cf. p. 9).
- LUBZENS, E., G. YOUNG, J. BOBE et J. CERDÀ (2010). « Oogenesis in teleosts : How fish eggs are formed ». *General and Comparative Endocrinology*. Elsevier 165, p. 367-389. DOI : [10.1016/j.ygcen.2009.05.022](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022) (cf. p. 22).
- LUZIO, A., S. M. MONTEIRO, S. GARCIA-SANTOS, E. ROCHA, A. A. FONTAÍNHAS-FERNANDES et A. M. COIMBRA (2015). « Zebrafish sex differentiation and gonad development after exposure to 17 α -ethinylestradiol, fadrozole and their binary mixture : A stereological study ». *Aquatic Toxicology* 166, p. 83-95. DOI : [10.1016/j.aquatox.2015.07.015](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.015) (cf. p. 83, 87).
- MACHIAS, A., S. SOMARAKIS et N. TSIMENIDES (1998). « Bathymetric distribution and movements of red mullet *Mullus surmuletus* ». *Marine Ecology Progress Series* 166, p. 247-257 (cf. p. 41).
- MADUREIRA, T. V., M. J. ROCHA, C. CRUZEIRO, M. H. GALANTE, R. A. F. MONTEIRO et E. ROCHA (2011). « The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal) : Assessing impacts on gonadal maturation with a histopathological and stereological study of zebrafish ovary and testis after sub-acute exposures ». *Aquatic Toxicology* 105, p. 292-299. DOI : [10.1016/j.aquatox.2011.06.017](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.017) (cf. p. 86, 87).
- MAHÉ, K., F. COPPIN, S. VAZ et A. CARPENTIER (2013). « Striped red mullet (*Mullus surmuletus*, Linnaeus, 1758) in the eastern English Channel and southern North Sea : growth and reproductive biology ». *Journal of Applied Ichthyology* 29, p. 1067-1072. DOI : [10.1111/jai.12266](https://doi.org/10.1111/jai.12266) (cf. p. 66, 68, 128, 129).
- MAHÉ, K., A. DESTOMBES, F. COPPIN, P. KOUUBI, S. VAZ, D. LE ROY et A. CARPENTIER (2005). « Le rouget barbet de roche *Mullus surmuletus* (L. 1758) en Manche orientale et mer du Nord ». *Rapport de Contrat IFREMER/CRPMEM Nord-Pas-de-Calais*, p. 187 (cf. p. 66, 128).
- MAHÉ, K., M. C. VILLANUEVA, S. VAZ, F. COPPIN, P. KOUUBI et A. CARPENTIER (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 : morphological variability to identify fish stocks ». *Journal of Fish Biology* 84, p. 1063-1073. DOI : [10.1111/jfb.12345](https://doi.org/10.1111/jfb.12345) (cf. p. 41, 63).
- MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. (2003). « Stereological tools in biomedical research ». *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75, p. 469-486. DOI : [10.1590/S0001-37652003000400006](https://doi.org/10.1590/S0001-37652003000400006) (cf. p. 81).
- MARTIN, V. (2022). « Comparaison des méthodes de détermination de la maturité sexuelle - Étude des liens entre l'environnement, l'exploitation et la maturité sexuelle du rouget barbet de roche femelle (*Mullus surmuletus*, Linnaeus, 1758) ». Rapport de deuxième année de Master Sciences pour l'environnement parcours Gestion de l'environnement et écologie littorale. Université de la Rochelle (cf. p. 9, 14).
- MARTOJA, R. et M. MARTOJA-PIERSON (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. 120 bd St Germain, Paris-VI : Masson et Cie Editeurs (cf. p. 77, 78, 91).
- MATHIEU, O., L. M. CRUZ-ORIVE, H. HOPPELER et E. R. WEIBEL (1981). « Measuring error and sampling variation in stereology : comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis ». *Journal of Microscopy* 121, p. 75-88. DOI : [10.1111/j.1365-2818.1981.tb01200.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1981.tb01200.x) (cf. p. 82, 125).
- MBAIDIN, A., S. RÁBADE-UBEROS, R. DOMINGUEZ-PETIT, A. VILLAVERDE, M. E. GÓNZALEZ-RUFINO, A. FORMELLA, M. FERNÁNDEZ-DELGADO et E. CERNADAS (2021). « STERapp : Semiautomatic Software for Stereological Analysis. Application in the Estimation of Fish Fecundity ». *Electronics* 10, p. 1-15. DOI : [10.3390/electronics10121432](https://doi.org/10.3390/electronics10121432) (cf. p. 239, 272).
- MCBRIDE, R. S., S. SOMARAKIS, G. R. FITZHUGH, A. ALBERT, N. A. YARAGINA, M. J. WUENSCHERL, A. ALONSO-FERNÁNDEZ et G. BASILONE (2015). « Energy acquisition and allocation to egg production in relation to fish reproductive strategies ». *Fish and Fisheries* 16, p. 23-57 (cf. p. 15).
- MCHUGH, M. L. (2012). « Interrater reliability : the kappa statistic ». *Biochemia Medica* 22, p. 276-282. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3900052/> (cf. p. 51, 98).
- MEDINA, A., F. J. ABASCAL, L. ARAGÓN, G. MOURENTE, G. ARANDA, T. GALAZ, A. BELMONTE, J. M. de la SERNA et S. GARCÍA (2007). « Influence of sampling gear in assessment of reproductive parameters for bluefin tuna in the western Mediterranean ». *Marine Ecology Progress Series* 337, p. 221-230. DOI : [10.3354/meps337221](https://doi.org/10.3354/meps337221) (cf. p. 82, 85).
- MEDINA, A., F. J. ABASCAL, C. MEGINA et A. GARCIA (2002). « Stereological assessment of the reproductive status of female Atlantic northern bluefin tuna during migration to Mediterranean spawning

- grounds through the Strait of Gibraltar ». *Journal of Fish Biology* 60, p. 203-217. DOI : [10.1111/j.1095-8649.2002.tb02398.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb02398.x) (cf. p. 83-85).
- MERTZ, G. et R. A. MYERS (1998). « A simplified formulation for fish production ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55, p. 478-484. DOI : [10.1139/f97-216](https://doi.org/10.1139/f97-216) (cf. p. 17).
- MIDWAY, S. R., J. W. WHITE, W. ROUMILLAT, C. BATSAVAGE et F. S. SCHARF (2013). « Improving macroscopic maturity determination in a pre-spawning flatfish through predictive modeling and whole mount methods ». *Fisheries Research* 147, p. 359-369. DOI : [10.1016/j.fishres.2013.07.010](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.07.010) (cf. p. 13).
- MILANO, S., J. A. MCGRANE et S. LEONELLI (2023). « Large language models challenge the future of higher education ». *Nature Machine Intelligence* 5, p. 333-334. DOI : [10.1038/s42256-023-00644-2](https://doi.org/10.1038/s42256-023-00644-2) (cf. p. 235).
- MILLNER, R. et J. VIGNEAU (2018). *Stock Annex : Plaise (Pleuronectes platessa) in Division 7.d (eastern English Channel) - Working Group on the Assessment of Demersal Stocks in the North Sea and Skagerrak (WGSSK)*. Rapp. tech., 28 pp. (Visité le 06/06/2019) (cf. p. 37-39, 63, 129).
- MIOSSEC, Laurence (1984). « Altération de l'ovogénèse des Plies *Pleuronectes platessa* L. capturées dans les abers Wrac'h et Benoit, depuis la pollution de l'Amoco-Cadiz ». *Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes* 46, p. 195-207 (cf. p. 36, 125).
- MIRANDA, A. C. L., N. BAZZOLI, E. RIZZO et Y. SATO (1999). « Ovarian follicular atresia in two teleost species : a histological and ultrastructural study ». *Tissue & Cell* 31, p. 480-488 (cf. p. 27, 28).
- MOALLEM, G., A. A. PORE, A. GANGADHAR, H. SARI-SARRAF et S. A. VANAPALLI (2022). « Detection of live breast cancer cells in bright-field microscopy images containing white blood cells by image analysis and deep learning ». *Journal of Biomedical Optics* 27, p. 1-18. DOI : [10.1117/1.JBO.27.7.076003](https://doi.org/10.1117/1.JBO.27.7.076003) (cf. p. 244).
- MORTE, S., M. J. REDÓN et A. SANZ-BRAU (1999). « Feeding ecology of two megrims *Lepidorhombus boscii* and *Lepidorhombus whiffiagonis* in the western Mediterranean (Gulf of Valencia, Spain) ». *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 79, p. 161-169. DOI : [10.1017/S0025315497000180](https://doi.org/10.1017/S0025315497000180) (cf. p. 44, 47).
- MOUSTAHDID, H., W. MICHAELS, B. ALGER, A. GANGOPADHYAY et B. BREHMER (2020). « Advances in fisheries science through emerging observing technologies ». Singapore – U.S. Gulf Coast, p. 1-10. DOI : [10.1109/IEEECONF38699.2020.9389452](https://doi.org/10.1109/IEEECONF38699.2020.9389452) (cf. p. 238).
- MOUTON, P. R. (2011). « Area Estimation by point counting ». *Unbiased Stereology : A Concise Guide*. Baltimore, USA : The Johns Hopkins University Press, p. 15-21 (cf. p. 82, 96).
- MURUA, H. et F. SABORIDO-REY (2003). « Female Reproductive Strategies of Marine Fish Species of the North Atlantic ». *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 33, p. 23-31. DOI : [10.2960/J.v33.a2](https://doi.org/10.2960/J.v33.a2) (cf. p. 19, 26, 38, 127).
- N'DA, K. et C. DENIEL (1993). « Sexual cycle and seasonal changes in the ovary of the red mullet, *Mullus surmuletus*, from the southern coast of Brittany ». *Journal of Fish Biology* 43, p. 229-244. DOI : [10.1111/j.1095-8649.1993.tb00425.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1993.tb00425.x) (cf. p. 41, 128).
- N'DA, K., C. DÉNIEL et K. YAO (2006). « Croissance du rouget de roche *Mullus surmuletus* dans le nord du golfe de Gascogne ». *Cybium* 2006.1 (cf. p. 41).
- NIELSEN, J. G. (1989). « Scopthalmidae ». *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean (FNAM)*. Sous la dir. de P. J. P. WHITEHEAD, M.-L. BAUCHOT, J.-C. HUREAU, J. NIELSEN et E. TORTONESE. Berlin : Springer-Verlag, p. 1286-1293 (cf. p. 45, 129).
- NIKOLSKY, G. V. (1963). *The Ecology of Fishes*. Second. New York : Academic Press (cf. p. 10).
- NOVELO, N. D. et T. R. TIERSCH (2010). « A Review of the Use of Ultrasonography in Fish Reproduction ». *North American Journal of Aquaculture* 74, p. 169-181. DOI : [10.1080/15222055.2012.672370](https://doi.org/10.1080/15222055.2012.672370) (cf. p. 14).
- NUNES, C., A. SILVA, E. SOARES et K. GANIAS (2011). « The Use of Hepatic and Somatic Indices and Histological Information to Characterize the Reproductive ». *Marine and Coastal Fisheries* 3, p. 127-144. DOI : [10.1080/19425120.2011.556911](https://doi.org/10.1080/19425120.2011.556911) (cf. p. 13).
- OPENAI (2023). *ChatGPT (18 juillet 2023) [Large language model]*. URL : <https://chat.openai.com/> (visité le 18/07/2023) (cf. p. 234, 235).
- PACHITARIU, M. et C. STRINGER (2022). « Cellpose 2.0 : how to train your own model ». *Nature Methods* 19, p. 1634-1641. DOI : [10.1038/s41592-022-01663-4](https://doi.org/10.1038/s41592-022-01663-4). URL : <https://www.nature.com/articles/s41592-022-01663-4> (visité le 06/07/2023) (cf. p. 241, 245).

- PALOMARES, M. L. D., R. FROESE, B. DERRICK, J. J. MEEUWIG, S.-L. NÖEL, G. TSUI, J. WORONIAK, D. ZELLER et D. PAULY (2020). « Fishery biomass trends of exploited fish populations in marine ecoregions, climatic zones and ocean basins ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 243, p. 1-10. DOI : [10.1016/j.ecss.2020.106896](https://doi.org/10.1016/j.ecss.2020.106896) (cf. p. 16).
- PANKHURST, N. W., G. J. PURSER, G. VAN DER KRAAK, P. M. THOMAS et G. N. R. FORTEATH (1996). « Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* ». *Aquaculture*, p. 277-290 (cf. p. 16).
- PARLEMENT~EUROPÉEN (2023). *Fiches thématiques sur l'Union européenne*. URL : <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/fr/section/197/la-politique-commune-de-la-peche> (visité le 15/10/2023) (cf. p. 3).
- PAVLIDIS, M., L. GREENWOOD, B. MOUROT, C. KOKKARI, F. LE MENN, P. DIVANACH et A. P. SCOTT (2000). « Seasonal Variations and Maturity Stages in Relation to Differences in Serum Levels of Gonadal Steroids, Vitellogenin, and Thyroid Hormones in the Common Dentex (*Dentex dentex*) ». *General and Comparative Endocrinology* 118, p. 14-25. DOI : [10.1006/gcen.1999.7440](https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7440) (cf. p. 13).
- PAVLOV, D. A. et N. G. EMEL'YANOVA (2016). « Chapter 2 : Reproductive Dynamics ». *Fish Reproductive Biology : Implications for Assessment and Management*. Sous la dir. de T. JAKOBSEN, M. J. FOGARTY, B. A. MEGREY et E. MOKSNESS. Second. New York, USA : John Wiley & Sons, Ltd, p. 50-97 (cf. p. 17, 20).
- PEREDA, P., M. H. AFONSO, M. AZEVEDO, W. DAWSON, R. DUARTE, H. DUPOUY, J. FRANCO, M. L. GODINHO, J. LANDA, I. LOUREIRO, P. LUCIO, H. MACARA, J.C. MAHÉ, N. PÉREZ, C. PIÑEIRO, M. SAÍNZA, M. SANTURTÚN et V. TRUJILLO (1998). *Final Report of the project "Biological studies of demersal fish (BIOSDEF)*. Rapp. tech. UE DG XIV 95/038 (cf. p. 67).
- PINSKY, J. L., A. M. EIKESSET, C. HELMERSON, I. R. BRADBURY, P. BENTZEN, C. MORRIS, A. T. GONDEK-WYROZEMSKA, H. T. BAALSRUD, M. S. O. BRIEUC, O. S. KJESBU, J. A. GODIKSEN, J. M. I. BARTH, M. MATSCHINER, N. C. STENSETH, K. S. JAKOBSEN, S. JENTOFT et B. STAR (2021). « Genomic stability through time despite decades of exploitation in cod on both sides of the Atlantic ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118, p. 1-6. DOI : [10.1073/pnas.2025453118](https://doi.org/10.1073/pnas.2025453118) (cf. p. 17).
- PINTOR, J. M., P. CARRIÓN, E. CERNADAS, E. GONZÁLEZ-RUFINO, A. FORMELLA, M. FERNÁNDEZ-DELGADO, R. DOMÍNGUEZ-PETIT et S. RÁBADE-UBEROS (2016). « Govocitos : A software tool for estimating fish fecundity based on digital analysis of histological images ». *Computers and Electronics in Agriculture* 125, p. 89-98. DOI : [10.1016/j.compag.2016.04.014](https://doi.org/10.1016/j.compag.2016.04.014) (cf. p. 239, 272).
- POLICANSKY, D. (1993). « Fishing as a cause of evolution in fishes ». *The exploitation of evolving resources*. Springer, p. 1-18 (cf. p. 16, 17).
- PRINCE, J., W. J. HARFORD, B. M. TAYLOR et S. J. LINDFIELD (2022). « Standard histological techniques systematically under-estimate the size fish start spawning ». *Fish and Fisheries* 23, p. 1507-1516. DOI : [10.1111/faf.12702](https://doi.org/10.1111/faf.12702) (cf. p. 130).
- QUÉRO, J.-C. (1984a). « Cardines ». *Les Poissons de Mer des Pêches Françaises*. Sous la dir. de J. GRANCHER. Paris, p. 311-314 (cf. p. 44-47).
- QUÉRO, J.-C. (1984b). « Rouget-Barbets ». *Les Poissons de Mer des Pêches Françaises*. Sous la dir. de J. GRANCHER. Paris, p. 259-261 (cf. p. 40, 41).
- REDMON, J., S. DIVVALA, R. GIRSHICK et A. FARHADI (2016). « You Only Look Once : Unified, Real-Time Object Detection ». *2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. Las Vegas, NV, USA : IEEE, p. 779-788. DOI : [10.1109/CVPR.2016.91](https://doi.org/10.1109/CVPR.2016.91) (cf. p. 241).
- RESTREPO, V. (2022). *Glossaires des Termes de Pêche*. URL : <https://www.iccat.int/documents/scrs/other/glossaire.pdf> (visité le 18/11/2023) (cf. p. 7).
- RICKER, W. E. (1981). « Changes in the average size and average age of Pacific salmon ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38, p. 1636-1656. DOI : [10.1139/f81-213](https://doi.org/10.1139/f81-213) (cf. p. 17).
- RIJNSDORP, A. D. (1989). « Maturation of male and female North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.) ». *ICES Journal of Marine Science* 46, p. 35-51. DOI : [10.1093/icesjms/46.1.35](https://doi.org/10.1093/icesjms/46.1.35) (cf. p. 38, 128).
- RIJNSDORP, A. D. (1993). « Fisheries as a large-scale experiment on life-history evolution : disentangling phenotypic and genetic effects in changes in maturation and reproduction of North Sea plaice, *Pleuronectes platessa* L. ». *Oecologia*. Springer-Verlag 96, p. 391-401. DOI : [10.1007/BF00317510](https://doi.org/10.1007/BF00317510) (cf. p. 17, 66).

- RIJNSDORP, A. D. et F. STORBECK (1991). « Determining the Onset of Sexual Maturity from Otoliths of Individual Female North Sea Plaice, *Pleuronectes platessa* L. » *International Council for the Exploration of the Sea. Demersal Fish Committee* 48, p. 22 (cf. p. 38).
- ROBSON, S. M. (2004). « Age, growth, reproductive biology and population dynamics of the common megrim *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792) from off the west coast of Ireland ». Doctorate. Galway-Mayo Institute of Technology (cf. p. 125, 130).
- ROJO-BARTOLOMÉ, I., O. DIAZ DE CERIO, G. DIEZ et I. CANCIO (2016). « Identification of Sex and Female's Reproductive Stage in Commercial Fish Species through the Quantification of Ribosomal Transcripts in Gonads ». *PLOS ONE* 11. Sous la dir. de H. WANG, p. 16. DOI : [10.1371/journal.pone.0149711](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149711) (cf. p. 14).
- ROJO-BARTOLOMÉ, I., A. VALENCIA et I. CANCIO (2017). « Transcription of ribogenesis genes in fish gonads : Applications in the identification of stages of oogenesis and in environmental monitoring of intersex condition ». *Marine Pollution Bulletin* 121, p. 292-301. DOI : [10.1016/j.marpolbul.2017.06.027](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.027) (cf. p. 14).
- ROSE, K. A., J. H. COWAN JR, K. O. WINEMILLER, R. A. MYERS et R. HILBORN (2001). « Compensatory density dependence in fish populations : importance, controversy, understanding and prognosis ». *Fish and Fisheries* 2, p. 293-327. DOI : [10.1046/j.1467-2960.2001.00056.x](https://doi.org/10.1046/j.1467-2960.2001.00056.x) (cf. p. 17).
- ROSIWAL, A. (1898). « Ueber geometrische gesteinsanalysen ». *Verhandlungen der K.K. Geologischen Reichsanstalt*, p. 143-175 (cf. p. 79).
- ROYET, J.-P. (1991). « Stereology : A method for analyzing images ». *Progress in Neurobiology* 37, p. 433-474 (cf. p. 81).
- RUBBENS, P. et al. (2023). « Machine learning in marine ecology : an overview of techniques and applications ». *ICES Journal of Marine Science* 80, p. 1829-1853. DOI : [10.1093/icesjms/fsad100](https://doi.org/10.1093/icesjms/fsad100) (cf. p. 237).
- SABER, S., D. MACÍAS, J. ORTIZ DE URBINA et O. S. KJESBU (2015). « Stereological comparison of oocyte recruitment and batch fecundity estimates from paraffin and resin sections using spawning albacore (<i>Thunnus alalunga</i>) ovaries as a case study ». *Journal of Sea Research* 95, p. 226-238. DOI : [10.1016/j.seares.2014.05.003](https://doi.org/10.1016/j.seares.2014.05.003) (cf. p. 87).
- SAIDAPUR, S. K. (1978). « Follicular Atresia in the Ovaries of Nonmammalian Vertebrates ». *International Review of Cytology* 54, p. 225-244. DOI : [10.1016/S0074-7696\(08\)60169-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60169-2) (cf. p. 27).
- SALEH, A., D. JONES, D. JERRY et M. R. AZGHADI (2023). « MFLD-net : a lightweight deep learning network for fish morphometry using landmark detection ». *Aquatic Ecology*, p. 1-19. DOI : [10.1007/s10452-023-10044-8](https://doi.org/10.1007/s10452-023-10044-8) (cf. p. 237).
- SAMUEL, A. L. (1959). « Some Studies in Machine Learning Using the Game of Checkers ». *IBM Journal of research and development* 3, p. 210-229. DOI : [10.1147/rd.33.0210](https://doi.org/10.1147/rd.33.0210) (cf. p. 235).
- SÁNCHEZ, F., N. PÉREZ et J. LANDA (1998). « Distribution and abundance of megrim (*Lepidorhombus boscii* and *Lepidorhombus whiffiagonis*) on the northern Spanish shelf ». *ICES Journal of Marine Science* 55, p. 494-514. DOI : [10.1006/jmsc.1997.0279](https://doi.org/10.1006/jmsc.1997.0279) (cf. p. 45, 47).
- ŠANTIĆ, M., M. PODVINSKI, A. PALLAORO, I. JARDAS et M. KIRINČIĆ (2009). « Feeding habits of megrim, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792), from the central Adriatic Sea ». *Journal of Applied Ichthyology* 25, p. 417-422. DOI : [10.1111/j.1439-0426.2009.01257.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2009.01257.x) (cf. p. 44).
- SANTOS, P. T. (1994). « Growth and reproduction of the population of the four-spot megrim (*Lepidorhombus boscii* Risso) off the Portuguese coast ». *Netherlands Journal of Sea Research* 32, p. 379-383. DOI : [10.1016/0077-7579\(94\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0077-7579(94)90015-9) (cf. p. 67).
- SAUGER, C. et K. KELLNER (2019a). « Lexique des structures histologiques des ovaires et de l'ovogenèse de la plie, *Pleuronectes platessa* (Linné, 1758) », p. 26.
- SAUGER, C., K. KELLNER, V. MARTIN, A. LE MELEDER, C. BERTHELIN, N. VILLAIN-NAUD, N. ELIE et L. DUBROCA (2023a). « Macroscopic, histological and stereological image dataset of the Striped red mullet (*Mullus surmuletus*) ovaries from the Bay of Biscay (ICES area 27.7.g.j & 27.8.a-c) stock ». *Zenodo* 1.0 [Data set]. DOI : [10.5281/zenodo.8060309](https://doi.org/10.5281/zenodo.8060309).
- SAUGER, C., K. KELLNER, V. MARTIN, A. LE MELEDER, C. BERTHELIN, N. VILLAIN-NAUD, N. ELIE et L. DUBROCA (2023b). « Macroscopic, histological and stereological image dataset of the Striped red mullet (*Mullus surmuletus*) ovaries from the English Channel (ICES area 27.7.d) stock ». *Zenodo* 1.0 [Data set]. DOI : [10.5281/zenodo.8060356](https://doi.org/10.5281/zenodo.8060356).
- SAUGER, C., A. LE MELEDER, K. KELLNER, C. HEUDE-BERTHELIN, N. VILLAIN-NAUD, N. ELIE et L. DUBROCA (2023c). « Macroscopic, histological and stereological image dataset of Megrim (*Lepido-*

- rhombus whiffiagonis*) ovaries from the ICES Celtic Seas, south of Greater North sea or Bay of Biscay Ecoregions ». *Zenodo* [Data set] v1.0. DOI : [10.5281/zenodo.10040995](https://doi.org/10.5281/zenodo.10040995).
- SAUGER, C., J. QUINQUIS, C. BERTHELIN, M. LEPOITTEVIN, N. ELIE, L. DUBROCA et K. KELLNER (2023d). « A Quantitative Histologic Analysis of Oogenesis in the Flatfish Species *Pleuronectes platessa* as a Tool for Fisheries Management ». *Animals* 13, p. 1-21. DOI : [10.3390/ani13152506](https://doi.org/10.3390/ani13152506) (cf. p. [34](#), [53](#), [76](#), [83](#), [88](#), [111](#)).
- SAUGER, C., J. QUINQUIS, K. KELLNER, C. HEUDE-BERTHELIN, M. LEPOITTEVIN, N. ELIE et L. DUBROCA (2019b). « Macroscopic and histological image dataset of the European plaice (*Pleuronectes platessa*) ovaries ». *Zenodo* [Data set] v1.0. DOI : [10.5281/zenodo.3463295](https://doi.org/10.5281/zenodo.3463295).
- SAUGER, C., J. QUINQUIS, K. KELLNER, C. HEUDE-BERTHELIN, M. LEPOITTEVIN, N. ELIE et L. DUBROCA (2020). « A macroscopic and stereological imaging dataset of *Pleuronectes platessa* ovaries ». *Scientific Data* 7, p. 1-8. DOI : [10.1038/s41597-020-0505-8](https://doi.org/10.1038/s41597-020-0505-8) (cf. p. [96](#), [98](#), [126](#), [283](#)).
- SCHISMENOU, E., S. SOMARAKIS, A. THORSEN et O. S. KJESBU (2012). « Dynamics of de novo vitellogenesis in fish with indeterminate fecundity : an application of oocyte packing density theory to European anchovy, *Engraulis encrasicolus* ». *Marine Biology* 159, p. 757-768. DOI : [10.1007/s00227-011-1852-y](https://doi.org/10.1007/s00227-011-1852-y) (cf. p. [82](#), [86](#), [87](#)).
- SELMAN, K., R. A. WALLACE, A. SARKA et X. QI (1993). « Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio* ». *Journal of Morphology* 218, p. 203-224. DOI : [10.1002/jmor.1052180209](https://doi.org/10.1002/jmor.1052180209) (cf. p. [23](#), [24](#)).
- SERVOU, E., E. SCHISMENOU et S. SOMARAKIS (2023). « Quantitative Analysis of Ovarian Dynamics of European Sardine *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) during Its Spawning Period ». *Fishes* 8, p. 226. DOI : [10.3390/fishes8050226](https://doi.org/10.3390/fishes8050226) (cf. p. [83](#), [88](#)).
- SILVA, P., M. J. ROCHA, C. CRUZEIRO, F. MALHÃO, B. REIS, R. URBATZKA, R. A. F. MONTEIRO et E. ROCHA (2012). « Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads—A stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model ». *Aquatic Toxicology* 124-125, p. 1-10. DOI : [10.1016/j.aquatox.2012.07.002](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.07.002) (cf. p. [86](#)).
- SILVA HENRIQUES, L. G. da (2016). *Induction of Gonadal Growth/Maturation in the Ornamental Fishes *Epalzeorhynchus bicolor* and *Carassius auratus* and Stereological Validation in *C. auratus* of Histological Grading Systems for Assessing the Ovary and Testis Statuses*. Mémoire de fin de Master. Porto, Portugal : Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, 118 pp. (Cf. p. [83](#), [88](#)).
- SMITH, P. J. (1994). *Genetic diversity of marine fisheries resources : possible impacts of fishing*. Rome, Italy : FAO. URL : <https://www.fao.org/3/v4865e/v4865e.pdf> (cf. p. [17](#)).
- SMITH, W. S. (1968). « Otolith age reading by means of surface structure examination ». *ICES Journal of Marine Science* 32, p. 270-277 (cf. p. [238](#)).
- SMOLIŃSKI, S. (2019). « Incorporation of optimal environmental signals in the prediction of fish recruitment using random forest algorithms ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 76, p. 15-27 (cf. p. [239](#)).
- SOMARAKIS, S., K. GANIAS, G. TSERPES et C. KOUTSIKOPOULOS (2004). « Ovarian allometry and the use of the gonosomatic index : a case study in the Mediterranean sardine, *Sardina pilchardus* ». *Marine Biology* 146, p. 181-189. DOI : [10.1007/s00227-004-1419-2](https://doi.org/10.1007/s00227-004-1419-2) (cf. p. [68](#)).
- SONG, L., T. LI, T. ZHANG, H. SUI, B. LI et M. ZHANG (2023). « Comparison of machine learning models within different spatial resolutions for predicting the bigeye tuna fishing grounds in tropical waters of the Atlantic Ocean ». *Fisheries Oceanography* 32, p. 509-526. DOI : [10.1111/fog.12643](https://doi.org/10.1111/fog.12643) (cf. p. [238](#)).
- STAMOULIS, K. A., J. M. S. DELEVAUX, I. D. WILLIAMS, M. POTI, J. LECKY, B. COSTA, M. S. KENDALL, S. J. PITTMAN, M. K. DONOVAN, L. M. WEDDING et A. M. FRIEDLANDER (2018). « Seascape models reveal places to focus coastal fisheries management ». *Ecological Applications* 28, p. 910-925 (cf. p. [239](#)).
- STEARNS, S. C. (1989). « The evolutionary significance of phenotypic plasticity ». *Bioscience* 39, p. 436-445 (cf. p. [14](#), [15](#)).
- STEARNS, S. C. (1992). *The Evolution of Life Histories*. Great Clarendon Street, Oxford OX2 6DP : Oxford University Press (cf. p. [15](#)).
- STEARNS, S. C. (2000). « Life history evolution : successes, limitations, and prospects ». *Naturwissenschaften* 87, p. 476-486. DOI : [10.1007/s001140050763](https://doi.org/10.1007/s001140050763) (cf. p. [14](#), [15](#)).

- STERIO, D. C. (1984). « The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector ». *Journal of Microscopy* 134, p. 127-136. DOI : [10.1111/j.1365-2818.1984.tb02501.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1984.tb02501.x) (cf. p. 85-87).
- STRACHAN, N. J. C., P. NESVADBA et A. R. ALLEN (1990). « Fish species recognition by shape analysis of images ». *Pattern Recognition* 23, p. 539-544 (cf. p. 237).
- STRINGER, C., T. WANG, M. MICHAELIS et M. PACHITARIU (2021). « Cellpose : a generalist algorithm for cellular segmentation ». *Nature Methods* 18, p. 100-106. DOI : [10.1038/s41592-020-01018-x](https://doi.org/10.1038/s41592-020-01018-x). URL : <https://www.nature.com/articles/s41592-020-01018-x> (visité le 06/07/2023) (cf. p. 240, 241, 245).
- SUGPATAN ABANGAN, A., D. KOPP et R. FAILLETTAZ (2023). « Artificial intelligence for fish behavior recognition may unlock fishing gear selectivity ». *Frontiers in Marine Science*, p. 1-23. DOI : [10.3389/fmars.2023.1010761](https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1010761) (cf. p. 237).
- SWANSON, P., J. T. DICKEY et B. CAMPBELL (2003). « Biochemistry and physiology of fish gonadotropins ». *Fish Physiology and Biochemistry* 28, p. 53-59 (cf. p. 25).
- TEAL, L. R., J. J. de LEEUW, H. K. van der VEER et A. D. RIJNSDORP (2008). « Effects of climate change on growth of 0-group sole and plaice ». *Marine Ecology Progress Series* 358, p. 219-230 (cf. p. 16).
- TEAM, Posit (2022). *RStudio : Integrated Development for R*. Boston, USA. URL : <http://www.posit.co/> (cf. p. 51).
- TERVEN, J. et D. CORDOVA-ESPARZA (2023). *A Comprehensive Review of YOLO : From YOLOv1 and Beyond*. Rapp. tech. arXiv :2304.00501. arXiv, 33 pp. URL : <http://arxiv.org/abs/2304.00501> (visité le 18/07/2023) (cf. p. 241).
- THORSEN, A. et O. S. KJESBU (2001). « A rapid method for estimation of oocyte size and potential fecundity in Atlantic cod using a computer-aided particle analysis system ». *Journal of Sea Research* 46, p. 295-308 (cf. p. 85).
- TOKARZ, R. R. (1978). « An Autoradiographic Study of the Effects of Mammalian Gonadotropins (Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone) and Estradiol-17 β on [3 H]Thymidine Labeling of Surface Epithelial Cells, Prefollicular Cells and Oogonia in the Ovary of Lizard *Anoh carolinensis* ». *General and Comparative Endocrinology* 35, p. 179-188. DOI : [0016-6480/78/0352-0179](https://doi.org/10.1016/0016-6480(78)0352-0179) (cf. p. 23).
- TOMKIEWICZ, J., L. TYBJERG et A. JESPERSEN (2003). « Micro- and macroscopic characteristics to stage gonadal maturation of female Baltic cod ». *Journal of Fish Biology*. The Fisheries Society of the British Isles 62, p. 253-275. DOI : [10.1046/j.0022-1112.2003.00001.x](https://doi.org/10.1046/j.0022-1112.2003.00001.x) (cf. p. 24, 66).
- TORREJON-MAGALLANES, Josymar (2018). *sizeMat : An R Package to Estimate Size at Sexual Maturity*. URL : <https://cran.r-project.org/web/packages/sizeMat/vignettes/sizeMat.html> (cf. p. 50, 100).
- TRIPPEL, E. A. (1995). « Age at maturity as a stress indicator in fisheries ». *Bioscience* 45, p. 759-771. DOI : [10.2307/1312628](https://doi.org/10.2307/1312628) (cf. p. 15-17).
- TURING, A. M. (1950). « Computing Machinery and Intelligence ». *Mind* 59, p. 433-460. DOI : [10.1093/mind/LIX.236.433](https://doi.org/10.1093/mind/LIX.236.433) (cf. p. 235).
- TYLER, C. R. et J. P. SUMPTER (1996). « Oocyte growth and development in teleosts ». *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. Chapman & Hall 6, p. 287-318. DOI : [10.1007/BF00122584](https://doi.org/10.1007/BF00122584) (cf. p. 10, 18, 24, 28).
- UGRIN, N., A. PALADIN et S. K. ŠIFNER (2023). « Fecundity, Length at First Sexual Maturity and Gonadal Development of *Lepidorhombus boscii* in the Eastern Adriatic Sea ». *Biology* 12, p. 1-15. DOI : [10.3390/biology12010131](https://doi.org/10.3390/biology12010131) (cf. p. 47, 67, 125).
- VASSILOPOULOU, V. (2006). « Dietary habits of the deep-sea flatfish *Lepidorhombus boscii* in north-eastern Mediterranean waters ». *Journal of Fish Biology* 69, p. 1202-1220. DOI : [10.1111/j.1095-8649.2006.01199.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01199.x) (cf. p. 47).
- VASSILOPOULOU, V. et I. ONDRIAS (1999). « Age and growth of the four-spotted megrim (*Lepidorhombus boscii*) in eastern Mediterranean waters ». *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 79, p. 171-178. DOI : [10.1017/S0025315498000198](https://doi.org/10.1017/S0025315498000198) (cf. p. 47).
- VASSILOPOULOU, Vassiliki (2000). « Abundance and distribution of four-spotted megrim (*Lepidorhombus boscii*) in the Aegean Sea ». *Belgian Journal of Zoology* 130, p. 81-85 (cf. p. 47).
- VITALE, F., H. SVEDÄNG et M. CARDINALE (2006). « Histological analysis invalidates macroscopically determined maturity ogives of the Kattegat cod (*Gadus morhua*) and suggests new proxies for esti-

- mating maturity status of individual fish ». *ICES Journal of Marine Science* 63, p. 485-492. DOI : [10.1016/j.icesjms.2005.09.001](https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2005.09.001) (cf. p. 66, 68).
- WALLACE, R. A. et K. SELMAN (1981). « Cellular and Dynamic Aspects of Oocyte Growth in Teleosts ». *American Zoologist* 21, p. 325-343. DOI : [10.1093/icb/21.2.325](https://doi.org/10.1093/icb/21.2.325) (cf. p. 21, 24).
- WALRAVEN, L. van, F. M. MOLLET, C. J. G. van DAMME et A. D. RIJNSDORP (2010). « Fisheries-induced evolution in growth, maturation and reproductive investment of the sexually dimorphic North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.) ». *Journal of Sea Research*. Elsevier 64, p. 85-93. DOI : [10.1016/j.seares.2009.07.003](https://doi.org/10.1016/j.seares.2009.07.003) (cf. p. 67, 130).
- WANG, S., S. ZHANG, F. TANG, Y. SHI, Y. SUI, X. FAN et J. CHEN (2023). « Developing machine learning methods for automatic recognition of fishing vessel behaviour in the *Scomber japonicus* fisheries ». *Frontiers in Marine Science* 10, p. 1-18. DOI : [10.3389/fmars.2023.1085342](https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1085342) (cf. p. 239).
- WEAVER, D. L., D. N. KRAG, E. A. MANNA, T. ASHIKAGA, S. P. HARLOW et K. D. BAUER (2003). « Comparison of Pathologist-Detected and Automated Computer-Assisted Image Analysis Detected Sentinel Lymph Node Micrometastases in Breast Cancer ». *Modern Pathology* 16, p. 1159-1163. DOI : [10.1097/01.MP.0000092952.21794.AD](https://doi.org/10.1097/01.MP.0000092952.21794.AD) (cf. p. 244).
- WEIBEL, E. R. (1974). « Selection of the best method in stereology ». *Journal of Microscopy* 100, p. 261-269. DOI : [10.1111/j.1365-2818.1974.tb03938.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1974.tb03938.x) (cf. p. 78, 79).
- WEIBEL, E. R. (1979). *Stereological methods : Practical methods for biological morphometry*. T. 1. London : Academic Press (cf. p. 84, 86-88, 127).
- WEIBEL, E. R. et D. M. GOMEZ (1962). « A principle for counting tissue structures on random sections ». *Journal of Applied Physiology* 17, p. 343-348. DOI : [10.1152/jappl.1962.17.2.343](https://doi.org/10.1152/jappl.1962.17.2.343) (cf. p. 84, 85, 88).
- WEIBEL, E. R., G. S. KISTLER et W. F. SCHERLE (1966). « Practical stereological methods for morphometric cytology ». *The Journal of Cell Biology* 30, p. 23-38 (cf. p. 84-86, 88).
- WEIBEL, E. R. et B. W. KNIGHT (1964). « A morphometric study on the thickness of the pulmonary air-blood barrier ». *The Journal of cell biology* 21, p. 367-384 (cf. p. 79).
- WEST, G. (1990). « Methods of Assessing Ovarian development in Fishes : a Review ». *Marine and Freshwater Research* 41, p. 199-222. DOI : [10.1071/MF9900199](https://doi.org/10.1071/MF9900199) (cf. p. 8, 10, 66, 68, 125).
- WEST, M. J. (2001). « Design based stereological methods for estimating the total number of objects in histological material ». *Folia Morphologica* 60, p. 11-19 (cf. p. 80).
- WEST, M. J. (2012). « Introduction to Stereology ». *Cold Spring Harbor Protocols*, p. 843-851. DOI : [10.1101/pdb.top070623](https://doi.org/10.1101/pdb.top070623) (cf. p. 80, 81).
- « *Lepidorhombus* Günther, 1862 » (1986a). *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Sous la dir. de P. J. P. WHITEHEAD, M.-L. BAUCHOT, J.-C. HUREAU, J. NIELSEN et E. TORTONESE. T. 3. 7, Place de Fontenoy, 75700 Paris : United Nations Educational Scientific et Cultural Organization, p. 1287-1289 (cf. p. 44, 46, 47).
- « *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758 » (1986b). *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Sous la dir. de P.J.P. WHITEHEAD, M.-L. BAUCHOT, J.-C. HUREAU, J. NIELSEN et E. TORTONESE. T. II. Place de Fontenoy, Paris : United Nations Educational Scientific et Cultural Organization, p. 879 (cf. p. 40, 41).
- WIEGAND, M. D. (1996). « Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish ». *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6, p. 259-286. DOI : [10.1007/BF00122583](https://doi.org/10.1007/BF00122583) (cf. p. 128).
- WILLIAMS, M. A. (1977). *Quantitative Methods in Biology*. Sous la dir. d'A. GLOVER. T. 6. Practical Methods in Electron Microscopy. Amsterdam et New York : Elsevier/North Holland Biomedical Press (cf. p. 84, 88).
- WINGFIELD, J. C. et A. S. GRIMM (1977). « Seasonal Changes in Plasma Cortisol, Testosterone and Oestradiol-17b in the Plaice, *Pleuronectes platessa* L. ». *General and Comparative Endocrinology*. Academic Press 31, p. 1-11 (cf. p. 68).
- WITTHAMES, P. R. et M. GREER WALKER (1987). « An automated method for counting and sizing fish eggs ». *Journal of Fish Biology* 30, p. 225-235. DOI : [10.1111/j.1095-8649.1987.tb05748.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1987.tb05748.x) (cf. p. 11).
- WITTHAMES, P. R., A. THORSEN, H. MURUA, F. SABORIDO-REY, L. N. GREENWOOD, R. DOMINGEZ, M. KORTA et O. S. KJESBU (2009). « Advances in methods for determining fecundity : application of the new methods to some marine fishes ». *Fishery Bulletin* 107.2, p. 148-164 (cf. p. 11).

- WOOD, A. W. et G. VAN DER KRAAK (2003). « Yolk proteolysis in rainbow trout oocytes after serum-free culture : Evidence for a novel biochemical mechanism of atresia in oviparous vertebrates ». *Molecular Reproduction and Development* 65, p. 219-227. DOI : [10.1002/mrd.10272](https://doi.org/10.1002/mrd.10272) (cf. p. 27).
- WORM, B., E. B. BARBIER, N. BEAUMONT, J. E. DUFFY, C. FOLKE, B. S. HALPERN, J. B. C. JACKSON, H. K. LOTZE, F. MICHELI, S. R. PALUMBI, E. SALA, K. A. SELKOE, J. J. STACHOWICZ et R. WATSON (2006). « Impacts of Biodiversity Loss on Ocean Ecosystem Services ». *Science* 314, p. 787-790. DOI : [10.1126/science.1132294](https://doi.org/10.1126/science.1132294) (cf. p. 64).
- YASSIR, A., S. J. ANDALOUSSI, O. OUCHETTO, K. MAMZA et M. SERGHINI (2023). « Acoustic fish species identification using deep learning and machine learning algorithms : A systematic review ». *Fisheries Research* 266. DOI : [10.1016/j.fishres.2023.106790](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2023.106790) (cf. p. 238).
- YÖN, N. D. et C. AKBULUT (2015). « Identification of Primordial Germ Cells : Cytological, Histological and Immunohistochemical Aspects ». *Brazilian Archives of Biology and Technology* 58, p. 222-228. DOI : [10.1590/S1516-8913201500335](https://doi.org/10.1590/S1516-8913201500335) (cf. p. 22, 23).

THÈSE – Volume II

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : **PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES -
POPULATIONS - INTERACTIONS**

Préparé au sein de l'Université de Caen Normandie

Maturité objective des poissons par l'histologie quantitative

Présentée et soutenue par
CARINE SAUGER

Thèse soutenue le 12 janvier 2024
Devant le jury composé de

M. DANIEL PAULY	Professeur - University of British Columbia	Rapporteur du jury
M. FABRICE TELETCHEA	Maître de conférences HDR - Université de Lorraine	Rapporteur du jury
M. LAURENT DUBROCA	Cadre de recherche - IFREMER	Membre du jury
MME MARIA CRISTINA FOLLESA	Professeur - CAGLIARI - UNIVERSITA DEGLI STUDI DI	Membre du jury
MME CHRISTELE KELLNER	Maître de conférences HDR - Université de Caen Normandie	Membre du jury
M. BENOIT PLANCOULAIN	Professeur émérite - Université de Caen Normandie	Président du jury

Thèse dirigée par **CHRISTELE KELLNER** (Biologie des organismes et écosystèmes aquatiques (Caen))



Avant-propos

Ce deuxième volume accompagne le manuscrit principale de la thèse intitulée : *Maturité objective des poissons par l'histologie quantitative*. Financé par **France Filière Pêche**, le projet **MATO** (MATurité Objective des poissons par histologie quantitative) a financé la réalisation de cette thèse, rédigée par Carine Sauger sous la direction de Kristell Kellner (**Université de Caen Normandie**, laboratoire **BOREA**) et Laurent Dubroca (**Ifremer**, laboratoire Ressources Halieutiques de Port-en-bessin).

Les documents présentés dans ce *Volume II* ont été publiés dans la base d'Archive Institutionnelle de l'Ifremer (Archimer) (<https://archimer.ifremer.fr/>), non soumis à un comité de lecture. Ces publications en libre accès documentent les méthodologies utilisées lors des travaux de ce projet, afin de les rendre accessibles à la communauté scientifique dans un souci de transparence et de reproductibilité des résultats obtenus.

Le recueil de protocoles de traitement d'échantillons en histologie présentés ici détaille le matériel et les méthodes utilisées lors de cette thèse dans le laboratoire **BOREA** (Biologie des **OR**ganismes et **É**cosystèmes **A**quatiques) de l'Université de Caen, et n'est donc pas disponible sur Archimer. En contre partie, une version adaptée aux laboratoires halieutiques de l'Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) sera publié dans une revue de protocoles citables et évalués par des pairs.

Les lexiques et le protocole pour les lectures en stéréologie sont complémentaires et ont été publiés afin de rendre facile d'accès la méthodologie employée pour l'identification des structures cellulaires. **MATO** ayant comme un de ces objectifs de restreindre au maximum la subjectivité lors de la détermination de la maturité, des règles devaient être mises en place lors des lectures stéréologiques, permettant l'accès à cette méthode à des agents qui n'ont pas forcément une connaissance préalable en gamétogenèse. finalement, les lexiques viennent remettre à jour les connaissances de l'ovogenèse des espèces suivies, ainsi que décrire les structures cellulaires souvent peu ou pas détaillées dans les articles scientifiques.

Table des matières

Avant-propos	i
Table des matières	iii
1 Protocole de photographies de gonades	1
2 Protocole d'histologie	15
3 Article pour <i>Nature Protocols</i>	53
4 Lexique ovogenèse de <i>Pleuronectess platessa</i>	69
5 Lexique ovogenèse de <i>Mullus surmuletus</i>	105
6 Lexique ovogenèse de <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	141
7 Lexique ovogenèse de <i>Lepidorhombus boscii</i>	177
8 Protocole de lectures stéréologiques	211

Publication 1

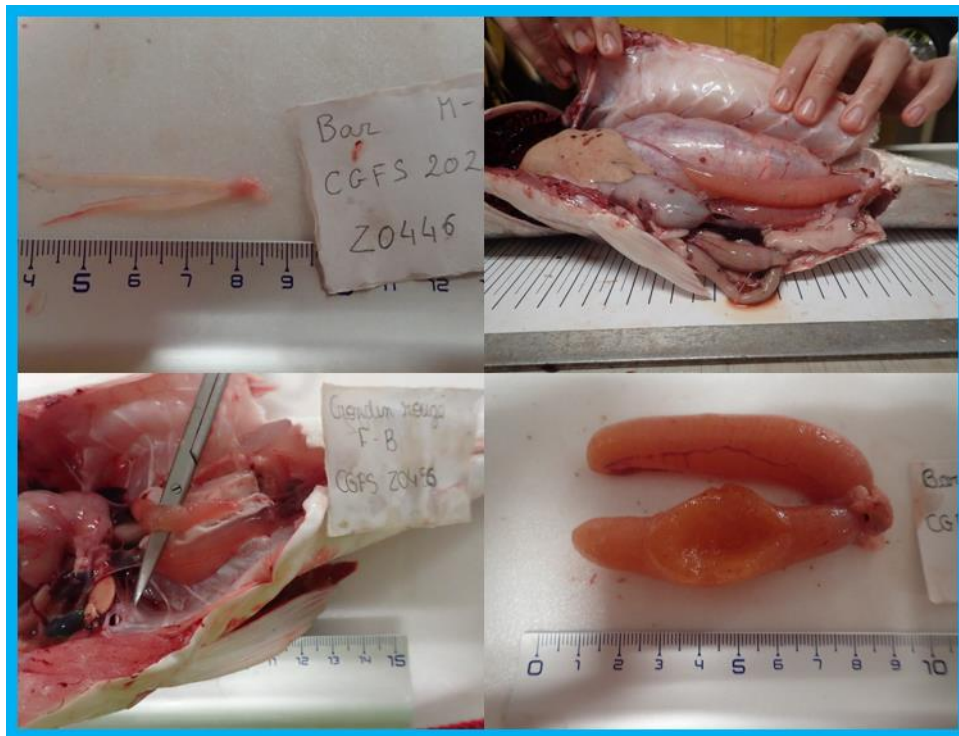
Protocole de photographies de gonades

Citation : Le Meleder, A., Sauger, C., Dubroca, L. (2022) «Fish gonads' photography protocol ». 11 pp. DOI : <https://doi.org/10.13155/89703>

Résumé : Protocole pour la prise de photos standardisées utilisées pour l'illustration des fiches d'aide à l'identification des phases de maturité des espèces récoltées lors des campagnes halieutiques *EVHOE*, *CGFS* et *IBTS*. Les versions en anglais et en français sont disponibles dans *Archimer* (<https://archimer.ifremer.fr/doc/00785/89703/>). Les fiches d'identification sont disponibles ici : <https://lm-anna.github.io/MaturityScaleTools/>

Contribution : Encadrement pour la création, conception et rédaction du document en français et en anglais. Mise en place de la méthodologie avec Anna Le Meleder et prise des photos.

Fish gonads' photography protocol



LE MELEDER Anna¹
SAUGER Carine¹
DUBROCA Laurent¹

September 2022 – V.1.2



¹ : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, IFREMER, Laboratoire Ressources Halieutiques de Port-en-Bessin, 14520 Port-en-Bessin-Huppain, France.

FISH GONADS' PHOTO PROTOCOL

The maturity phases used here is based on the **ICES WKASMSF scale**.

It is recommended to take several pictures at different angles at each step of the photographing process to ensure at least one exploitable photo.

Each photo must be taken with a **graduated scale** and an **ID sheet** indicating the species, the sex and the maturity phase of the individual (+ geographical origin if possible)

Immature individuals :	Individuals with milt or roe:
<p>Highlight the transparency of gonads with a metal object placed underneath</p> 	<p>Take a photo before opening the abdominal cavity</p> 

For all maturity phases :

- Open the fish's abdominal cavity with a scalpel or a knife without damaging the gonads
- Properly clear out and separate the inner lining of the cavity, leaving the other organs around the gonads
- If needed, maintain the lining with pins
- Place the fish on a white background so as to have optimum lighting for the gonads (for less glint, dry the gonads with paper towel)
- If possible, clean out blood, stomach contents and parasites
- Take photos of **both gonads in the abdominal cavity with the other organs around**
- Remove the other organs with a scalpel
- Take photos of **both gonads in the abdominal cavity without the other organs around**
- Remove both gonads from the fish with a scalpel without damaging or separating them
- If possible, keep both gonads attached to each other, as found in the abdominal cavity
- Still on a white background, take photos of **both gonads outside the abdominal cavity**

		
<p>1 - Gonads inside the abdominal cavity with organs + ID tag</p>	<p>2 - Gonads inside the abdominal cavity without organs</p>	<p>3 - Gonads outside the abdominal cavity</p>

1 – Context

Many scientific campaigns to assess abundances and fish stock distributions are being carried out in European coastal waters to measure the ecological and economic impacts of the fishery resource exploitation. In the context of annual scientific campaigns, maturity data acquisition is carried out for species of commercial interests. This data collection is partially undertaken during scientific prospecting missions and relies mostly on a visual estimation of sexual maturity (Coppin et al., 2019; Le Roy et al., 2020). A multitude of maturity scales and protocols have been established for maturity staging, leading to an overabundance of scales and staging methods that differ from country to institutions to species. The scale established in 2012 by the International Council for the Exploration of the Sea (ICES) during a Workshop named « *Workshop for maturity staging chairs* » is one of them. This maturity scale has been created with the idea of being a universal scale, regardless of the species or sex of the individual, while respecting the species' biology and reproductive cycle (WKASMSF) (ICES, 2012, 2018, 2020). It is divided in 6 phases, with 3 of these categories with 2 possible subphases to take into consideration for batch spawners and species with long spawning cycles. Moreover, a visual estimation of the sexual maturity through the observation of the gonads with the naked eye is the simplest method. This universal scale is, therefore, the most used scale by IFREMER (Coppin et al., 2019; Le Roy et al., 2020).

In order to help with the identification of maturity phases, a tool was provided: the maturity identification guide (Garren & Le Roy, 2021). This guide based on the ICES 2018 maturity scale is a compilation of files with simple commentary and photos, describing the different aspects of males and females gonads for different species. A total of 13 species/family of bony fish are represented: anchovy, sea bass, monkfish, sea bream, *Gadidae sp.*, red gurnard, herring, mackerel, hake, flat fish, red mullet, sprat and sardine. These summary sheets allow visual identification of maturity phases while on board. The creation of this guide stemmed from François GARREN and Didier LE ROY and their experience on data gathering during scientific campaigns and the use of ICES scales. Their goal was to provide a simple and reliable tool to help with maturity identification. It is for now, the only tool available, and shows some imperfections. In fact, many phases either do not have photos to represent them or are of low quality, which does not convey a realistic representation of the gonads' visual aspects. Therefore, it has been requested to improve these sheets with simple commentary and new photos, for a more faithful representation of the reality out on the field. This request falls within the project for the harmonisation of maturity data acquisition methods for bony fish of commercial interest.

From this context, this protocol has been created with the purpose of acquiring as many photos as possible, for different types of maturity phases of each sex and species from French fisheries, and to set up colour chart to help with the visual colour identification of gonads. This protocol was established during the scientific campaigns CGFS, EVHOE and IBTS of 2021 and 2022, and ACCOBIOM in the Caribbean islands, and details the photography method used for fish gonads, as well as the collected data usage (Lazard et al., 2022; Le Roy et al., 2021). It is important to clarify that the photos are taken depending on the species available at every trawl hauls and the needs of the campaigns. Photos are taken for each species, each sex and each maturity phases.

2 - Protocol

2.1 Equipment list

The equipment listed below must be prepared before every fish gonads' photography. This list is not exhaustive but aims to standardize the content of the photos included in a database.

- **White background**, polystyrene plate type,
- **Camera** (no specific model) with charger,
- **Millimeter ruler**, preferably longer than the sample,
- **Identification paper** (ID tag),
- **Dissection equipment** (scissors, scalpel, scalpel blade, knife...),
- **Safety pins**,
- **Absorbent paper**.

During scientific campaigns, it is also important to think about keeping the photos that have been taken every day and saving them on a **hard disk** or an **SD card**.

2.2 Photography

In order to get the best gonad representation possible, with the best angle of view, it is recommended to take several pictures. For that, three different types of shots were taken:

- Photos of the gonads in the cavity with the other organs
- Photos of the gonads in the cavity without the other organs
- Photos of the gonads outside of the cavity

Prior preparation of the camera and the picture area is strongly recommended, to take into account the area's lighting and avoid glints from overexposure. Photos must be taken with white or black background to contrast with the fish and its gonads that may be translucent. A ruler is used for scale, and it is recommended to indicate the individual's species, sex and maturity phase on a little piece of paper (ID tag) (**Figure 1 and 2**). The area and date of sampling may also be noted.

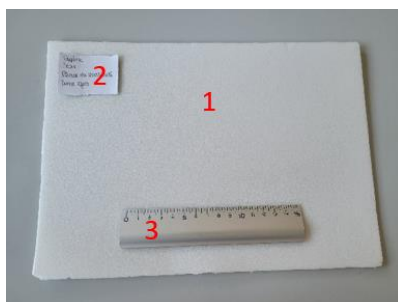


Figure 1. Fish gonads' photoshoot workbench: 1) White background, 2) ID tag, 3) ruler.

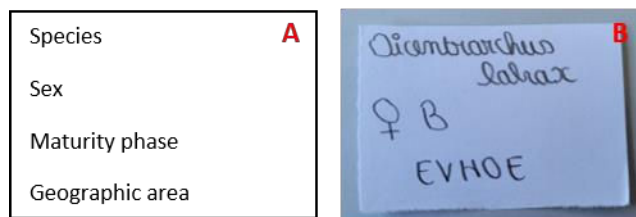


Figure 2. A) Main details to indicate in the ID tag; B) ID tag example.

Gonads are located inside the abdominal cavity, making it necessary to open it. The location within the cavity differs between round fish and flat fish. In both cases, it is recommended to start opening with small scissors or a scalpel through the uro-genital opening. This opening is located on the ventral part of fish, which is underneath rounded fish and on the left/right side of flat fish (**Figure 3**). The goal is to open the abdominal part and reveal the abdominal cavity and the different organs within. It is crucial to be cautious while opening at every step of the protocol in which gonads are involved, to avoid cutting through them or ripping them out.

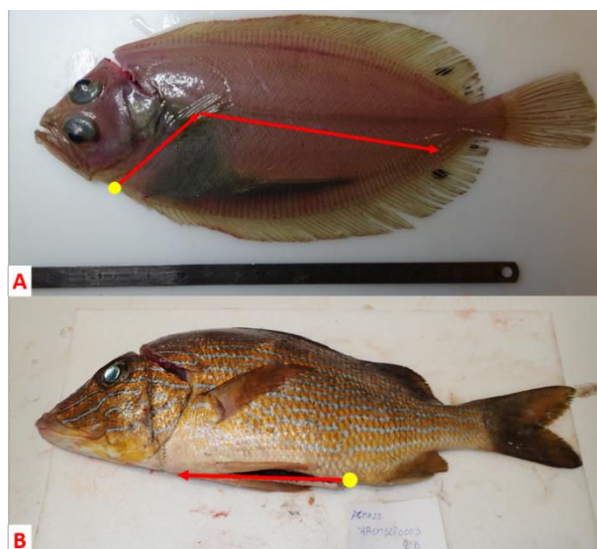


Figure 3. Abdominal cavity opening section for A) flat fish and B) round fish (red arrows) starting from the uro-genital opening (yellow circle).

In order to take the two first types of photos, it is important to wide open the cavity, clearing off the extra flesh to the sides and pinning them backwards to give a clear sight of the gonads, with the best lighting (**Figure 6a and b**). To do that, it is possible to use pins and cut out the extra flesh with the scalpel to clear off the sides as much as possible (**Figure 4 and 5**).



Figure 4. Examples of fish's abdominal cavity open with safety pins (red circles).



Figure 5. Possible additional notches (red areas) to help the opening of the fish's' abdominal cavity.

For the second type of photo, the other organs are either pushed aside or cut out from the cavity, depending on the species or the size of the gonads (**Figure 6b**). It is also recommended to remove the lining that attaches the gonads to the inner cavity and other organs. Finally, blood or stomach contents that could be in the cavity must be cleaned out. The photo can be taken when the gonads are cleared from the other organs but still within the abdominal cavity.

For the final picture, the gonads must be taken out of the cavity (**Figure 6c**). For that, the lining attaching the gonads to the inner cavity must be completely removed with a knife or a scalpel. It is recommended to keep both gonads attached to each other, as originally found in the cavity.



Figure 6. The 3 types of photography: a) gonads inside the fish with other organs; b) gonads inside the fish without organs; c) gonads outside the fish

When taking the picture of an A individual, it can be interesting to highlight the transparency of the gonad by putting the tip of a knife blade, or any other coloured equipment, underneath it (**Figure 7a**). In the same way, if it is a phase C individual (spawning), it can be useful to show the

“fluent” criteria (**Figure 7b**). For female gonads, cutting open the gonad is also a good way to show on the photos that there are non-hydrated or hydrated eggs (**Figure 7c**).



Figure 7. Different types of particular case photography: a) with knife blade; b) individuals with milt; c) open gonads

2.3 Data usage

A database with photos taken for this protocol, as well as an Excel file gathering all the details about those photos, have been established in order to complete and improve the maturity identification tool for fish of commercial interest. In the database, photos are sorted and categorized in folders depending on the species, the sex and the maturity phase of the individuals. Moreover, species are identify by their scientific names. Here is the path to each photos in the database :

Photo_MATURITE > Species scientific name > Sex > Maturity phase

Example : Photo_MATURITE > Dicentrarchus labrax > M > A

The photos in the database must be in “.jpg” format. No specific dimension is required. This database can be found in the website ZENODO.

All the information regarding the individuals in the photos of the database are gathered in the Excel file “photo_mat” in the “ALL” sheet (**Figure 8**). Here are the details listed in the table for each photo:

- **“Name”** : Name of the photo;
- **“Type”** : Type of the photo (INT = inside without organs, INT ORG = inside with organs, EXT = outside, EXT OUV = outside and open, FLUANT = fluent) ;
- **“sppeng”** : Vernacular name of the species or species group;
- **“Species”** : Scientific name of the species or species group;
- **“Sex”** : Sex of the fish;
- **“phase ID”** : Maturity phase (WKASMSF)
- **“Link”** : Link to the photo;
- **“splatTRUE”** : Scientific name of the species;

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Name	Type	sppeng	Species2	Sex	Link	spplatTRU	spp	Date	Campaig	ICES : res	Color	Comm	
2	P5250141	INT	Honeycomb co	<i>Acanthostr</i>	F	C:\Users\lale\Acanthostr	Honey		13/06/2022	ACCOBIOM	Arc	Antillais		
3	P5250142	INT	Honeycomb co	<i>Acanthostr</i>	F	C:\Users\lale\Acanthostr	Honey		13/06/2022	ACCOBIOM	Arc	Antillais		
4	P5250145	EXT	Honeycomb co	<i>Acanthostr</i>	F	C:\Users\lale\Acanthostr	Honey		13/06/2022	ACCOBIOM	Arc	Antillais		
5	P5250146	EXT	Honeycomb co	<i>Acanthostr</i>	F	C:\Users\lale\Acanthostr	Honey		13/06/2022	ACCOBIOM	Arc	Antillais		
6	P5250147	EXT	Honeycomb co	<i>Acanthostr</i>	F	C:\Users\lale\Acanthostr	Honey		13/06/2022	ACCOBIOM	Arc	Antillais		
7	P5250148	EXT	Honeycomb co	<i>Acanthostr</i>	F	C:\Users\lale\Acanthostr	Honey		13/06/2022	ACCOBIOM	Arc	Antillais		
8	P5250108	INT	Honeycomb co	<i>Acanthostr</i>	F	C:\Users\lale\Acanthostr	Honey		13/06/2022	ACCOBIOM	Arc	Antillais		

Figure 8. Details for each photo that must be reported (except the link in red) in the Excel file.

BIBLIOGRAPHIE

Coppin, F., Goascoz, N., Le Roy, D., & Giraldo, C. (2019). *Compte rendu de la campagne CGFS 2019 sur le N/O Thalassa*. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00598/70986/69467.pdf>

Garren, F., & Le Roy, D. (2021). *Fiches d'identification de la maturité sexuelle des poissons d'intérêts commerciaux de l'Atlantique Nord, Manche, Mer du Nord*.

ICES. (2012). *Report of the Workshop for maturity staging chairs (WKMATCH)*. ICES CM 2012\ACOM:58, 59.

ICES. (2018). *Report of the Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF)*. ICES CM/EOSG: 38. 75 pp., 79.

ICES. (2020). *Working Group on Biological Parameters (WGBIOP)*.
<https://doi.org/10.17895/ICES.PUB.7651>

Lazard, C., Auber, A., & Bled Defruit, G. (2022). *INTERNATIONAL BOTTOM TRAWL SURVEY (IBTS)*.
<https://doi.org/10.18142/17>

Le Roy, D., Giraldo, C., & Coppin, F. (2020). *Compte rendu de la campagne CGFS 2020 sur le N/O Thalassa* (p. 39). RBE-STH-LBH / RBE-HMMN-LRHBL. Rapport intermédiaire.
<https://archimer.ifremer.fr/doc/00664/77623/>

Le Roy, D., Martin-Baillet, V., & Giraldo, C. (2021). *Compte-rendu de la campagne CGFS 2021 sur le N/O Thalassa*. 50.

Publication 2

Protocole d'histologie

Citation : Sauger, C., Parrad, S., Dubroca, L., Kellner, K., Villain-Naud, N. (2023) «Protocoles pour l'étude histologique de gonades de poissons marins». 36 pp.

Résumé : Recueil de protocoles utilisés lors de cette thèse pour la conception de lames histologiques ovariennes de poissons marins lors de cette thèse. Les étapes présentes vont de la dissection de l'individu frais au stockage des échantillons, en passant par la fixation, la déshydratation, la mise sous paraffine, la coupe au microtome, la coloration et le montage entre lames et lamelles. Une version française adaptée aux protocoles utilisés au laboratoire halieutique d'**Ifremer** de Port-en-Bessin a été publiée dans **Archimer** (<https://archimer.ifremer.fr/doc/00849/96087/104163.pdf>).

Contribution : Création, conception et rédaction du document français avec prise des photos. Correction linguistique pour la version anglaise.

Système d'Informations Halieutiques

Action Paramètres biologiques

Carine Sauger¹
Sophie Parrad¹
Laurent Dubroca¹
Kristell Kellner²
Nadège Villain-Naud²



Janvier 2023 – V.1.0

1 : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, IFREMER, Laboratoire Ressources Halieutiques de Port-en-Bessin, 14520 Port-en-Bessin-Huppain, France.

2 : Université de Caen Normandie, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (UMR 8067 BOREA) MNHN, Sorbonne Université, UCN, CNRS-7208, IRD, UA, équipe EMERGE, Esplanade de la Paix 14032 Caen, France

Protocoles pour l'étude histologique de gonades de poissons marins

Protocoles pour l'étude histologique de gonades de poissons marins

Version	Date	Commentaires
1.0	Janvier 2023	Conception du document

Sommaire

<i>1. Contexte</i>	5
<i>2. Échantillonnage et fixation</i>	6
2.1. Paramètres macroscopiques à récolter	8
2.2. Étiquettes d'identification pour les cassettes	9
2.3. Extraction des gonades pour les poissons marins plats	9
2.4. Extraction des gonades pour les poissons marins ronds.....	11
2.5. Homogénéité cellulaire.....	13
<i>3. Redécoupe</i>	14
<i>4. Déshydratation et inclusion en paraffine</i>	16
4.1. Déshydratation Manuelle	17
4.2. Déshydratation avec automate.....	18
4.3. Inclusion en blocs de paraffine.....	19
<i>5. Coupes au Microtome</i>	21
<i>6. Colorations et montage des lames</i>	23
6.1. Trichrome de Prenant-Gabe	25
6.2. Bleu Alcian - PAS	26
6.3. Montage entre lame et lamelle	27
<i>7. Nettoyage et stockage</i>	28
7.1. Nettoyage des lames	28
7.2. Stockage des lames et blocs de paraffine.....	28
<i>Bibliographie</i>	29
<i>Annexes</i>	31

1. Contexte

Ce recueil de protocoles a été mis en place dans le cadre du projet MATO (MATurité Objective des poissons par histologie quantitative), et dans le cadre de la thèse de Carine Sauger. MATO a pour but d'améliorer la détermination de la maturité sexuelle chez certaines espèces en utilisant l'histologie couplé à la stéréologie.

Ce présent document (version 1.0 de janvier 2023) recueille les protocoles utilisés pour l'étude de gonades femelles de poissons marins et aux différentes structures cellulaires retrouvées dans les ovaires pour les espèces suivantes : la plie (*Pleuronectes platessa*), la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*), la cardine quatre tâches (*Lepidorhombus boscii*), le rouget barbet de roche (*Mullus surmuletus*) et le merlan bleu (*Micromesistius poutassou*).

Les protocoles présents détaillent les méthodes utilisées, de la récolte de l'échantillon frais jusqu'au montage de la lame histologique et sa coloration, en passant par l'inclusion dans la paraffine.

Pour la méthode détaillée de la lecture des lames via la stéréologie, référez-vous à '**Stereology reading protocol**' (Dubroca *et al.*, 2022). Pour les descriptions détaillées des cellules de la lignée germinale d'une des espèces citées ci-dessous, référez-vous à leurs lexiques.

Nous remercions le laboratoire BOREA de l'Université de Caen Normandie pour les protocoles présentés ci-dessous.

2. Échantillonnage et fixation


Liste du matériel :

- Kit de dissection (Scalpel, sonde cannelée, ciseau, pince fine)
- Appareil photo
- Planche de dissection
- Règle graduée en centimètres
- Couteau
- Cassettes d'inclusion (histocassettes)
- Crayon de papier
- Feutre fin
- Pochettes/Eppendorf pour les otolithes
- Balance de précision (à 0.01g)
- Balance (max 5Kg, précision 1g)
- Boite de pétri (pour peser les gonades)
- Étiquette d'identification pour les histocassettes ([Annexe 1](#))
- Étiquette d'identification du poisson
- Feuille de prise de données ([Annexe 2](#))
- Réfrigérateur (4-1°C)
- Sorbonne
- Flacon plastique de prélèvement avec opercule (2L)
- Éprouvette graduée (1000ml)
- Poubelle produits liquides chimiques
- Poubelle déchets laboratoire (aiguilles et lames)
- Poubelles déchets chimiques
- Papier absorbant
- Gants en Nitrile



Liste des produits :

- Fixateur de Davidson ([Annexe 4](#))
 - Les échantillons doivent être complètement submergés.
 - Ne pas dépasser les 1.8L par flacon de prélèvement (évite les déversements accidentels lors de la manipulation)
 - Les flacons doivent être correctement identifiés (date, nom du projet, espèces, produit)

- Le fixateur de Davidson étant une **substance dangereuse (classification H315, H319, H317, H341 et H350 selon le règlement CE n°1272/2008)**, sa manipulation doit se faire **sous sorbonne avec des gants en Nitrile et les protections adaptées** (blouse, lunettes de protection, chaussures fermées,...)
- Éviter l'inhalation de produits toxiques (Davidson & butanol) 
- Les flacons doivent être rangés dans un endroit adapté : **NE PAS LES STOCKER DANS UN FRIGO AVEC DES PRODUITS DESTINÉS À LA CONSOMMATION**

2.1. Paramètres macroscopiques à récolter

Les données à récolter dans l'[Annexe 2](#) sont les suivantes :

- **ID Poisson** (IFREMER : **ID Otolithe**)
- **Nom espèce** (IFREMER : Index de codification type Rubin)
- **Division CIEM** (Division du CIEM où l'individu a été pêché)
- **Rectangle Stat CIEM** (Rectangle statistique halieutiques du CIEM où l'individu a été pêché)
- **Date** (JJ/MM/AAA)
- **Longueur totale poisson** (Précision au 1cm ou ½cm, arrondi à l'inférieur)
- **Poids poisson non vidé** (Précision de 1g, arrondi à l'inférieur)
- **Présence parasites** (Présence : Y ou Absence : N)
- **Age**
- **Maturité visuelle** (Échelle SMSF du CIEM, 2018)
- **Poids foie en g** (Précision de 0.01g, arrondi à l'inférieur)
- **Poids gonade dorsale/droite en g** (Précision de 0.01g, arrondi à l'inférieur)
- **Poids gonade ventrale/gauche en g** (Précision de 0.01g, arrondi à l'inférieur)
- **Nombre de sections**
- **Navire** (IFREMER : Nom du navire ayant effectué la pêche)
- **Code_Station** (Donnée campagne IFREMER)
- **LatDec** (Donnée campagne IFREMER)
- **LongDec** (Donnée campagne IFREMER)
- **Depth (m)** (Donnée campagne IFREMER)

La **Longueur totale du poisson** et le **Poids non vidé du poisson** doivent être pris en suivant les recommandations préconisées par les **protocoles des campagnes associées** (IFREMER : Guides d'identification SIH (Garren, 2020)).

Le **ID Otolithe** est un identifiant unique à l'individu. Il est généré par Imagine (Ellebode *et al.*, 2022). Cet identifiant suivra l'échantillon tout au long de son traitement et les informations associées seront incorporées à la base de données Imagine, comme préconisé par l'IFREMER.

Le **Nombre de sections** est le nombre d'échantillon gonadique extrait de l'individu. Par exemple : si, pour un individu, une section a été échantillonnée pour les 2 ovaires, il y a donc 2 échantillons pour cet unique individu. Indiquer « 2 » dans cette colonne pour cet individu.

2.2. Étiquettes d'identification pour les cassettes

Pour chaque échantillon, une étiquette d'identification ([Annexe 1](#)) en papier classique et de taille standardisée aux cassettes d'inclusion sera placée dans chaque histocassette, pliée en deux. L'**ID Otolithe** inscrite sur l'étiquette sera générée par Imagine (Ellebode *et al.*, 2022) et peut être écrit sur l'étiquette au crayon de papier, ou à l'encre d'imprimante.

Sur chaque étiquette, mettre l'**ID Otolithe** + **position de la gonade échantillonnée**

- Étiquette pour poissons plats :
 - Gonade ventrale = **ID Otolithe + V**
 - Gonade dorsale = **ID Otolithe + D**
- Étiquette pour poissons ronds :
 - Gonade gauche = **ID Otolithe + G**
 - Gonade droite = **ID Otolithe + D**

Exemple d'une étiquette :



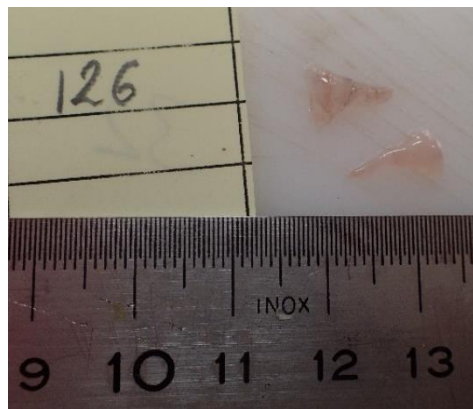
Ne rien écrire sur la partie grisée !
C'est la partie qui sera incluse dans le bloc de paraffine

2.3. Extraction des gonades pour les poissons marins plats

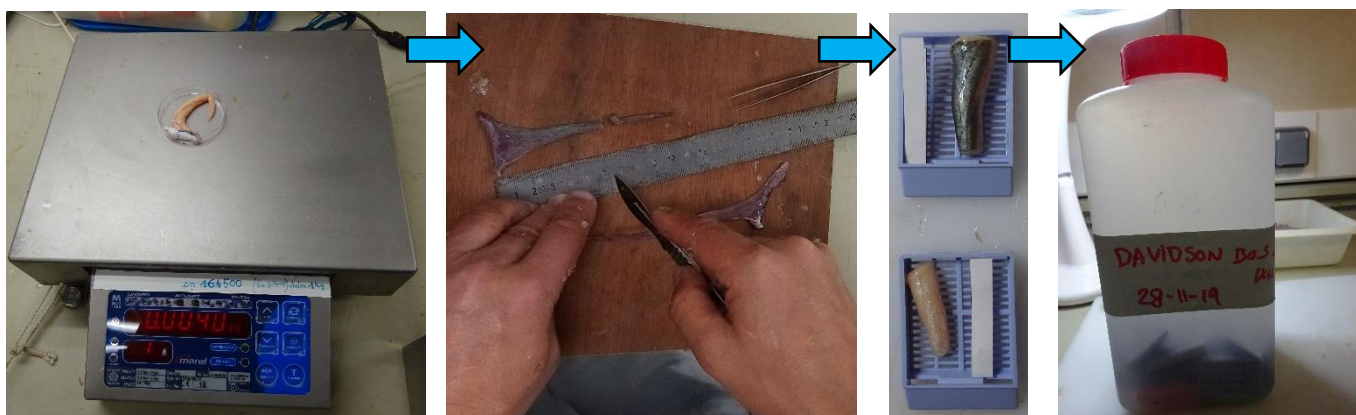
- **Peser**, au gramme arrondi à l'inférieur à l'aide de la balance et **mesurer** (au cm arrondi à l'inférieur) l'individu.
- **Récolter les otolithes** dans une pochette/Eppendorf étiqueté avec l'**ID Otolithe** de l'individu.
- En plaçant le poisson sur le ventre, faire une incision en diagonale passant en dessous de la caudale, puis parallèle à la ligne latérale. Déplier la chair afin de **mettre en évidence la gonade dorsale sans la couper**, comme montré ci-dessous (Le Meleder *et al.*, 2022).
- **Estimer la phase de maturité** en suivant les critères de l'échelle SMSF (CIEM, 2018).
- **Prendre une photo** de l'individu en entier, sur un fond blanc (ou de couleur uniforme) avec la gonade apparente dans la cavité, une règle et son **ID Otolithe**.



- **Extraire délicatement la première gonade.** Chez les femelles, il faudra sectionner l'ovaire à la base de l'oviducte, là où les 2 ovaires sont connectés entre eux, afin de pouvoir le sortir de la cavité. **La gonade extraite du dos du poisson plat est la gonade dorsale (D).** Celle extraite depuis le ventre est la ventrale (V).
- Retourner le poisson en le mettant sur le dos et faites la même incision que précédemment afin d'**extraire la gonade ventrale.**
- **Prendre une photo des deux gonades** détachées, à l'extérieur de la cavité sur un fond blanc (ou de couleur uniforme), avec une règle graduée et son **ID Otolithe**. Si possible, séparer les deux gonades et **positionner la gonade dorsale en dessus de la gonade ventrale.**



- **Peser séparément chaque gonade** sur la balance de précision (à 0.01g).
- **Vérifier la présence de parasites** dans le poisson.
- **Récupérer le foie et le peser** sur la balance de précision (à 0.01g).
- Si les gonades ont une longueur de plus de 3 cm, **faire une section de 2 cm dans la partie centrale de la gonade.** **Attention à prendre une section où la paroi gonadique n'est pas éventrée !**
- Placer **une section de gonade à plat dans une histocassette** avec une **étiquette d'identification** ([Annexe 1](#)). Éviter de faire toucher l'échantillon et l'étiquette en papier.
- Fermer l'histocassette et, sous une sorbonne avec des gants en nitrile, **submerger les histocassettes dans le fixateur de Davidson** pendant **24h à 48h** au réfrigérateur (48h pour les gros échantillons d'ovaire avec œufs hydratés).



2.4. Extraction des gonades pour les poissons marins ronds

- **Peser** (au gramme arrondi à l'inférieur) et **mesurer** (au cm arrondi à l'inférieur) l'individu.
- **Récolter les otolithes** dans une pochette/Eppendorf étiquetée avec l'**ID Otolithe** de l'individu.
- En plaçant le poisson sur le dos, faire une **incision aux ciseaux** allant de l'**orifice génital jusqu'au niveau des nageoires pelviennes**. Afin de ne pas endommager les gonades qui peuvent se retrouver juste en dessous, il est fortement conseillé d'utiliser une **sonde cannelée**. Par la suite, faite **quatre incisions en diagonales** (comme indiqué ci-dessous en pointillés noirs) : deux partant de l'orifice génitale et deux passant sous les nageoires pelviennes.



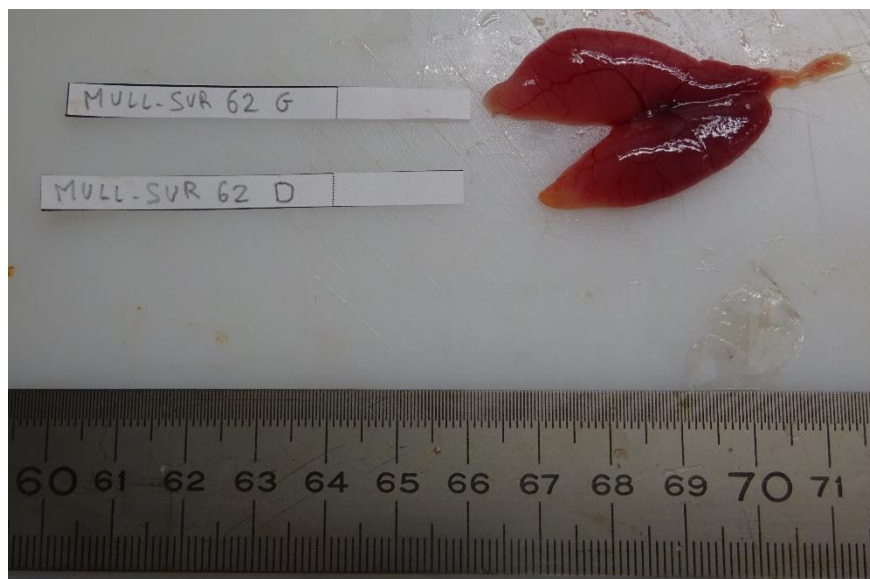
- Déplier la chair afin de **mettre en évidence les gonades** et **prendre une photo** de l'individu en entier, sur un fond blanc (ou de couleur uniforme) avec la gonade apparente dans la cavité, une règle et son **ID Otolithe**.



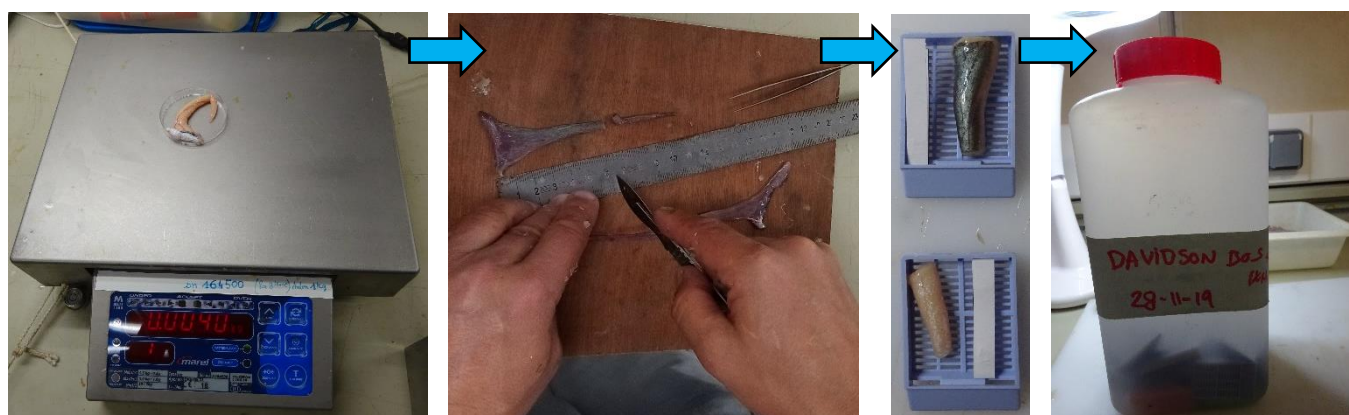
- **Estimer la phase de maturité** en suivant les critères de l'échelle SMSF (CIEM, 2018).
- **Extraire délicatement les deux gonades** en sectionnant à la base de l'orifice génitale. Attention à l'orientation des gonades. En ouvrant le poisson par le ventre et en orientant la tête de l'individu vers la gauche, la **gonade dans la partie supérieure du poisson sera la gauche (G)** et la **gonade dans la partie inférieure sera la droite (D)**.



- Prendre une photo des deux gonades détachées, à l'extérieur de la cavité sur un fond blanc (ou de couleur uniforme), avec une règle et son **ID Otolithe**.



- Chez les femelles, les deux ovaires sont souvent connectés entre eux vers la partie médiane ou inférieure des ovaires. Cela implique qu'il y a de **forts risques de déchirements de la paroi gonadique lors de la séparation des ovaires**.
- **Séparer les deux gonades et peser les séparément** sur la balance de précision (à 0.01g).
- **Vérifier la présence de parasites** dans le poisson.
- **Récupérer le foie et le peser** sur la balance de précision (à 0.01g).
- Si les gonades ont une longueur de plus de 3 cm, **faire une section de 2 cm dans la partie centrale de la gonade**, en **favorisant une section où la paroi gonadique n'est pas éventrée !**
- Placer **une section de gonade à plat dans une histocassette** avec une **étiquette d'identification** ([Annexe 1](#)). Éviter de faire toucher l'échantillon et l'étiquette en papier.
- Fermer l'histocassette et, sous une sorbonne avec des gants en nitrile, **submerger les histocassettes dans le fixateur de Davidson** pendant **24h à 48h** au réfrigérateur (48h pour les gros échantillons d'ovaire avec œufs hydratés).



2.5. Homogénéité cellulaire

La première fois qu'un suivi histologique pour une espèce est mis en place, il est nécessaire de vérifier l'homogénéité cellulaire au sein de la gonade. Cela permet de contrôler si il y aura des différences de structures cellulaires en fonction de l'endroit de prélèvement de la section dans la gonade.

Cette vérification se fait :

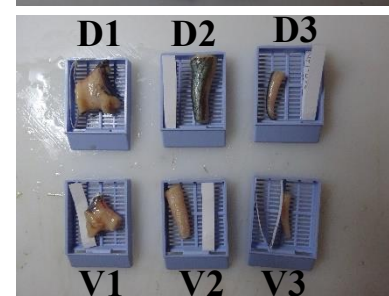
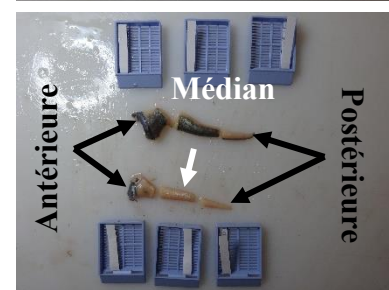
- **qu'une seule fois par espèce et par sexe**
- sur 15 individus à des phases de maturité identiques (de préférence pêchés en même temps)
- pas sur des individus immatures
- avec des gonades de plus de 4cm de long
- éviter les individus en ponte si possible

La méthodologie d'échantillonnage est identique à celle présentée aux sections 2.3 et 2.4, la seule différence intervient lors de la coupe des gonades, après les avoir pesées et prises en photos.

- Orienter les gonades afin d'avoir la gonade Dorsale/Gauche en haut et la Ventrale/Droite en bas. La partie de la gonade qui était la plus proche de la tête du poisson est orientée à gauche, c'est la partie antérieure de la gonade. La partie de la gonade qui était la plus proche de la queue du poisson est orienté vers la droite, c'est la partie postérieure de la gonade.
- **Couper les gonades en 3 sections de au moins 1cm (2cm maximum).** Une section dans la partie antérieure, une section dans la partie médiane de la gonade et une section dans la partie postérieure. **Attention à ne pas éventrer la paroi gonadique des sections !**
- Dans chaque histocassette, mettre une **étiquette d'identification** (*Annexe 1*) avec l'**ID Otolithe** + **position de la gonade échantillonnée** + **la position de la section**. **Position section : 1 = Antérieure, 2 = Médian, 3 = Postérieure**
- Exemple d'étiquette pour une section centrale de la gonade dorsale (D2) d'une cardine quatre tâche (LEPIBOS) :

23LEPIBOS003-0010 D2

- Placer **une** section de **gonade à plat** dans **chaque histocassette**. Éviter de faire toucher l'échantillon et l'étiquette en papier.
- Fermer l'histocassette et, sous une sorbonne avec des gants en nitrile, **submerger les histocassettes dans le fixateur de Davidson** pendant **24h à 48h** au réfrigérateur (48h pour les gros échantillons d'ovaire avec œufs hydratés).



3. Redécoupe

Liste du matériel :

- Scalpel
- Pince plate
- Papier absorbant
- Longues pinces Inox (30cm)
- Gants en Nitrile
- Sorbonne
- Réfrigérateur
- Crayon de papier
- Étiquette d'identification pour les histocassettes ([Annexe 1](#))
- Flacon plastique de prélèvement avec opercule (2L)
- Poubelle produits liquides chimiques inflammables (avec entonnoir de sécurité)
- Poubelle déchets laboratoire (aiguilles et lames)
- Bidons poubelles adaptées pour déchets liquides de laboratoire

Liste des produits :

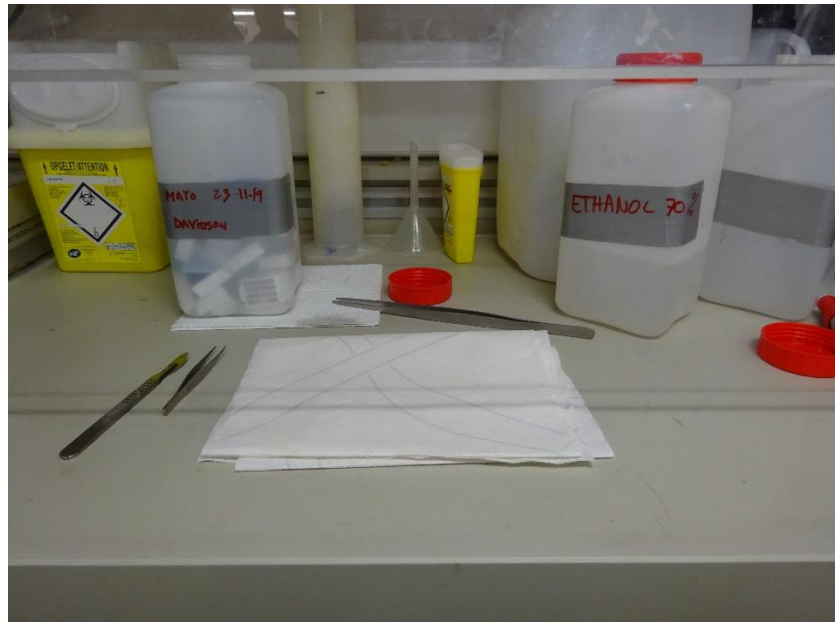
Pour toutes dilutions d'éthanol, se référer à la table de Gay-Lussac ([Annexe 3](#)).

- Ethanol 70°

Après avoir séjournée **dans le fixateur de Davidson pour une durée de 24h à 48h à 4°C, les échantillons** prendront une texture caoutchouteuse et **doivent être placés dans de l'éthanol 70°**.

Pour cela, **sous une sorbonne et en portant des gants en nitrile**, utiliser une grande pince en inox pour retirer les histocassettes du fixateur de Davidson et les poser sur du papier absorbant. Le papier absorbant viendra absorber le trop plein de fixateur.

Si le fixateur de Davidson est trouble (utilisation pour plus de 150 échantillons et/ou après des ovaires riches en ovocytes hydratés), il est possible de vider dans une poubelle adaptée (poubelle produits liquides inflammables avec entonnoir de sécurité) afin de récupérer les histocassettes plus rapidement.



Pour chaque histocassette, vérifiez que l'étiquette ne soit pas collée à l'échantillon. Si

c'est le cas, il y a de forts risques que l'étiquette se déchire lorsque vous la décollez de l'échantillon. Une nouvelle étiquette en papier devra donc être préparée.

Par la suite, recouper un bord de chaque échantillon, afin de préparer un bord droit pour l'inclusion et faciliter la coupe.

Replacez l'échantillon et l'étiquette dans l'histocassette avant de la refermer et la submerger dans l'éthanol à 70°. Les échantillons peuvent rester plusieurs mois dans l'éthanol à température ambiante.



Déchets :

- Le fixateur de Davidson et l'éthanol sont à éliminer dans un bidon **UN 1993 LIQUIDE INFLAMMABLE + étiquette CMR**.

4. Déshydratation et inclusion en paraffine

Liste du matériel :

- Bar de Leuckart/Moules
- Pince chauffante/chauffée
- Couteau à mastiquer/Grattoire
- Étuve 60°C
- Réfrigérateur
- Sorbonne
- Plaque en plastique
- Bêcher en inox avec bec verseur + poignée
- 2 Grands béciers en plastique (1000ml)
- Grande pince en inox (30cm)
- Gants nitrile
- Blouse
- 5 contenants refermables pour les bains
- Paraffine
- Papier absorbant
- Marqueurs
- Bidons poubelles adaptées pour déchets liquides de laboratoire

Liste des produits :

Pour toutes dilutions d'éthanol, se référer à la table de Gay-Lussac ([Annexe 3](#)).

- Ethanol à 70°
- Ethanol à 95°
- Ethanol à 100°
- Butanol 100°

Nettoyage de paraffine :

- **Sur les surfaces** : utiliser un couteau à mastiquer pour enlever le gros des morceaux et les éclaboussures de paraffine. Passer une éponge avec de l'eau chaude et savon liquide. Terminez le nettoyage avec du papier absorbant imbibé légèrement d'éthanol à 70°.
- Pour les **outils en inox** (pinces, pics) : les enrouler dans du papier absorbant et les passer à l'étuve une nuit à une température légèrement supérieure au point de fusion de la paraffine.
- **Histocassettes vides (+béciers)** : placer les histocassettes vides dans un grand bêcher à l'étuve à une température légèrement supérieure au point de fusion de la paraffine pour que celle-ci coule au fond du récipient, puis passer les à la machine (ou laver manuellement à l'eau chaude et au savon).


4.1. Déshydratation Manuelle

Suite à la redécoupe des échantillons, ces derniers passent 24 à 48h dans de l'éthanol 70°, voire plusieurs semaines si besoin.

Avant la déshydratation manuelle, n'oubliez pas de faire fondre la paraffine en avance dans deux béciers en étuve à une température légèrement supérieure au point de fusion de la paraffine utilisée (60°C).

Changer les bains de paraffine quand ceux-ci ne sont plus limpides.

Changer les bains d'éthanol et butanol au bout de 3 fournées d'échantillons, ou si les alcools sont colorés ou troubles.

- Manipulations sous sorbonne avec des gants en Nitrile et vêtements de protection.
- Éviter l'inhalation de produits toxiques (fixateur de Davidson & butanol) 
- Utiliser la grande pince en inox pour passer les échantillons d'un flacon à un autre

- 1- Ethanol à 70° pendant 24 à 48h voire plusieurs semaines si besoin
- 2- Ethanol à 95° pendant 24 à 48h
- 3- Ethanol à 100° pendant 24 à 48h
- 4- Butanol 100° pendant 24 à 48h voire plusieurs semaines si besoin
- 5- Mise en paraffine liquide pendant 12 à 24h dans l'étuve à 60°C
- 6- Changement du bain de paraffine pendant 12 à 24h dans l'étuve à 60 °C
- 7- Inclusion des échantillons ([Section 4.3](#))

Déchets :

- Le fixateur de Davidson, l'éthanol et le butanol sont à éliminer dans les bidons **UN 1993 LIQUIDE INFLAMMABLE + étiquette CMR.**
- La paraffine après solidification par refroidissement est à jeter dans des fûts (car présence de butanol dans les bains de paraffine) **UN 2926 SOLIDE ORGANIQUE INFLAMMABLE, TOXIQUE**

4.2. Déshydratation avec automate

Les échantillons sont placés dans le fixateur de Davidson pendant 12 à 24h, à 4°C, puis déshydratés dans un automate Leica TP 1020 selon le programme suivant :

Grosses pièces sur 48h

- 1- Ethanol 70° : 1h
- 2- Ethanol 70° : 3h
- 3- Ethanol 95° : 3h
- 4- Ethanol 95 ° : 4h
- 5- Ethanol 100° : 3h
- 6- Ethanol 100° : 4h
- 7- Ethanol 100° : 6h
- 8- Butanol 100° : 2h
- 9- Butanol 100° : 4h
- 10- Butanol 100° : 6h
- 11- Paraffine : 4h
- 12- Paraffine : 8h

Les prélèvements sont ensuite inclus ([Section 4.3](#)).

Déchets :

- Le fixateur de Davidson, l'éthanol et le butanol sont à éliminer dans les bidons **UN 1993 LIQUIDE INFLAMMABLE + étiquette CMR**.
- La paraffine après solidification par refroidissement est à jeter dans des fûts (car présence de butanol dans les bains de paraffine) **UN 2926 SOLIDE ORGANIQUE INFLAMMABLE, TOXIQUE**

4.3. Inclusion en blocs de paraffine

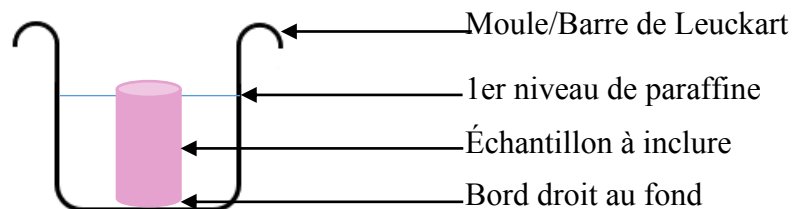
Manipulations avec gants en nitrile et blouse

Une fois les échantillons ayant fini de séjourner dans le deuxième bain de paraffine liquide, ils sont prêts à être inclus dans un bloc de paraffine.

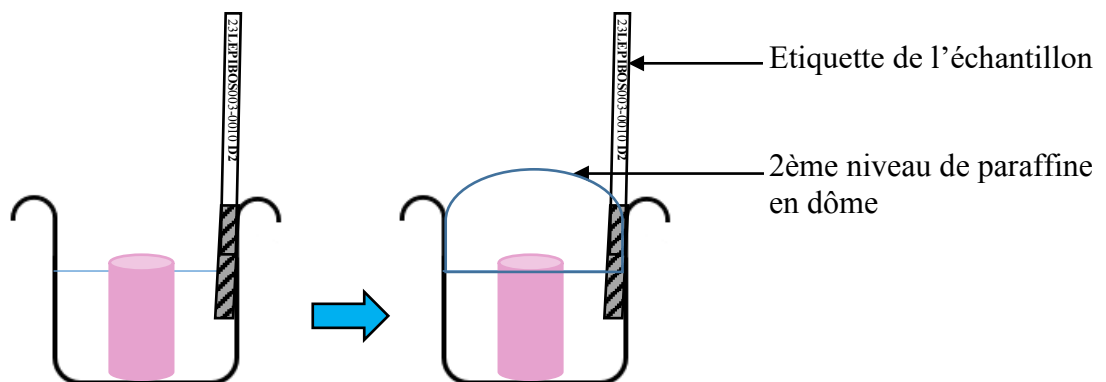
- Faire fondre préalablement la paraffine dans un distributeur à paraffine (60°C)
- **Remettre le bécher verseur avec la paraffine dans l'étuve entre chaque utilisation !**
- Éviter de mettre les mains sur le bécher (engendre refroidissement et colmatage de paraffine)
- Utiliser une pince chauffante lors de la manipulation des échantillons
- **Remettre la pince fine dans l'étuve, sur un morceau de papier absorbant, entre chaque utilisation !**
- Sortir les histocassettes une à une pour éviter le colmatage de la paraffine

Pour un échantillon :

- A l'aide d'une grande pince en inox, sortir une cassette du bain de paraffine
- Poser la cassette sur la plaque en plastique, l'ouvrir et à l'aide de la petite pince chauffée, enlever l'échantillon et son étiquette
- Sortir le bécher en inox de l'étuve et remplir le moule/barre de Leuckart au $\frac{3}{4}$ de paraffine
- Remettre le bécher dans l'étuve et prendre la pince chauffée
- Avec la pince chauffée, poser l'échantillon à la verticale au centre du moule, le bord plat (redécoupé) doit être positionné tête bas sur le fond du moule



- Rajouter l'étiquette de l'échantillon sur le rebord, en insérant la moitié de la partie grisée de l'étiquette dans la paraffine. La partie écrite doit se trouver côté extérieur, pour pouvoir ensuite la replier sur l'échantillon.



- Remettre la pince fine dans l'étuve et sortez le bécher en inox afin de compléter le moule avec de la paraffine, jusqu'à obtenir un dôme de paraffine.
- Remettre le bécher en inox contenant la paraffine dans l'étuve.

Pour un démoulage immédiat, attendre au moins 15 minutes que la paraffine durcisse.

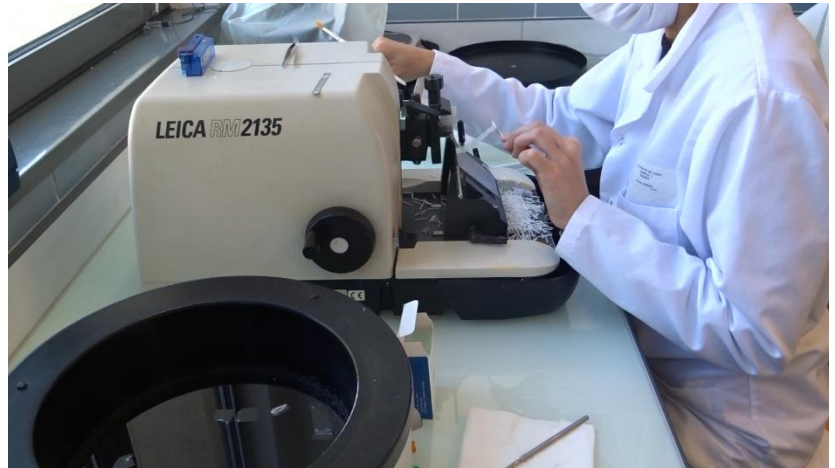
Pour un démoulage plus tardif, mettre le moule au frigo.

Laisser les échantillons en blocs de paraffine au moins 24h au réfrigérateur avant la coupe au microtome !

5. Coupes au Microtome

Liste du matériel :

- Microtome (+ lames)
- Bain marie (55°C avec eau osmosée)
- Étuve 37°C
- Blouse
- Pince fine/plate
- Pic en inox
- Papier absorbant
- Lames histologiques
- Crayon de papier
- Pinceau fin poils souples
- Pinceau moyen poils semi-rêches
- Plateau recouvert de papier absorbant
- Microscope
- Glaçons



Nettoyage de paraffine :

- **Sur les surfaces** : utiliser un couteau à mastiquer pour enlever le gros des morceaux et les éclaboussures de paraffine. Passer une éponge avec de l'eau chaude et savon liquide. Terminez le nettoyage avec du papier absorbant imbibé légèrement d'éthanol à 70°.
- Pour les **outils en inox** (pinces, pics) : les enrouler dans du papier absorbant et les passer à l'étuve une nuit à une température légèrement supérieure au point de fusion de la paraffine.
- Microtome : Enelever la lame avant de passez un pinceau souple pour enlever les gros copeaux de paraffine. Démontez les parties amovibles afin de bien récupérer tous les morceaux de paraffine. Finir le nettoyage en essuyant le tout avec papier absorbant imbibé d'éthanol.

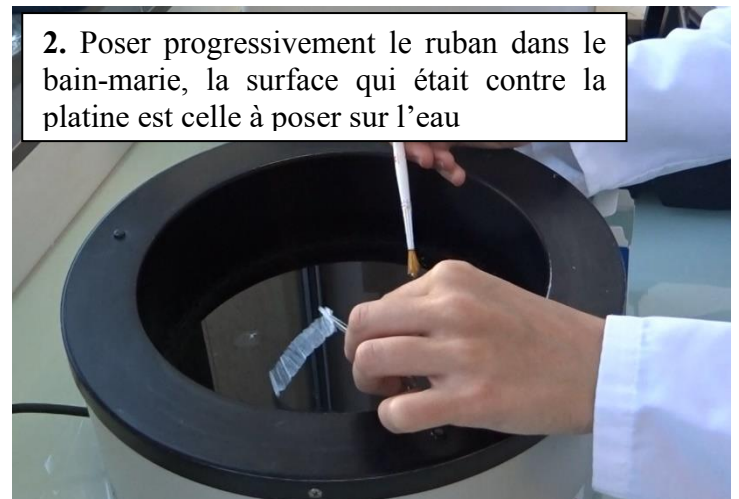
La manipulation d'un microtome nécessite une formation de sécurité au préalable !

- Garder les blocs de paraffine sur de la glace avant de les couper (facilite la coupe)
- Couper en sections de 3µm
- Mettre la platine à un angle de 5° pour les gros échantillons (plus de 5mm)
- Utiliser une lame usagée pour dégrossir le bloc de paraffine
- Utiliser une lame neuve pour la coupe afin d'éviter les stries provoquées par l'utilisation de lames usagées
- Ne pas prendre la première coupe du ruban
- Garder un geste à vitesse régulière permet de ne pas avoir de pliures sur les coupes
- Dans le bain-marie (température à 10°C en dessous du point de fusion de la paraffine), ne pas laisser les coupes plus de 2 minutes (risque que les structures se gonflent d'eau)
- Choisissez les sections les plus jolies (section entières et complètes). Pour les séparer, utiliser le pic sur les jointures entre deux sections
- Mettre plusieurs sections d'un même échantillon par lame
- Éviter les sections avec des pliures, bulles d'air et stries
- Éviter de mettre les échantillons trop près des bords de la lame
- **Vérifier que la paroi gonadique est complète !** (microscope)

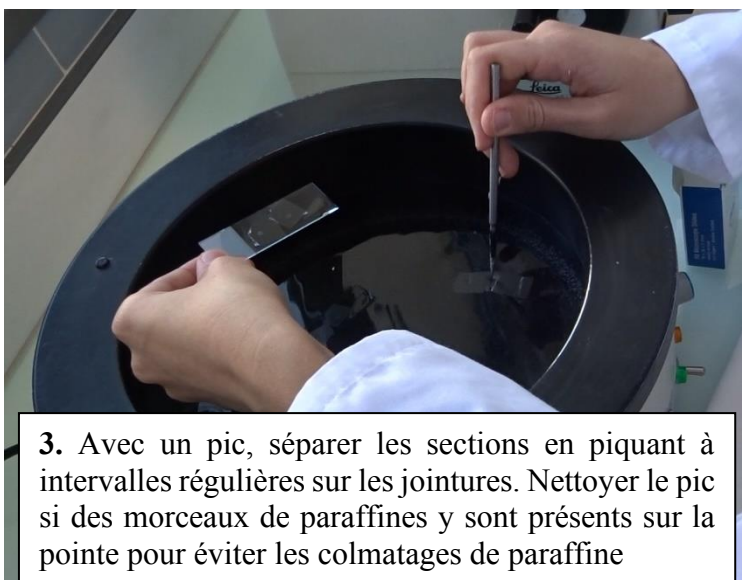
Annoter les lames au crayon de papier et les mettre dans l'étuve (37°C) au moins 12h (peut rester plusieurs jours) sur un plateau recouvert de papier absorbant.



1. Décrocher le ruban de la platine pour l'amener au bain-marie



2. Poser progressivement le ruban dans le bain-marie, la surface qui était contre la platine est celle à poser sur l'eau



3. Avec un pic, séparer les sections en piquant à intervalles régulières sur les jointures. Nettoyer le pic si des morceaux de paraffines y sont présents sur la pointe pour éviter les colmatages de paraffine



4. Avec un pic, ramener délicatement les sections sur un lame submergée dans le bain-marie

6. Colorations et montage des lames

Liste du matériel :

- Sorbonne
- Gants en nitrile, blouse, chaussures fermées,...
- Chronomètre
- Scotch + marqueur
- Papier absorbant
- Balance de précision (à 0.01g) couverte
- Éprouvette graduée 500ml
- Éprouvette graduée 1000ml
- Filtres (à café)
- Entonnoir
- Cuillère-spatule
- Coupelle flexible (aluminium) pour peser les poudres
- 16 Cuves pour coloration de lames
- Porte lames (x2 de préférence pour faire deux colorations en parallèle)
- Bidons poubelles adaptées pour déchets liquides de laboratoire
- 8 Flacons brun ou recouverts d'aluminium pour stockage des produits à l'obscurité

Liste des produits :


Pour toutes dilutions d'éthanol, se référer à la table de Gay-Lussac ([Annexe 3](#)).

- Ethanol 100°
- Ethanol 95°
- Ethanol 70°
- Roti-histol
- Vert Lumière 0.2% ([Annexe 5](#))
- Hématoxyline de Groat ([Annexe 5](#))
- Eosine 1% ([Annexe 5](#))
- Acide phosphomolybdique 1% ([Annexe 5](#))
- Acide acétique 3% ([Annexe 6](#))
- Bleu Alcian ([Annexe 6](#))
- Acide périodique 0.5% ([Annexe 6](#))
- Scott's tap water ([Annexe 6](#))
- Eau distillée

Après séchage des lames dans une étuve à 37°C (une nuit minimum), les lames peuvent être colorées.

La coloration au **trichrome de Prenant-Gabe** met en évidence les tissus conjonctifs en vert, les muqueuses en rose et les noyaux en gris.

La coloration au **Bleu Alcian** est à utiliser pour mettre en évidence les alvéoles corticales.

Toutes les étapes suivantes se déroulent par bain des lames dans les différentes solutions, sous une sorbonne, avec port de blouse et gants en nitrile, pour éviter de respirer les vapeurs d'alcool, de roti-histol et de roti-histo-kit. 

6.1. Trichrome de Prenant-Gabe

Déparaffinage :

- 1- Roti-histol : 5 minutes
- 2- Roti-histol : 5 minutes

Hydratation :

- 3- Ethanol 100° : 5 minutes
- 4- Ethanol 100° : 5 minutes
- 5- Ethanol 95° : 5 minutes
- 6- Ethanol 70° : 5 minutes
- 7- Eau distillée : passage

Ces manipulations se font
sous une sorbonne, avec port de
blouse, et gants en nitrile
obligatoires !

Coloration :

- 8- Hématoxyline de Groat 1% : 1 minute précisément (coloration des noyaux en gris ardoise)
Les solutions d'hématoxyline contiennent de l'hématéine et un mordant métallique (sels d'aluminium ou de fer). Ce mordant est responsable de la coloration.
- 9- Eau courante : rinçage jusqu'à éclaircissement
- 10- Eau distillée : Passage
- 11- Eosine Y aqueux 1% : 8 minutes (coloration du cytoplasme en rose). L'éosine colore les cytoplasmes en rose et les fibres dans une gamme de roses plus ou moins vifs selon l'acidophilie des différents éléments
- 12- Eau distillée : rinçage
- 13- Acide phosphomolybdique 1% aqueux : 30 secondes (différentiation éosine/vert lumière)(à changer après 3 passages)
- 14- Vert lumière aqueux 0.2% : 30 secondes (coloration du tissu conjonctif en vert)

Déshydratation :

- 15- Ethanol 100° : 5 minutes (premier bain à changer à chaque passage)
- 16- Ethanol 100° : 5 minutes
- 17- Roti-histol : 5 minutes (à changer dès que besoin)

Déchets :

- Les alcools + colorants, alcool + roti-histol et le roti-histokit sont à éliminer dans les bidons **UN 1993 LIQUIDE INFLAMMABLE TOXIQUE**
- L'éosine et le vert lumière ne sont pas toxiques. Il convient de les éliminer dans un bidon **UN 3082 MATIERE DANGEREUSE DU POINT DE VUE DE L'ENVIRONNEMENT LIQUIDE**
- L'hématoxyline de Groat est à éliminer dans un bidon **UN 2810 LIQUIDE ORGANIQUE TOXIQUE** (présence de métaux lourds, toxiques)

6.2. Bleu Alcian - PAS

Ces manipulations se font sous une sorbonne, avec port de blouse, gants en nitrile et lunettes de sécurité obligatoires !
En cas de contact, rincer les yeux et la peau avec de l'eau.

Procédure :

- 1- Déparaffiner et hydrater les lames contenant les coupes de tissus en paraffine
- 2- Colorer avec le bleu d'Alcian pendant 15 minutes
- 3- Rincer à l'eau courante durant 2 min
- 4- Rincer à l'eau distillée
- 5- Traiter avec l'acide périodique durant 5 min
- 6- Bien rincer à l'eau distillée
- 7- Colorer avec le réactif de Schiff's durant 10min
- 8- Bien rincer à l'eau courante durant 5 min
- 9- Colorer les noyaux avec de l'hématoxylin durant 2 min
- 10- Rincer à l'eau courante durant 2 min
- 11- Faire un bain avec de l'alcool acidifié durant 30 sec
- 12- Rincer avec Scott's tap water 30 sec
- 13- Faire un bain d'eau distillée
- 14- Déshydrater les lames
- 15- Effectuer 1 bain dans du roti-histol
- 16- Monter les lames

Déchets :

- Les colorants et le roti-histol sont à éliminer dans un bidon **UN 1992 LIQUIDE INFLAMMABLE TOXIQUE**
- L'éthanol est à éliminer dans un bidon **UN 1993 LIQUIDE INFLAMMABLE**

6.3. Montage entre lame et lamelle

Liste du matériel :

- Lamelles
- Roti-histol kit
- Pipettes compte-gouttes jetables
- Gants nitrile
- Blouse
- Sorbonne
- Plaque en plastique
- Planche avec du papier absorbant
- Étuve (60°C)
- Ethanol (95°)
- Bidons poubelles adaptées pour déchets liquides de laboratoire

Sous sorbonne, en portant blouse, gants en nitrile et lunettes de sécurité, monter les lamelles sur les lames en utilisant du Roti-histol kit. Éviter les bulles d'air et ne pas laisser la lamelle dépasser de la lame.

Mettre les lames montées sur un plateau recouvert de papier absorbant, et mettre le tout en étuve (60°C) 24h pour la polymérisation de la colle. Elles peuvent ensuite être sorties, nettoyées et rangées ([Section 7](#)).

Le nettoyage de la paillasse peut se faire à l'éthanol. Les lames et lamelles cassées doivent être jetées dans une poubelle jaune pour déchets de laboratoire.

7. Nettoyage et stockage

Liste du matériel :

- Scotch
- Sachets « ziploc »
- Ethanol
- Lame de rasoir
- Papier absorbant
- Boîtes de rangement de lames
- Boîte en carton



7.1. Nettoyage des lames

Si un excédent de Roti-histo kit est sur les lames, il est possible d'enlever le gros de l'agent collant en grattant avec une lame. Submerger la lame quelques minutes dans de l'éthanol peut aussi ramollir la colle afin de l'enlever plus facilement. Avant de scanner les lames, bien les nettoyer avec un papier absorbant imbibé d'éthanol.

Ranger les lames dans une boîte à lames histologiques.

7.2. Stockage des lames et blocs de paraffine

Si les lames histologiques ne sont plus utilisées, elles peuvent être rangées dans les petites boîtes en carton qui contenaient les nouvelles lames histologiques. Annoter correctement les boîtes (espèce, sexe, date, projet).

Les blocs de paraffine avec échantillon peuvent être entourés de scotch. Un tour de 1½ de scotch suffit pour recouvrir la partie du bloc coupé (avec l'échantillon en vue) et l'étiquette. **Attention de scotcher l'étiquette dans le bon sens, afin de pouvoir lire le nom de l'échantillon !**

De plus, il est conseillé de ranger les blocs dans des sachets « ziplocs », annotés correctement (espèces, sexe, date, projet). Ces sachets peuvent ensuite être ranger dans un carton, stocker dans un endroit sec, frais et ventilé.

Bibliographie

Bankhead, P. et al. (2017). **QuPath: Open source software for digital pathology image analysis**. Sci. Rep. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>

Brown-Peterson, N.J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B.J., Lowerre-Barbieri, S.K. (2011). **A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes**. Mar. Coast. Fish. 3, 52-70.

Elleboode Romain, Badts Vincent, Prigent Glenn, Aumond Yoann, Dussuel Antoine (2022). **Guide d'utilisation de l'exécutable QrCodeGenerator**. <https://doi.org/10.13155/86231>

Gabe, M. (1968). **Techniques Histologiques**, 2nd ed., Masson.

Garren Francois (2020). **Fiches d'aide à l'identification. Poissons, céphalopodes et décapodes. Mer du Nord, Manche, Golfe de Gascogne et mer Celtique**. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00353/46431/>

ICES (2012). **Report of the Workshop for maturity staging chairs (WKMATCH) 11-15 June 2012, Split, Croatia**.

ICES (2017). **Report of the Workshop on Sexual Maturity staging from histological tools (WKMATHEIS) 19-21 September 2017, Caen, France**.

ICES (2018). **Report of the Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF) 30 April - 4 May 2018, Copenhagen, Denmark**. ICES CM/EOSG:38.

Le Meleder Anna, Sauger Carine, Dubroca Laurent (2022). **Protocole de photographie des gonades de poisson / Fish gonads' photography protocol**. RBE-HMMN-LRHPB. <https://doi.org/10.13155/89703>

R. Martoja & M. Martoja-Pierson (1967). **Initiation aux techniques de l'histologie animale**. Masson et Cie Editeurs. 120 bd St Germain, Paris-VI. 346 pp.

Quinquis, J., Adeline, B., Elie, N., Mahé, K. (2018). **Protocole de détermination des critères macroscopiques de gonades de poissons représentatifs des stades I et IIa en vue de leur discrimination à l'oeil nu**. <http://sih.ifremer.fr/>

Sauger, C., Quinquis, J., Dubroca, L., Parrad, S., Kellner, K., Heude-Berthelin, C. (2019). **Sample collection protocol for the extraction of female gonads in the megrim (*Lepidorhombus spp.*) for maturity staging through histology**. IFREMER, <https://doi.org/10.13155/70724>

Sauger, C., Kellner, K., Heude-Berthelin, C. (2020). **Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the megrim, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792)**. IFREMER

Dubroca Laurent, Heude-Berthelin Clothilde, Kellner Kristell, Le Meleder Anna, Martin Valentine, Sauger Carine (2022). **Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the red mullet, *Mullus surmuletus* (Linnaeus, 1758)**. <https://doi.org/10.13155/75174>

Dubroca Laurent, Elie Nicolas, Heude-Berthelin Clothilde, Kellner Kristell, Le Meleder Anna, Lepoittevin Mélanie, Martin Valentine, Nivet Timothe, Sauger Carine, Villain-Naud Nadège (2022). **Stereology reading protocol when using quantitative histology for the determination of sexual maturity in fish ovaries**. <https://doi.org/10.13155/75173>

Tyler, C.R., Sumpter, J.P. (1996). **Oocyte growth and development in teleosts**. Rev. Fish Biol. Fish., Chapman & Hall 6, 287-318.

Annexe 2 : Feuille de prise de données

ID Otolithe	Nom espèce	Division CIEM	Rectangle Stat CIEM	Date	Longueur totale poisson (cm)	Poids poisson non vidé (g)	Présence parasites	Age (an)	Maturité visuelle	Poids foie (g)	Poids gonade dorsale/droite (g)	Poids gonade ventrale/gauche (g)	Nombre de sections	Navire	Code_Station	LatDec	LongDec	Depth (m)	

Annexe 3 : Table de Gay-Lussac

Table pour la dilution de l'alcool (Table de Gay-Lussac) appelée aussi Table de mouillage de l'alcool

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55	
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64	
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85	

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en mL à ajouter à 100mL d'alcool de concentration initiale **x (en bleu)** pour obtenir la concentration désirée.

Exemple : la table indique qu'il faut ajouter 105,34 ml d'eau à 100 mL d'alcool à 90° pour obtenir de l'alcool à 45°.

Attention : Le volume final est inférieur à la somme des volumes mis en jeu ! C'est le phénomène dit de « contraction de volume », variable en fonction du titre de l'alcool initial.

Annexe 4 : Davidson

Pour 4 litres de Davidson, ajouter dans l'ordre ci-dessous :

- 400ml de glycérol
- 800ml de formaldéhyde
- 1200ml d'éthanol 95°
- 1200ml d'eau de mer filtrée
- 360 ml d'acide acétique

- Manipulation sous sorbonne avec des gants en Nitrile et vêtements de protection.
- À conserver à 4°C
- Ajouter l'acide acétique au dernier moment avant utilisation
- Stockage pré-Davidson (sans acide acétique) plusieurs mois au frigo
- Stockage Davidson plusieurs semaines
- Changer le Davidson quand il est trouble

Annexe 5 : Colorants Trichrome de Prenant-Gabe

- Vert Lumière 0.2% :

- Vert Lumière (en poudre) **2g**
- Acide acétique (C₂H₄O₂) **10 gouttes**
- Eau distillée **QSP 1L**

Couleur verte

- Manipulation sous sorbonne avec des gants en Nitrile, blouse, chaussures fermées et lunettes de protection
- Filtrer avant usage
- Stockage indéfiniment à l'obscurité. Flacons brun ou recouverts d'aluminium pour stocker les produits
- Récupérable après usage

- Hématoxyline de Groat :

- Solution A :
 - Eau distillée **500ml**
 - Acide sulfurique concentré (H₂SO₄) **8ml**
 - Ammonium Fer III sulfate (H₄NO₈S₂Fe, 12H₂O – MW=482.19) **10g**
- Solution B :
 - Ethanol 95° **500ml**
 - Hématoxyline **5g**

Mélanger A + B. Attendre 30 minutes (dépôt).
Couleur violette

- Manipulation sous sorbonne avec des gants en Nitrile, blouse, chaussures fermées et lunettes de protection
- Filtrer avant usage
- Stockage 2 à 3 mois à l'obscurité. Flacons brun ou recouverts d'aluminium pour stocker les produits
- Changer quand couleur brune

- Eosine 1% :

- Eosine Y (ou B) **10g**
- Eau distillée **QSP 1L**

Couleur rouge

- Manipulation sous sorbonne avec des gants en Nitrile, blouse, chaussures fermées et lunettes de protection
- Filtrer avant usage
- Stockage indéfiniment à l'obscurité. Flacons brun ou recouverts d'aluminium pour stocker les produits
- Récupérable après usage

- Acide phosphomolybdique 1% :

- Acide phosphomolybdique (H₃[P(MO₃O₁₀)₄], 10H₂O – MW = 1824.96) **10g**
- Eau distillée **QSP 1L**

Couleur Jaune

- Manipulation sous sorbonne avec des gants en Nitrile, blouse, chaussures fermées et lunettes de protection.
- Stockage indéfiniment à l'obscurité. Flacons brun ou recouverts d'aluminium pour stocker les produits
- Changer après quelques passages

Publication 3

Article pour *Nature Protocols*

Citation : Le Meleder, A., Sauger, C., Parrad, S., Kellner, K., Villain-Naud, N., Elie, N., Dubroca, L. (2023) «Sample collection protocol for maturity staging of marine fish through histology». 13 pp. (*In Draft*)

Résumé : Recueil de protocoles utilisés pour la conception de lames histologiques ovariennes de poissons marins dans un contexte halieutique. Les étapes sont décrites point par point les méthodologies allant de la dissection de l'individu frais au stockage des échantillons, en passant par la fixation, la déshydratation, la mise sous paraffine, la coupe au microtome, la coloration et le montage entre lames et lamelles. Cette version anglaise sera publiée dans *Nature Protocols*, un journal avec relecture par les pairs permettant la valorisation et la diffusion des protocoles développés pendant la thèse.

Contribution : Encadrement dans la création du document et correction linguistique.

Sample collection protocol for maturity staging of marine fish through histology

Anna Le Meleder¹, Carine Sauger¹, Sophie Parrad¹, Kristell Kellner², Nadège Villain-Naud², Nicols Elie³, Laurent Dubroca¹

¹Ifremer, HMMN, Laboratoire Ressources Halieutiques, F-14520 Port-en-Bessin, France. ²University of Caen Normandie, Unity Biology of Organisms and Aquatic Ecosystems (UMR 8067 BOREA), MNHN, Sorbonne University, UCN, CNRS, IRD, UAG, Esplanade de la Paix, 14032 Caen, France. ³University of Caen Normandie, UNICAEN, SF 4206 ICORE, CMABIO3, 14000 Caen, France

ABSTRACT

Estimating the sexual maturity stage of fish is based on subjective criteria and is a key parameter in stock assessments. Maturity staging through quantitative histology can provide additional and objective support to this visual observation. This document presents the histology process performed on female individuals from bony fish (Teleosts) species of commercial interests. Methods outline range from the collection of fresh samples to the inclusion in paraffin, as well as histological slide staining with Prenant-Gabe's trichrome. In addition, this protocol describes the sampling process used to verify cellular structure homogeneity within the ovary, but also a data collection process in accordance with the data requested by the International Council for the Exploration of the Sea for stock assessments. Results showed that the histological methods used provide quality cross sections allowing for detailed observations of ovarian sections. This histological protocol was set up for the determination of sexual maturity in Teleosts for fisheries.

INTRODUCTION

In a context of climate change, the exponentially growing need for resources and increasing fishing pressures, the assessment of the ecological status of fish stocks is a major global challenge. Therefore, many scientific campaigns to assess the abundance and the distribution of exploited stocks species are annually carried out to respond to the lack of knowledge on marine fish stocks. In Europe, as part of the "Data Collection Framework (DCF)", mandatory monitoring has been set up for several fish stocks, depending on their abundance and marketing values. The main goal of this monitoring is to produce abundance indexes, improve exploited species management and define the stock's status and evolution on a medium term scale. Every year, data on exploited stocks is thus collected through extensive sampling. Collected data is both qualitative and quantitative, and is used in assessments models to compile yearly advice in fishing opportunities, catch and effort. Most of these actions are being coordinated by the International Council for the Exploration of the Sea (ICES), the main contributor of management advice in Europe for the marine environment. Moreover, in order to standardize and produce viable assessments, data is collected by following protocols established by the ICES¹.

Sexual maturity is an essential parameter when monitoring exploited population, with the size and age at maturity being traits that will directly impact the individual's fitness, influencing the stock's productivity. To standardize sexual maturity data collected during scientific campaigns, the ICES set up a universal maturity scale for bony fish species during the "Workshop for maturity staging chairs (WKMATCH)", with terminologies further described by Brown-Peterson² *et al.* and answering to the European standards³. This generalised scale, updated during the "Workshop for advancing sexual maturity staging in fish (WKASMSF)" in 2018, can be applied on bony fish species, regardless of the sex, while taking into account the fishes' biology and reproductive cycle^{3,4}. With these documents, it is possible to determine sexual maturity through the study of the gonad's cellular content^{3,4}. However, because it is simple to apply and to implement routinely, the visual observation of macroscopic criteria is the most frequently used method for scientific prospecting, though it is also the least accurate²⁻⁵. Several newly developed tools, such as visual aids, have been produced to facilitate this observation⁶⁻⁹.

Development of the protocol

Histology is a medical and biological specialty whose objective is the microscopic study of tissues of living beings from the animal and plant kingdom. Originally called microscopic anatomy in the XVIIth century with the

appearance of the microscope, histology was further developed during the XIXth century with Marcelo Malpighi, an Italian medical professor. The initially experimental method underwent multiple evolutions, and is now used to acquire large amounts of information on biological and morphological structures frequently used with modern detection techniques to automatically identify and locate cellular tissues and structures^{10,11}.

Sexual maturity staging through quantitative histology is not a new method and is time consuming^{12,13}. Coupling maturity staging with a quantitative approach (stereology) is even more demanding time wise but will yield more data for a more accurate determination of the individual's sexual maturity phase¹⁴. As a method to stage sexual maturity for exploited fish stocks, little is referenced, or cross-reference to older publications^{15–20}.

The present document gathers methods, products and materials used for the study of gonads from female marine fishes as well as the study of different cellular structures found within ovaries. It was set up in order to improve sexual maturity staging for several species using histology, coupled with stereology (i.e. the quantitative study of the histological content of reproductive organs and the determination of a percentage from the present cellular structures). Although it is time-consuming and difficult to implement into routines, a stereological favours objectivity when determining the individual's sexual maturity according to cell types (Fig. 1). This method was used for several Teleost: plaice (*Pleuronectes platessa*)²¹, megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*)²², four-spot megrim (*Lepidorhombus bosci*)²³, striped red mullet (*Mullus surmuletus*)²⁴ and blue-whiting (*Micromesistius poutassou*). Most of the histological methods found in this protocol are based on methods described by Gabe²⁵, or were modified so as to answer our queries from a fisheries point of view, from the collection of fresh samples to the staining and mounting of histological slides, including inclusion in paraffin. Wanting to implement the stereology aspect, the slides were digitized for a more comfortable analyse of the sections.

Application of the method

With a trichrome stained histological section as an output from this method, the slides are suitable for either a qualitative or quantitative observation of the cellular structures found in ovaries, and can be digitized²⁶. The present protocol was set up so as to be applicable on marine female Teleost. The materials product quantities used are described for samples of less than 3cm and has already been carried out on the species mentioned above. However, it is possible to adapt volumes of products and materials depending on the number of samples used, certain species with gonads of a diameter larger than a glass slide would require a special set up for large samples.

Comparison with other methods

The methods described in this protocol are based on the histological protocol established by Gabe²⁵. However, histological protocols and methods for tissue samples from marine species are numerous and vary between each laboratory^{19,20,27,28}. A huge range of stain have been developed for histological process, with each of them a specific action on cellular structures^{27,29,30}. Alcian blue stain can be used on fish samples with the advantage of making it possible to characterize subtypes of acid mucins by adjusting its pH and then staining mucosubstances in blue³⁰. The stain used for this present protocol is the Prenant-Gabe trichrome staining method with haematoxylin, eosin and fast green stains²⁵. This methods result in connective tissues in green, cytoplasm in pink and nuclei in grey. It is the staining process that will highlight and differentiate the most cellular structures found in the ovaries and therefore make it easier to identify them. Resin can be used, instead of paraffin, as an inclusion media²⁷. The use of an inclusion resin is less time-consuming since the number of steps during dehydration, and their duration, are less important than that of paraffin^{19,27}. However, paraffin for inclusion is an easy medium to use and cheaper to implement for large-scale projects. It is also sufficient for the cellular identification of ovarian sections of marine bony fish.

Experimental design

During the gonad extraction, it is specified to take several photos of the fish and the gonads. These photos can be used as a visual reference when comparing the macroscopic aspect with the maturity phase determined after the histological process. They were standardized from a previously described method of gonad photography for fish of commercial interest⁶. Depending on the studied species, it is possible to collect the otoliths/scales/vertebrae to

add data on the individual's age. During data collecting, total length of the fish and ungutted fish weight data must be collected following the method recommended by the associated campaign protocol³¹. For any additional data not presented in this protocol, new section may be added to the data entry sheet presented through the process.

The materials used and the duration of each steps were established for samples with a maximum size of 2cm by 2cm, the maximum samples size that can be contain in large histocassettes (2.5x3cm). For larger sized samples, an increase in bath times might be necessary, but will not be covered in this protocol. On the contrary, if the desired sample size is smaller, it is possible to decrease samples bath times for time gain. Product volumes for baths must also be adapted according to the size and the number of samples. Products volume and bath period described here were applied for a batch of 30 samples (Fig. 1). Note that this histological protocol describes manual handling methods, but it is possible to carry out automatically the fixation, dehydration, staining and slide mounting steps with adapted devices.

Expertise needed to implement the protocol

Several products used for this method are flammable or toxic. It is necessary to be aware of how to safely use them (under a fume hood for example), as well as how to safely store them. Histology implies the use of sophisticated and complex devices that requires awareness or prior training and whose control is acquired over time and training. The cut of ovarian sections with a microtome requires safety training beforehand (Fig. 2). Similarly, the use of a scanner to digitize the ovarian sections also requires prior training and knowledge on the software, which are unique to each scanner models. The digitalized ovary sections can be read with QuPath³² software which also requires basic knowledge in the software³². The stereology reading process, as well as the knowledge needed to identify cellular ovarian structures, will not be described in this protocol. For more detail, refer to the "Stereology reading protocol"²⁶.

Limitations

The main limitation of this protocol is the difficulty to acquire fresh samples. If the samples are not fresh from the start, the slides obtained will be of mediocre quality, no matter how well the method is executed. The use of frozen fish can lead to uncertainties in the quality of the ovarian section due to the eventual damage of the cellular content. Moreover, the samples' extraction and fixation requires the use of dangerous substances, with the use of a fume hood. This must be anticipated to implement when samples are being collected out at sea. It is noteworthy to state that depending on the regulations of each country, bringing on board certain chemicals is not always allowed. In that case, it is still possible to carry out the protocol with individuals that have been kept on ice for a short period of time, all while taking into account the uncertainty of the samples' quality.

Histology processes can have an impact on ovarian cellular structures. During the dehydration process, lipids will be removed, leaving white (empty) forms behind. Moreover, since ethanol is used during the dehydration process, oocyte will reduce in size. These uncertainties in section quality results have to be noted but don't impact the stereology reading.

This protocol can be carried out on gonads for both male and female of every species of fish. However, only the non-hermaphrodite female individuals from marine bony fish species were studied with this protocol.

MATERIAL

REAGENTS

!CAUTION Refer to the appropriate material safety data sheet provided by the manufacturer. Be sure to handle chemical reagents under a fume hood and wear suitable personal protective equipment, including a laboratory coat, nitrile gloves and safety goggles.

- Fish gonad sections, obtained as described in step 1. **!CAUTION** All animal experiments must adhere to relevant local and institutional regulations.

- Davidson's fixative (see REAGENT SETUP) **!CAUTION** Davidson's fixative is flammable and toxic if inhaled, swallowed or absorbed through the skin.
- Ethanol (absolute, C_2H_6O , Mw=46.07) (CHIMIE-PLUS Laboratoires, ref.40079) For all ethanol dilutions, refer to the Gay-Lussac table **!CAUTION** Ethanol is flammable.
- Butanol (absolute, $C_4H_{10}O$, Mw=74.12) (CHIMIE-PLUS Laboratoires, ref.24022) **!CAUTION** Butanol is flammable and toxic if inhaled, swallowed or absorbed through the skin.
- Paraffin (VWR, ref.2079-A, Klinipath) **!CAUTION** There will be presence of butanol in paraffin waste after dehydration.
- Diasolv (Diapath, ref.X0016) **!CAUTION** Diasolv is flammable and toxic if inhaled, swallowed or absorbed through the skin.
- Fast Green (0.2°) ($C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$, Mw=792.86) (ROTH, ref.7706.3, see REAGENT SETUP) **!CAUTION** Fast Green is dangerous for the environment.
- Hematoxylin ($C_{16}H_{14}O_6.nH_2O$, Mw=302.28) (Sigmaaldrich, ref.H3136, see REAGENT SETUP) **!CAUTION** Hematoxylin is flammable.
- Eosin Y (1°) ($C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$, Mw=691.85) (Eosin Y disodium salt, Sigmaaldrich, ref.E4382, see REAGENT SETUP) **!CAUTION** Eosin is dangerous for the environment.
- Phosphomolybdic acid (1°) ($H_3[P(Mo_3O_{10})_4].nH_2O$, Mw=1825.25)(VWR, ref.20616.138, see REAGENT SETUP)
- Distilled water (dH_2O)
- Diamount (Diapath, ref.030400) **!CAUTION** Diamount is toxic if inhaled, swallowed or absorbed through the skin.
- Glycerol ($C_3H_8O_3$, Mw=92.09) (86°, ROTH, ref.7533.3)
- Formaldehyde (CH_2O , Mw=30.03) (37°, ROTH, ref.7398.5)
- Filtered sea water
- Acetic acid ($C_2H_4O_2$, Mw=60.05) (VWR, ref.20103.295)
- Sulphuric acid (H_2SO_4 , Mw=98.08) (95°, VWR, ref.20700.298)
- Ammonium Iron (II) sulphate hexahydrate ($H_8FeN_2O_8S_2.6H_2O$, Mw=392.13) (VWR, ref.24257.260)

EQUIPMENT

- Dissection kit (scalpel, surgical scissors, flat forceps, thin forceps, dissection knife)
- Thin tip permanent marker, pencil
- Groove director
- Long stainless steel forceps (30cm)
- Camera (We used Olympus TOUGH F2.0 model)
- Dissection board
- Graduated ruler (cm)
- Tissue processing embedding cassettes (Simport, ref.M512)
- Eppendorf (VWR, ref.525-1134) or envelope for otoliths
- Precision scale (>1kg, precision 0.01g)
- Scale (max5kg, precision 1g)
- Petri dish (or small container to hold the gonads)
- Tags for the tissue processing embedding cassettes, made with conventional paper (0.5x5cm)
- Identification tag for fish (little piece of paper with the ID Otolith number of the fish)(see Box 1)
- Data entry sheet to collect data (see Box1)
- Refrigerator (4-1°C)
- Fume hood
- Plastic sample bottle with seal (2L)
- Measuring cylinder (1000mL)
- Laboratory waste bin for needle, blades and glass slides
- Chemical waste bin
- Paper towel
- Silicon mould (24 mould, 14x2.6x1cm, Blumtal)

- Proofing over (60°C max)
- Stainless steel plate
- Stainless steel beaker with spout + handle (500mL) (BOCHEM, ref.8501)
- 5 resealable containers for bath (wide neck bottle)
- Microtome (Leica, ref.14045746960)
- Microtome razor blades (Microm Microtech35+, ref.201219-74)
- Water bath (55°C with reverse osmosis treated water)
- Strait tip teasing needle
- Glass microscope slides (GHÄASEL, ref.BPB036)
- Brush with soft bristles
- Microscope
- Ice
- Timers
- Filters
- Funnel (DUTSCHER, ref.PNB013)
- Spoon/micro-spatula
- 16 plastic tanks for slide staining (Simport, ref.M900-12B)
- Slide staining rack (Simport, ref.M900-12B)
- 8 brown glass bottles or aluminium-covered vials to store products in the dark
- Disposable pipettes (10mL, EPPENDORF, ref. 0030127722)
- Coverslips (2.4x5cm, Biosigma, ref.VB5650)
- Disposable dropper pipettes (VWR, ref.612-4494)
- Plastic plate
- Scanner (We used VS120 Olympus model driven by Olympus VS-ASW software)

REAGENT SETUP

Davidson's fixative: Can be purchased or prepared. For 4 L of solution, combine 400 mL of glycerol, 800 mL of formaldehyde, 1200 mL of 95° ethanol and 1200 mL of filtered sea water. Store at 4°C for up to several months. Add 360 mL of acetic acid before use. After adding the acetic acid, store at 4°C for up to several weeks. Reusable 2-3 times or until it becomes turbid.

Fast Green solution (0.2°): For 1 L of solution, dissolve 2 g of Fast Green in 1 L of distilled water. Add 10 drops of acetic acid. Filter before use. Store indefinitely in the dark at room temperature. Use a brown glass bottle or aluminium-covered vials to store in the dark. Reusable after each staining.

Eosin Y solution (1°): For 1 L of solution, dissolve 10 g of eosin Y in 1 L of distilled water. Filter before use. Store indefinitely in the dark at room temperature. Use a brown glass bottle or aluminium-covered vials to store in the dark. Reusable after each staining.

Phosphomolibdic acid solution (1°): For 1 L of solution, dissolve 10 g of phosphomolibdic acid in 1 L of distilled water. Store indefinitely in the dark at room temperature. Use a brown glass bottle or aluminium-covered vials to store in the dark. Reusable after each staining.

Hematoxylin solution: For 1 L of solution, prepare solution A and solution B in 1 L beakers. For solution A, dissolve 10 g of Ammonium Iron in 500 mL of distilled water and 8 mL of concentrated sulphuric acid. For solution B, in another beaker, dissolve 5 g of hematoxylin in 500 mL of distilled water. Mix solution A and B. Wait 30 minutes and filter before use. Store 2-3 months in the dark. Use a brown glass bottle or aluminium-covered vials to store in the dark. Reusable 2-3 times.

PROCEDURE

GONAD EXTRACTION / TIMING Variable (5-6 hours when 30 fish are sampled)

- (1) Gonadal extraction method vary between round fish (A) and, flat fish (B). There are also additional steps when the gonad's cellular homogeneity is to be tested (C). **CRITICAL STEP!** All data collected is to be reported onto the data entry sheet. See **Box 1** for further details.

(A) Gonad extraction for round fish

- (i) Weight (to the 1 g rounded down) with a scale and measure (to the 1 cm rounded down) the total length of the fish.
- (ii) Collect the otoliths and put them in an envelope/Eppendorf, with the ID Otolith (see **Box 1**) of the fish.
- (iii) Place the fish on its back, make an incision from the genital opening to the pelvic fins. **CRITICAL STEP!** To not damage the gonads, it is strongly advised to use a groove director.
- (iv) Make four diagonal incisions to unfold the flesh and bring into view the gonads without cutting them.
- (v) Take a photo of the whole fish with the gonads in the abdominal cavity, on a white background, with a graduated ruler and an identification tag for the fish with the ID Otolith (see **Box 1**).
- (vi) Estimate the maturity phase by following the WKASMSF scale criteria.
- (vii) Gently extract both gonads by cutting them at the base of the oviduct, where the two ovaries are connected to the genital opening, in order to get them out of the abdominal cavity. **CRITICAL STEP!** Keep track on which gonad is the left and right one. When the fish is placed with its head to the left and its tail to the right, the uppermost gonad is the left one (L), and the lowermost gonad is the right one (R).
- (viii) Take a photo of the two extracted gonads outside of the abdominal cavity.
- (ix) Separate gonads with a scalpel. **CRITICAL STEP!** For female fish, ovaries are often fused around their median or anterior area. This implies that there is a high risk of tearing the gonadal wall when separating them.
- (x) Weight both gonads individually on a precision scale (0.01g rounded down).
- (xi) Check the presence of parasites inside and outside of the fish.
- (xii) Extract the liver and weight it on a precision scale (0.01 g rounded down).
- (xiii) If the gonads are more than 3 cm long, make a 2 cm section in the median area of the gonad. **CRITICAL STEP!** Be careful not to take a section where the gonadal wall is torn or pierced.
- (xiv) Place a single gonad section in a flat position with its identification tag into a tissue processing embedding cassette. See **Box 1** for further details on paper tags. **CRITICAL STEP!** Avoid having the sample and the paper tag touching one another.

(B) Gonad extraction for flat fish

- (i) Weight (to the 1 g rounded down) with a scale and measure (to the 1 cm rounded down) the total length of the fish.
- (ii) Collect the otoliths and put them in an envelope/Eppendorf with the ID Otolith (see **Box 1**) if the fish.
- (iii) Place the fish on its ventral side, make a diagonal incision passing below the caudal fin, then parallel to the lateral line. **CRITICAL STEP!** As gonads can be thin and easily ripped, be careful not to cut it while opening the cavity.
- (iv) Unfold the flesh to bring into view the dorsal gonad. **CRITICAL STEP!** The gonad from the back side of the flat fish is the dorsal gonad (D) and the one from the bottom side is the ventral gonad (V).
- (v) Estimate the maturity phase by following the WKASMSF scale criteria.
- (vi) Take a photo of the whole fish with the gonad inside the abdominal cavity on a white background with a graduated ruler and an identification tag for the fish with the ID Otolith (see **Box 1**).
- (vii) Gently extract the dorsal gonad. **CRITICAL STEP!** For female individuals, you must cut the ovaries at the base of the oviduct, where the two ovaries are connected together, in order to get them out of the abdominal cavity.

- (viii) Turn the fish on its back and repeat the previous incisions to extract the ventral gonad.
 - (ix) Take a photo of the two extracted gonads outside of the abdominal cavity on a white background, with a graduated ruler and the ID Otolith (see **Box 1**). **CRITICAL STEP!** Keep track on which gonad is the ventral and dorsal one. If possible, separate the gonads from one another and place the dorsal gonad above the ventral one.
 - (x) Weight separately each gonad on a precision scale (0.01 g rounded down).
 - (xi) Check the presence of parasites inside and outside the fish.
 - (xii) Extract the liver and weight it on the precision scale (0.01 g rounded down).
 - (xiii) If the gonads are more than 3 cm long, make a 2 cm section in the median area of the gonad. **CRITICAL STEP!** Be careful not to take a section where the gonadal wall is torn or pierced.
 - (xiv) Place a single gonad section in a flat position with its identification tag into a tissue processing embedding cassette. See **Box 1** for further details on paper tags. **CRITICAL STEP!** Avoid having the sample and the paper tag touching one another.
- (C) Gonad extraction for cellular homogeneity test
- (i) If it is a round fish, repeat step Ai-x. If it is flat fish, repeat step Bi-x.
 - (ii) Place the dorsal/left gonad topmost and the ventral/right one below, while respecting the natural orientation the gonads were in when inside the fish's abdominal cavity. **CRITICAL STEP!** The tip of the gonad that was the closest to the fish's head must be on the left; it is the anterior part of the gonad. The tip of the gonad that was the closest to the fish's tail must be on the right; it is the posterior part of the gonad.
 - (iii) Cut the gonads into three sections of at least 1 cm (2 cm maximum): one section in the anterior area, one in the median area and one in the posterior area. **CRITICAL STEP!** Be careful not to tear the gonadal wall horizontally.
 - (iv) Place a single gonadal section in a flat position with its identification tag into a tissue processing embedding cassette. See **Box 1** for further details on paper tags. **CRITICAL STEP!** Avoid having the sample and the paper tag touching one another.

BOX 1 | COLLECTED DATA AND IDENTIFICATION TAG

Data must be collected and referred in the data entry sheet prior or during the gonad extraction process. The following data is the one used for the creation of this protocol and complies with the requested data from the ICES :

(A) Data to collect for each fish in the data entry sheet :

- (i) ID Otolith (a unique identifier for each individual that will follow the sample throughout its processing)
- (ii) Species name (you can use codification index as Rubin type)
- (iii) ICES division (ICES division where the fish was caught)
- (iv) ICES Stat Rectangle (ICES fisheries statistical rectangle where the fish was caught)
- (v) Date
- (vi) Total length of the fish
- (vii) Ungutted fish weight
- (viii) Parasites presence
- (ix) Age
- (x) Visual maturity (ICES WKASMSF scale, 2018)
- (xi) Liver weight
- (xii) Dorsal/Right gonad weight
- (xiii) Ventral/Left gonad weight
- (xiv) Number of sections (number of gonad section/samples extracted for each individual)
- (xv) Vessel (name of the vessel that carried out the fishing effort)

(B) Data is also included in the identification tags. The identification tags must be made with conventional paper and standardized in size to the tissue processing embedding cassettes. The data written on them vary between basic samples and samples for homogeneity tests. Here are the data that was written down for the established of this protocol :

- (i) Basic sample for round fish : ID Otolith + Sampled gonad position (L or R)
- (ii) Basic sample for flat fish : ID Otolith + Sampled gonad position (V or D)
- (iii) Sample for homogeneity tests : ID Otolith + Sampled gonad position + section position (1 =

anterior; 2 = median; 3 = posterior)

FIXATION / TIMING 24 – 48 h at 4°C (depending on the size of the samples) **!CAUTION** Handle under a fume hood with safety goggles, laboratory coat and nitrile gloves.

- (2) With stainless steel long forceps, submerge the tissue processing embedding cassettes into a 2 L plastic sample bottle with maximum 1.5 L of Davidson's fixative. If more than 30 samples are stored, leave at least 1 cm of Davidson's fixative above the topmost histocassettes.
- (3) Place the bottles at 4°C for 24 to 48h. **!CAUTION** The refrigerator must be adapted for laboratory use.

SAMPLE TRIMING / TIMING 1h (then 24h to several weeks) **!CAUTION** Handle under a fume hood with safety goggles, laboratory coat and nitrile gloves.

- (4) With stainless steel long forceps, remove the embedding cassettes from the Davidson's fixative and place them on paper towel. **CRITICAL STEP!** Check if the identification tag is not stuck to the sample. If that is the case, there is a high risk that the tag will tear up when being detached from the sample. In that case, a new tag must be created.
- (5) With a scalpel, trim the edges of each sample in order to have a straight edge. **?TROUBLESHOOTING**
- (6) Place the samples and their tag back into their embedding cassettes.
- (7) With stainless steel long forceps, submerge the embedding cassettes into 1.5 L of 70° ethanol.

!PAUSE POINT Samples can be stored in 70° ethanol for several weeks or months at room temperature.

DEHYDRATION / TIMING 4 days (then 24h to several weeks) **!CAUTION** Handle under a fume hood with safety goggles, laboratory coat and nitrile gloves.

- (8) With stainless steel long forceps and at room temperature, submerge the embedding cassettes with the samples into the following 1.5 L baths :
 - (A) 95° ethanol for 24 to 48h
 - (B) 100° ethanol for 24 to 48h
 - (C) 100° butanol for 24 to 48h

CRITICAL STEP! Change the 1.5 L ethanol and butanol baths after 3 uses or if the solutions become turbid.

!PAUSE POINT Samples can be stored in 100° butanol for several weeks or months at room temperature.

INCLUSION / TIMING 3 days at 60°C (temperature of fusion depends on the paraffin used) **CRITICAL STEP!** Do not forget to melt in advance, in a proofer, 2 L of paraffin in two large beakers. The volume of paraffin used must completely submerge the samples. **!CAUTION** Cover the beakers filled with paraffin to prevent butanol vapours from dispersing into the proofer. Handle with nitrile gloves and laboratory coat.

- (9) With stainless steel long forceps at 60°C, submerge the embedding cassettes with the samples into the following 2 L baths :
 - (A) Liquid paraffin for 12 to 24h
 - (B) Liquid paraffin for 12 to 24h

CRITICAL STEP! Change paraffin baths after every use.

EMBEDDING / TIMING 2h (then overnight at 4°C) **CRITICAL STEP!** Do not forget to place a stainless steel beaker with 2 L of unused paraffin and forceps into 60°C proofer in advance. During the embedding process, avoid putting your hands on the beaker and take/embed each samples one by one to avoid paraffin cooling and clogging.

- (10) With stainless steel long forceps, take the first embedding cassette out of the last paraffin bath from the proofer.
- (11) Place the embedding cassette on a plastic plate, open it, and with the heated forceps, remove the sample and its tag.

-
- (12) Replace the forceps into the proofer.
 - (13) Take the stainless steel beaker out and fill one hole of the silicone mould with paraffin up to $\frac{3}{4}$.
 - (14) Put the beaker back into the proofer and take the heated forceps.
 - (15) With the forceps, place the sample vertically in the center of the mould. **CRITICAL STEP!** The position of the sample into the mould is important. Transverse sectioning is better suited for gonad samples. In order to do so, the straight edge must be facing the bottom of the mould. **?TROUBLESHOOTING**
 - (16) Place the forceps back into the proofer and take out the stainless steel beaker to finish the mould with paraffin, until you get a dome of paraffin. **CRITICAL STEP!** Handle this step quickly after the last one, to avoid paraffin cooling. **?TROUBLESHOOTING**
 - (17) Place the beaker back into the proofer.
 - (18) Add the tag on the lip of the mould submerging only the grey section of the tag into the paraffin.
 - (19) Repeat step 10 to 18 with every samples.
 - (20) Let cool the embedded blocs of paraffin in the mould for 15 minutes.
 - (21) Place the moulds at 4°C overnight.

MICROTOMY SECTIONING / TIMING Variable (then overnight at 37°C)

- (22) Take the embedded samples in paraffin out of the silicone mould. **CRITICAL STEP!** Keep paraffin blocs on ice before cutting them as it may facilitate the cutting process.
- (23) Lock the embedded sample to the microtome with the bottom of the paraffin bloc facing the razor blade of the microtome in order to do transverse sectioning.
- (24) With a razor blade, start trimming the excess paraffin until the complete section of the sample is reached.
- (25) With a new razor blade, cut the embedded samples into 3 to 7 μm sections. **?TROUBLESHOOTING**
- (26) Pick the desired section rows up from the microtome's knife and bring it to the water bath at 55°C (Fig. 2a). **CRITICAL STEP!** Choose the nicest sections, without folds, air bubbles or ridges. **?TROUBLESHOOTING**
- (27) Gradually set the row onto the water (Fig. 2b). **CRITICAL STEP!** The surface that was against the knife holder is to be set on the water surface.
- (28) Using a straight tip teasing, separate sections by pricking the joints at regular intervals (Fig. 2c).
- (29) With the teasing needle, gently guide sections towards a glass slide halfway submerged in the water bath (Fig. 2d).
- (30) With a microscope, check the quality of the ovarian section (complete gonadal wall, no tears, holes, folds or follicles that have been ripped away).
- (31) Place the glass slide with gonad sections into 37°C proofer overnight to dry them.
- (32) Repeat step 25-30 as many times as you want gonad sections for this sample.

!PAUSE POINT After use, paraffin blocs with embedded samples can be wrapped with clear tape enveloped 1½ time around the bloc, covering the area that was cut and the tag. They can then be stored plastic bags inside in cardboard boxes in a dry, cool and ventilated room.

STAINING / TIMING 1h per slide (you can stain multiple slide at once with the use of a slide rack) **CRITICAL STEP!** Staining process vary depending on the type of tissues to stain and the desired results. The one described here correspond to the Prenant-Gabe trichrome staining. **!CAUTION** Handle under fume hood with safety goggles, laboratory coat and nitrile gloves.

- (33) Place slides in slide racks and all staining solutions into adapted tanks. The following baths must be carried out successively. **CRITICAL STEPS!** Staining tanks must be filled enough to have the slides completely submerged into the solution when the slide holder is inserted into the tanks. **?TROUBLESHOOTING**
 - (A) Dewaxing
 - (i) Diasolv® : 5 minutes
 - (ii) Diasolv® : 5 minutes
 - (B) Hydration
 - (i) 100° ethanol : 5 minutes

- (ii) 100° ethanol : 5 minutes
- (iii) 95° ethanol : 5 minutes
- (iv) 70° ethanol : 5 minutes
- (v) Rinse in bath of distilled water. **CRITICAL STEP!** Make back and forth movements with the slide rack into the tank of distilled water.

(C) Staining

- (vi) 1° hematoxylin : 1 minute
- (vii) Rinse with running water until the excess color has been removed.
- (viii) Rinse in bath of distilled water. **CRITICAL STEP!** Make back and forth movements with the slide rack into the tank of distilled water.
- (ix) 1° eosin : 8 minutes
- (x) Flush with a dropper of distilled water.
- (xi) 1° phosphomolibdic acid : 30 seconds
- (xii) 0.2° fast green : 30 seconds

(D) Dehydration

- (i) 100° ethanol : 5 minutes **CRITICAL STEP!** Change after every use as it takes on a green hue from the fast green.
- (ii) 100° ethanol : 5 minutes
- (iii) Diasolv® : 5 minutes

(34) Let slides dry 5 minutes under the fume hood before the next step.

SLIDE MOUNTING / TIMING 1h (then 24h at 55°C) **!CAUTION** Handle under fume hood with safety goggles, laboratory coat and nitrile gloves.

- (35) With a disposable pipette, put a few drops of Diamount® on the slides.
- (36) Progressively place the coverslip on top, laying it down at an angle to avoid bubbles from forming. **CRITICAL STEP!** Do not let the coverslip overtake the sides of the glass slide.
- (37) Place the slides on paper towel in a plate and place it into a proofer at 55°C for 24h to let the Diamount® glue polymerize.
- (38) After 24h at 55°C, remove the excess of Diamount® by scraping the slides with a razor blade and cleaning them with paper towel soaked in ethanol. It is also possible to submerge the slides a few minutes into ethanol to soften the glue and removing it gently with a razor blade. **CRITICAL STEP!** Do not make any scratches on the coverslips while scraping them with the razor blade.

!PAUSE POINT Slides can then be stored indefinitely in histological slide storage boxes to facilitate the transportation and avoid breaking them.

SLIDE SCANNING / TIMING Variable

- (39) Scan slides with an appropriate scanner to keep a virtual copy of the cross sections and read the present cellular structures later. See **Box 2** for further details on a possible scanner and associated parameters used for slide scanning.
- (40) Read scanned slides with appropriate software.

BOX 2 | SCANNER EXAMPLE

There are many scanners and softwares used to scan slides. Here following the method for the VS120 Olympus scanner model driven by the Olympus VS-ASW software. The associated parameters to scan the histological cross section are as follow :

- (A) Parameter the scan's magnification to x20 and the image acquisition to 3 different depths within 3-7µm (depends on the thickness of the paraffin strip). The scanner automatically merges the three images by keeping the clearest pixel between all three depths, avoiding blurry areas.
- (B) After the overview step on the scanner, manually outline the desired scan areas with: a complete gonadal wall; no folds, holes or tears; staining neither too dark nor to pale; cross-sections entirely visible in the scan area.
- (C) Once the section is selected, place focus points homogeneously throughout the section while avoiding

white areas without biological tissues.
(D) At the end of the scanning process, slides are in “.vsi” format.

?TROUBLESHOOTING

Troubleshooting advice can be found in **Table 1**.

ANTICIPATED RESULTS

The use of paraffin for the embedding process, coupled with the Prenant-Gabe's trichrome stain, makes it possible to differentiate gonad sections for both early maturity phase (Fig. 3a) and late maturity phase individuals (Fig. 3b), while staying constant between all five studied marine bony fish species. Prenant-Gabe's trichrome stain is classically used in cytology. Its use helps greatly in cellular structures identification within the ovaries, and the colorization of the different structures greatly favours the use of these slides for image analyses. Gonadal walls and connective tissues thickness is expressed in green (Fig. 4a-b), whereas cytoplasm mass (Fig. 4c-d) are stained in violet and vitellus droplets (Fig. 4e-f) in pink. The nucleus is expressed in grey, with nucleoli in dark purple, allowing for an obvious distinction from other coloured cellular structures (Fig. 4c-f).

All successive histological processes (fixation, dehydration, sectioning and staining) can result in the lost of certain fragile cellular structures found in the ovaries, notably oocytes in the finale maturity stages. Depending on the species, hydrated oocytes shrink and have wrapped shape (Fig. 4h). Only species with hydrated oocytes with thick zona pellucida such as the plaice showed little distortion (Fig. 4g).

Sectioning and sample orientation are key for later gonads section analysis. A transverse section into the gonad makes it possible to distinguish ovarian lamellas and estimate the gonadal wall's thickness (Fig. 3a). This also allows for the study of the gonad's cellular homogeneity, and stereology as a whole.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the BOREA (Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques) Laboratory from the University of Caen Normandy, especially Villain-Naud N. for her precious help in creating the following protocol as well as for the advice on histological methods found throughout this work; Kellner K. for her expertise on cellular structures found in ovaries; Elie N. and the CMABio³ (Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie) for their implication regarding the scanning and image analysis of histological sections. The authors would also like to thank France Fillière Pêche and the Direction Scientifique of IFREMER for their financial support for the MATO project.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

COMPETING INTEREST

There are no significant competing financial, professional, or personal interests that might have influenced the performance or presentation of the work described in this paper.

REFERENCES

1. de Boois, I. J. *et al.* ICES Survey Protocols – Offshore Beam Trawl Surveys, Coordinated by Working group on Beam Trawl Surveys (WGBEAM). 4937759 Bytes https://ices-library.figshare.com/articles/report/ICES_Survey_Protocols_Offshore_Beam_Trawl_Surveys_Coordinated_by_Working_group_on_Beam_Trawl_Surveys_WGBEAM_/21603336 (2023) doi:10.17895/ICES.PUB.21603336.

2. Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. J. & Lowerre-Barbieri, S. K. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. *Mar. Coast. Fish.* **3**, 52–70 (2011).
3. ICES. Report of the Workshop for maturity staging chairs (WKMATCH). in vol. ICES CM 2012\ACOM:58 59 (2012).
4. ICES. Report of the Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF). in vol. ICES CM/EOSG: 38. 75 pp. 79 (2018).
5. Gerritsen, H. D. & McGrath, D. Variability in the assignment of maturity stages of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) and whiting (*Merlangius merlangus* L.) using macroscopic maturity criteria. *Fish. Res.* **77**, 72–77 (2006).
6. Le Meleder, A., Sauger, C. & Dubroca, L. Protocole de photographie des gonades de poisson. (2022) doi:10.13155/89703.
7. Le Meleder, A. *et al.* A gonad photographs dataset for fish of commercial interest. (2022) doi:10.5281/zenodo.7079594.
8. Le Meleder, A. & Dubroca, L. MaturityScaleTools: A maturity identification tool for fish of commercial interest. (2022) doi:10.5281/zenodo.7079655.
9. Follsea, M. C. & Carbonara, P. Atlas of the maturity stages of Mediterranean fishery resources.
10. Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M. & Mohammedsaleh, Z. M. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Glob. J. Health Sci.* **8**, 72–79 (2016).
11. Musumeci, G. Past, present and future: overview on histology and histopathology. *J. Histol. Histopathol.* **1**, 5 (2014).
12. West, G. Methods of Assessing Ovarian development in Fishes: a Review. *Mar. Freshw. Res.* **41**, 199 (1990).
13. Hunter, J. R. & Macewicz, B. J. Measurement of Spawning Frequency in Multiple Spawning Fishes.
14. Elias, H. & Hyde, D. M. An elementary introduction to stereology (quantitative microscopy). *Am. J. Anat.* **159**, 411–446 (1980).
15. Barr, W. A. The endocrine control of the sexual cycle in the plaice, *Pleuronectes platessa* (L.). II. The endocrine control of oogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **3**, 205–215 (1963).
16. Brule, T. The reproductive biology and the pathological changes of the plaice *Pleuronectes platessa* (L.) after the ‘Amoco Cadiz’ oil spill along the north-west coast of Brittany. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **67**, 237–247 (1987).
17. Sexual maturation in female triploid plaice, *Pleuronectes platessa*, and plaice × flounder, *Platichthys flesus*, hybrids - Lincoln - 1981 - Journal of Fish Biology - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1095-8649.1981.tb03818.x>.
18. Miossec, L. Alteration de l’ovogenese des plies *Pleuronectes platessa* L. capturees dans les abers Wrac’h et Benoit, depuis la pollution de l’Amoco Cadiz. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* **46**, 195–207 (1982).
19. Alam, M. A. & Nakamura, M. Determination of sex and gonadal maturity in the honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, through biopsy. *Aquac. Int.* **16**, 27–32 (2008).
20. Konan, K. S., Amon, Y., Diaby, M. & N’da, K. Détermination des stades de maturité sexuelle chez le poisson *Galeoides decadactylus* (petit capitaine) de la pêche artisanale maritime de Grand-Lahou (Côte d’Ivoire). *J. Appl. Biosci.* **149**, 15322–15329 (2020).
21. Kellner, K. & Sauger, C. Lexique des structures histologiques des ovaires et de l’ovogenèse de la plie, *Pleuronectes platessa* (Linné, 1758). **34** (2019).

-
22. Heude-Berthelin, C., Kellner, K. & Sauger, C. Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the megrim, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792). (2023).
 23. Heude-Berthelin, C., Kellner, K. & Sauger, C. Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the four-spot megrim, *Lepidorhombus boscii* (Risso, 1810). (2023).
 24. Berthelin, C. *et al.* Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the striped red mullet, *Mullus surmuletus* (Linnaeus, 1758). (2023) doi:10.13155/75174.
 25. Histological Techniques - M. Gabe, Manfred Gabe, Robert E. Blackith: 9780387901626 - AbeBooks.
<https://www.abebooks.com/9780387901626/Histological-Techniques-Gabe-M-0387901620/plp>.
 26. Dubroca, L. *et al.* Stereology reading protocol when using quantitative histology for the determination of sexual maturity in fish ovaries. (2023) doi:10.13155/75173.
 27. Sullivan-Brown, J., Bisher, M. E. & Burdine, R. D. Embedding, serial sectioning and staining of zebrafish embryos using JB-4 resin. *Nat. Protoc.* **6**, 46–55 (2011).
 28. Mauffret, A. *et al.* Campagne dédiée à l'évaluation des effets biologiques induits pas la contamination chimique en Baies de Loire et Vilaine. SELILOIRE 2017. (2019).
 29. Interpretation of histological sections: Stains used in histology. *Kenhub* <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/interpretation-of-histologic-sections-stains-used-in-histology>.
 30. Cinar, K., Aksoy, A., Emre, Y. & Aşti, R. N. The histology and histochemical aspects of gills of the flower fish, *Pseudophoxinus antalyae*. *Vet. Res. Commun.* **33**, 453–460 (2009).
 31. Garren, F. Fiche d'aide à l'identification / Poissons, céphalopodes, décapodes et crustacés / Mer du Nord, Manche, Golfe de Gascogne et Mer Celtique. 91 (2020).
 32. Bankhead, P. *et al.* QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* **7**, 16878 (2017).

Publication 4

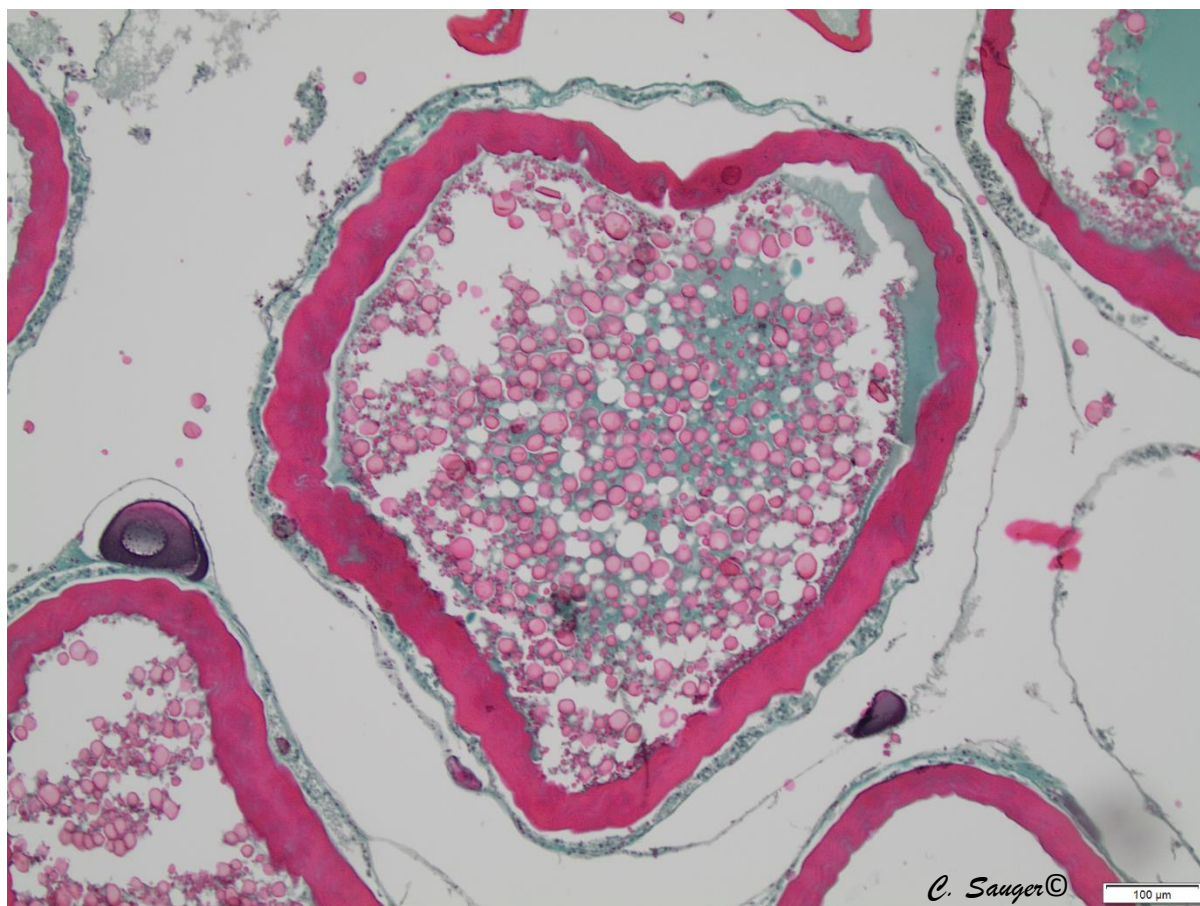
Lexique ovogenèse de *Pleuronectes platessa*

Citation : Sauger, C., Kellner, K. (2023) «Lexique des structures histologiques des ovaires et de l'ovogenèse de la plie, *Pleuronectes platessa* Linnaeus, 1758». DOI : <https://doi.org/10.13155/61234>

Résumé : Lexique décrivant les différentes cellules de la lignée germinale qui peuvent être retrouvées dans les ovaires de la plie (*Pleuronectes platessa*). Ce document est le référentiel pour l'identification des cellules de la lignée germinale lors des lectures stéréologiques des lames ovariennes de *Pleuronectes platessa*. Lexiques en français et en anglais disponibles en accès libre sur **Archimer**.

Contribution : Création, conception et rédaction du document avec prise des photos et mesures des cellules. Mises à jour et publication des différentes versions.

Lexique des structures histologiques des ovaires et de l'ovogenèse de la plie, *Pleuronectes platessa* (Linné, 1758)



KELLNER Kristell
SAUGER Carine

Juillet 2019 (v. 1.1 Septembre 2022)

Photographie de couverture : Photo d'un ovocyte en cours d'hydratation, venant d'un ovaire de plie (*Pleuronectes platessa*), qui a été déformé lors de la fixation sur lame. Collection personnelle C. Sauger©

Sommaire

Abréviations	1
Introduction	2
Structure générale de l'ovaire	5
Ovogenie (ov).....	8
Ovocyte précoce stade 1 (op1)	9
Ovocyte précoce stade 2 (op2)	10
Ovocyte à vésicules corticales alvéolaires (oca)	11
Ovocyte en début de vitellogenèse (vit1).....	13
Ovocyte en vitellogenèse avec migration du noyau (vit2)	15
Ovocyte en vitellogenèse avec croissance de la zr (vit3).....	17
Ovocyte en fin de vitellogenèse (vit4)	18
Ovocyte en cours d'hydratation (och)	20
Ovocyte hydraté (oh)	21
Follicule Post-Ovulatoire (POF)	22
Atrésie (oaA & oaB) et Lyse (L)	24
Tissu conjonctif (tc) & Paroi gonadique (pg).....	27
Capillaire sanguin (cs)	28
Espace intercellulaire (ei) et Vide (v)	28
Indéterminé (i)	29
Références	30

Abréviations

CA : vésicules corticales alvéolaires
ce : cytoplasme externe
cf : cellule folliculaire
chr : chromosome condensé
chrom : chromatine
ci : cytoplasme interne
cm : cellule macrophage
cs : capillaire sanguin
ei : espace intercellulaire
fc : fibre de collagène
gl : gouttelette lipidique
gv : gouttelette de vitellus
i : cellule indéterminée
L : lyse cellulaire
N : noyau (nucléus)
nl : nucléole
oaA : ovocyte non-émis en atrésie
oaB : ovocyte émis en atrésie
oca : ovocyte avec des vésicules corticales alvéolaires
och : ovocyte en cours d'hydratation
oh : ovocyte hydraté
op1 : ovocyte précoce stade 1
op2 : ovocyte précoce stade 2
ov : ovogonie
pg : paroi gonadique
POF : follicule post-ovulatoire
SI : sexuellement immature
SM : sexuellement mature
som : cellule somatique
T : thèque
tc : tissu conjonctif
v : vide (dû à la coupe)
vi : vitellus
vit1 : ovocyte en vitellogenèse stade 1
vit2 : ovocyte en vitellogenèse stade 2
vit3 : ovocyte en vitellogenèse stade 3
vit4 : ovocyte en fin de vitellogenèse stade 4
zr : *zona radiata*

Introduction

Pour cette étude, la terminologie de Brown-Peterson et al. (2011) sera utilisée, car elle est en accord avec les groupes de travail de l'ICES (International Council for the Exploration of the Sea) ayant défini les grilles d'évaluation des échelles de maturité pour les espèces européennes (ICES 2008, 2010, 2013, 2014, 2018).

Pour la description des cellules germinales femelles qui deviendront des gamètes, ces dernières seront répertoriées sous le terme de **ovogonie** (avant la méiose) ou **ovocyte** (méiose initiée). Un ovocyte est constitué d'un ooplasme entouré d'une oolemma (membrane plasmique) et d'une **zona radiata** (Tyler and Sumpter, 1996).

Le terme **follicule** sera utilisé afin de désigner un ovocyte entouré de différentes cellules somatiques : cellules folliculaires et cellules de la thèque (Tyler and Sumpter, 1996).

Pour la description du développement individuel des gamètes (*Figure 1*), le terme **stade** sera utilisé pour désigner différentes étapes de la gamétogenèse (Brown-Peterson et al., 2011) :

- Stade ovogonie
- Stade ovocytes primaires (« *primary growth oocytes* »)
- Stade ovocytes secondaires (« *secondary growth oocytes* »)
- Stade ovocytes en maturation (« *oocyte maturation* »)
- Stade ovulation

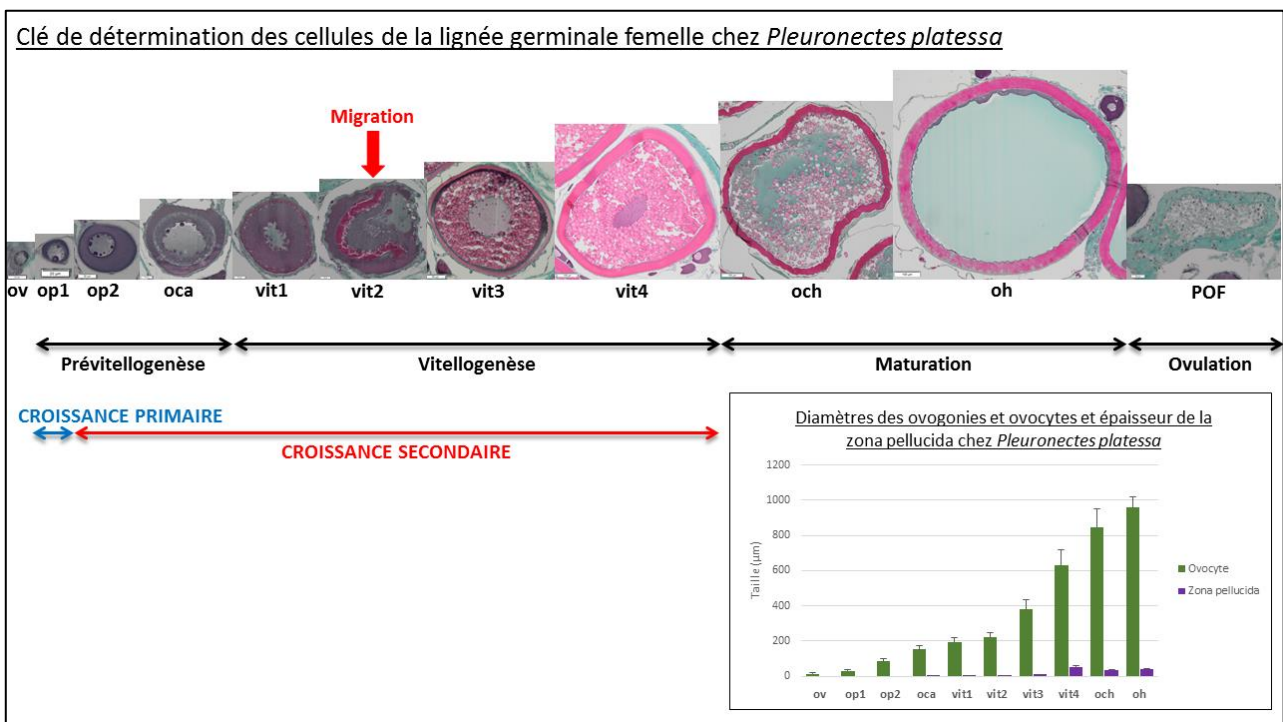


Figure 1 : Clé de détermination des différentes cellules de la lignée germinale femelle qui peuvent être retrouvées chez *Pleuronectes platessa* lors des différents stades de l'ovogenèse. Avec les diamètres des ovogonies et ovocytes (\pm écart-type en μm), ainsi que les épaisseurs de la *zona radiata* (\pm écart-type en μm)

Le cycle de maturité est divisé en deux **états**. L'état Sexuellement Immature (**SI**) et l'état Sexuellement Mature (**SM**). Le terme **phase** est utilisé dans le cadre du développement des gonades (*Figure 2* et *Tableau 1*). Le cycle de reproduction des poissons est séparé en plusieurs phases (Brown-Peterson et al., 2011).

- Phase immature
- Phase en développement (« *Developing* »)
- Phase capable de pondre (« *Spawning capable* »)
- Phase en régression (« *Regression* »)
- Phase en régénération (« *Regeneration* »)

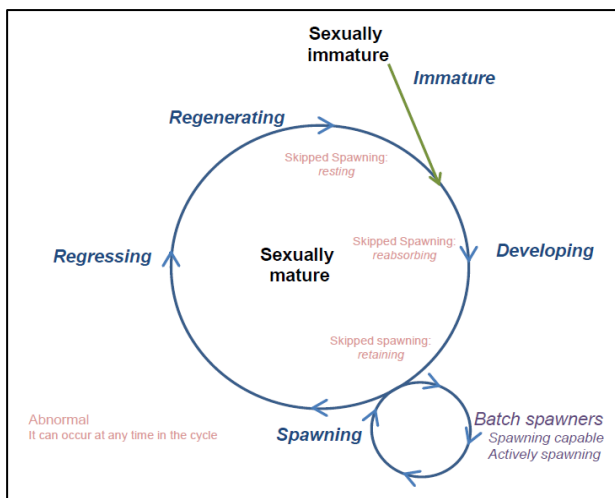


Figure 2 : Cycle de maturation des téléostéens avec les différentes phases selon l'ICES (2018a). Avec les phases : Immature (A), Développement (B), Frai (C), Régression/Régénération (D), Omission de frai (E), Anormal (F)

Tableau 1 : Descriptions macroscopiques et microscopiques des phases du cycle reproductif des femelles poissons selon Brown-Peterson et al. (2011). Les sous-phases pour toutes les espèces sont listées, mais des sous-phases additionnelles peuvent être appliquées en fonction de l'espèce étudiée. Avec CA = vésicule corticale alvéolaire, GVBD = rupture de la vésicule germinative, GVM = migration de la vésicule germinative, OM = maturation de l'ovocyte, PG = croissance primaire, POF = follicule post-ovulatoire, Vtg1 = première vitellogenèse, Vtg2 = deuxième vitellogenèse, Vtg3 = troisième vitellogenèse

Phase	Previous terminology	Macroscopic and histological features
Immature (never spawned)	Immature, virgin	Small ovaries, often clear, blood vessels indistinct. Only oogonia and PG oocytes present. No atresia or muscle bundles. Thin ovarian wall and little space between oocytes.
Developing (ovaries beginning to develop, but not ready to spawn)	Maturing, early developing, early maturation, mid-maturation, ripening, previtellogenic	Enlarging ovaries, blood vessels becoming more distinct. PG, CA, Vtg1, and Vtg2 oocytes present. No evidence of POFs or Vtg3 oocytes. Some atresia can be present. <i>Early developing subphase</i> : PG and CA oocytes only.
Spawning capable (fish are developmentally and physiologically able to spawn in this cycle)	Mature, late developing, late maturation, late ripening, total maturation, gravid, vitellogenic, ripe, partially spent, fully developed, prespawning, running ripe, final OM, spawning, gravid, ovulated	Large ovaries, blood vessels prominent. Individual oocytes visible macroscopically. Vtg3 oocytes present or POFs present in batch spawners. Atresia of vitellogenic and/or hydrated oocytes may be present. Early stages of OM can be present. <i>Actively spawning subphase</i> : oocytes undergoing late GVM, GVBD, hydration, or ovulation.
Regressing (cessation of spawning)	Spent, regression, postspawning, recovering	Flaccid ovaries, blood vessels prominent. Atresia (any stage) and POFs present. Some CA and/or vitellogenic (Vtg1, Vtg2) oocytes present.
Regenerating (sexually mature, reproductively inactive)	Resting, regressed, recovering, inactive	Small ovaries, blood vessels reduced but present. Only oogonia and PG oocytes present. Muscle bundles, enlarged blood vessels, thick ovarian wall and/or gamma/delta atresia or old, degenerating POFs may be present.

Comme l'indique le Tableau 1, les stades sont corrélés avec les types de cellules qu'ils contiennent, selon les définitions de Brown-Peterson et al. (2011) et l'ICES (2018a). Ainsi, pour la plie de Manche mer-du-nord, les cellules que nous avons définies pour cette étude seront indiquées en gras (**ov**, **op1**, **op2**, **oca**, **vit1**, **vit2**, **vit3**, **vit4**, **och**, **oh**) et les *Figures* qui leurs sont associées seront citées en italique.

- Stade ovogonie :
 - ovogonie (**ov**) (*Figures 7 & 8*)

- Stade ovocytes primaires :
 - ovocytes précoces stade 1 (**op1**) (*Figures 9 & 10*)
 - ovocytes précoces stade 2 (**op2**) (*Figures 11 & 12*)

- Stade ovocytes secondaires :
 - ovocytes avec des vésicules corticales alvéolaires et d'abondantes gouttelettes lipidiques (**oca**) (*Figures 13 à 15*)
 - ovocytes en vitellogenèse
 - sous-stade vtg1 : **vit1** (*Figures 16 & 17*)
 - sous-stade vtg2 : **vit2** & **vit3** (*Figures 18 à 22*)
 - sous-stade vtg3 : **vit4** (*Figures 23 à 25*)

- Stade ovocyte en maturation :
 - migration du noyau : chez la plie, elle semble avoir lieu au stade **vit2**
 - rupture de l'enveloppe nucléaire (« germinal vesicle breakdown » pour rupture de vésicule germinative) traduisant l'entrée de l'ovocyte en métaphase I de méiose
 - coalescence du vitellus : ovocyte en cours d'hydratation (**och**) (*Figures 26 & 27*)
 - hydratation : ovocytes hydratés (**oh**) (*Figures 28 & 29*)

- Stade ovulation : l'ovocyte hydraté a été émis dans la lumière de la gonade et il ne reste plus que des follicules post ovulatoire (**POF**) (*Figures 30 & 31*)

Les photos de ce lexique ont été prises au microscope Olympus AX70 avec l'aide du logiciel Olympus CellSens©. Les mesures de diamètres cellulaires et épaisseurs de *zona radiata* ont été effectuées à l'aide du logiciel Olympus CellSens© sur au moins 20 cellules retrouvées à travers une multitude de lames.

Structure générale de l'ovaire

Les plies sont des « *total spawner* », c'est-à-dire que les femelles vont pondre tous leurs ovocytes en une seule fois lors de la période de reproduction.



Figure 3 : Dissection d'une plie, *Pleuronectes platessa*, avec la mise en évidence de l'ovaire dorsal

ovaire dorsal

L'épaisseur de la paroi gonadique (**pg**), la quantité de tissu conjonctif (**tc**), la vascularisation (**cs**) ou encore la surface de la lumière de l'ovaire (**lumen**) vont varier en fonction de la phase de maturité dans laquelle se trouve le poisson. Les coupes histologiques seront alors très différentes, avec des ovocytes à des stades différents de la gamétogenèse (*Figure 4*).

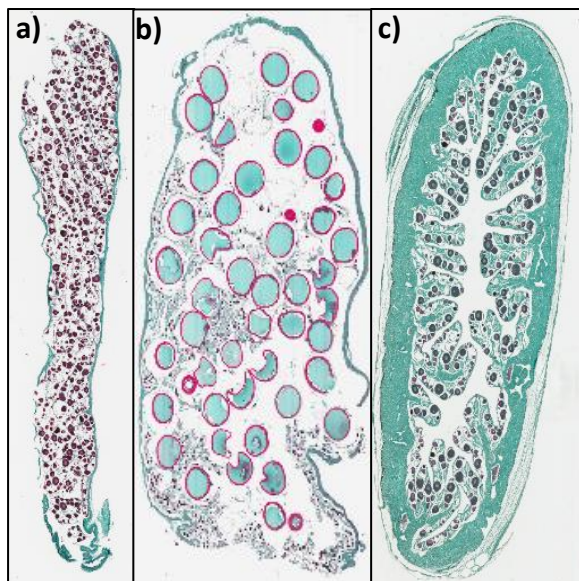


Figure 4 : Coupes transversales d'ovaire de plie aux phases **a)** immature ; **b)** en frais/avec des ovocytes prêts à être émis ; et **c)** en régénération/ayant pondu

Chaque gonade présente une organisation concentrique (*Figure 5* et *Figure 6*), avec des lamelles ovariennes délimitées par un épithélium germinatif. Au niveau de ces lamelles se trouvent les cellules germinales (ovogonies ou ovocytes), dans des follicules, à différents stades de gamétogenèse. Du tissu conjonctif (**tc**) va venir retenir les cellules germinales entre elles. La paroi gonadique (**pg**) peut être d'épaisseur variable. La lumière de l'ovaire, ou **lumen**, représente le vide naturel entre les lamelles d'épithélium germinatif à l'intérieur de l'ovaire.

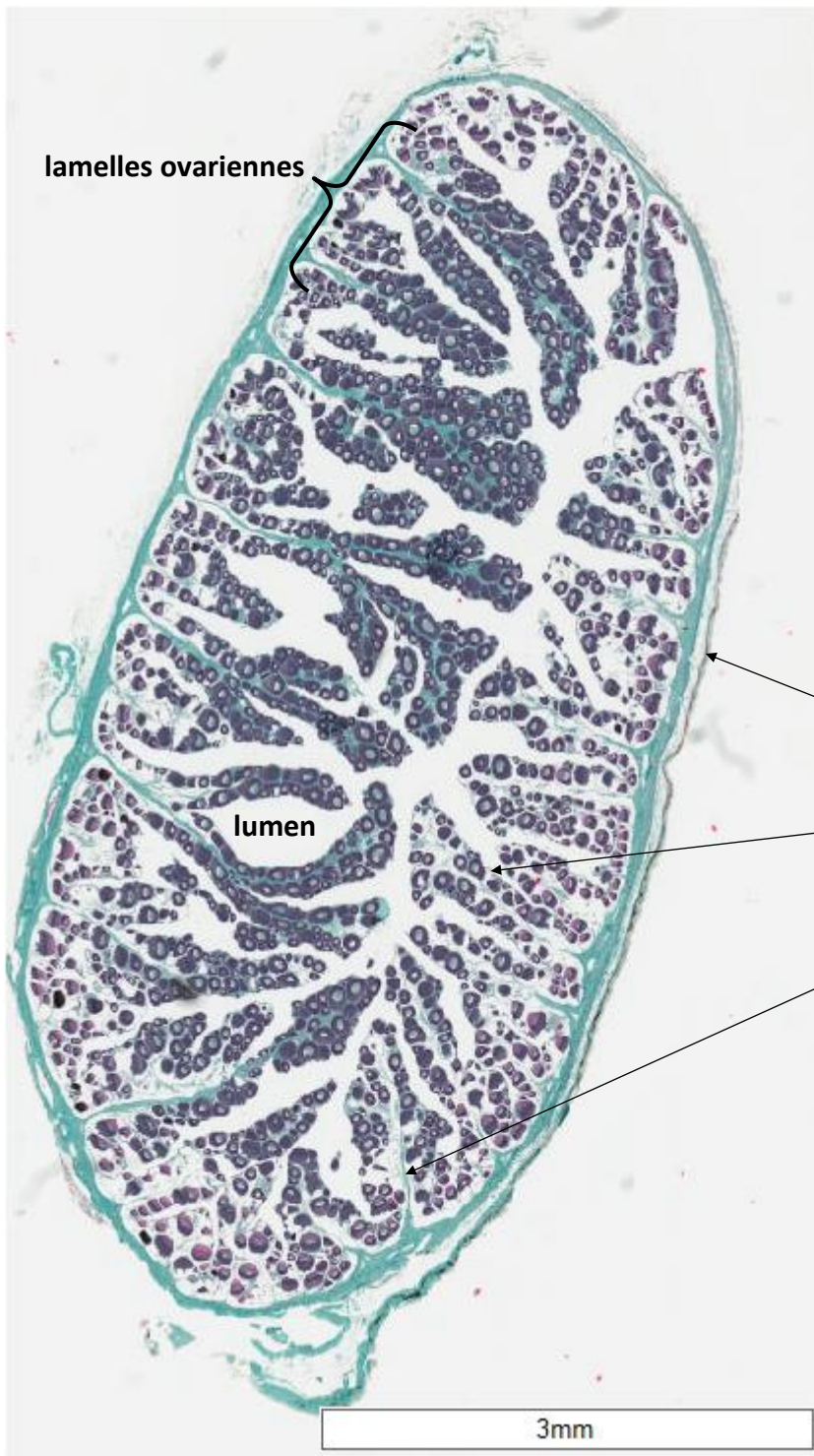


Figure 5 : Structure générale d'une coupe d'ovaire d'une plie, avec la paroi gonadique (**pg**), la lumière de la gonade, ou **lumen**, et un **épithélium germinatif** plissé en **lamelles ovariennes** et portant les ovocytes associés à un tissu conjonctif (**tc**)

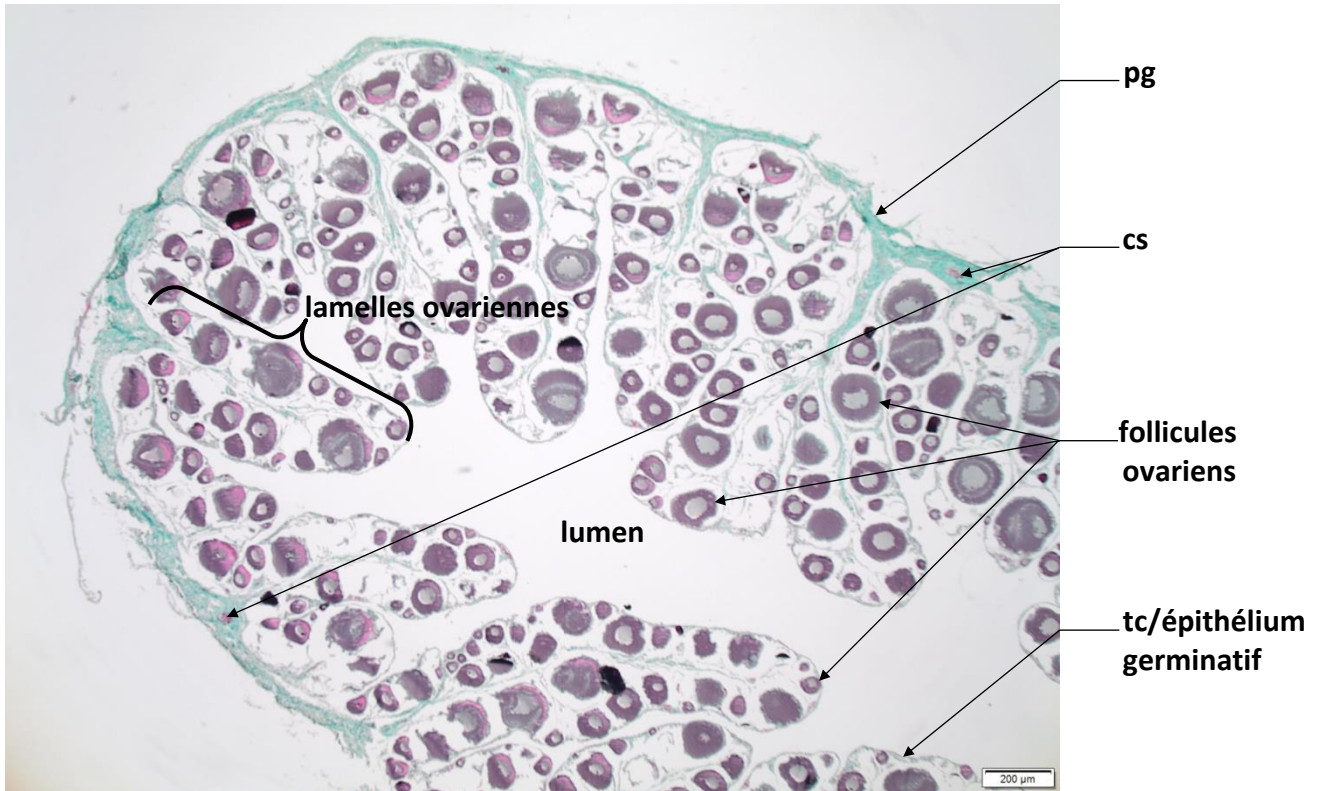
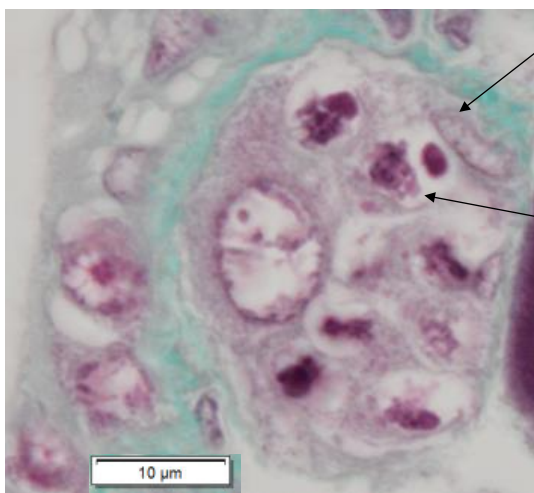


Figure 6 : Aspect global d'un morceau de coupe d'un ovaire de *Pleuronectes platessa* avec la paroi gonadique (**pg**), des vaisseaux ou capillaires sanguins (**cs**), la lumière de la gonade, ou **lumen**, et des follicules contenant des ovocytes rangés en structure de **lamelles ovariennes** et tissu conjonctif (**tc**)

Ovogenie (ov)

Une ovogenie (**ov**) possède un noyau (**N**), ou nucléus, très décondensé, pâle, avec un rapport nucléocytoplasmique élevé (très peu de cytoplasme). Quelques amas de chromatine peuvent être observés en périphérie du nucléus qui, en général, possède 1 seul gros nucléole. Le cytoplasme (**c**) est peu coloré (*Figure 8*). Ces ovogenies sont issues d'une cellule germinale souche par mitose goniale, ces figures de mitoses goniales peuvent parfois être observées au niveau de l'épithélium germinatif (*Figure 7*).

Identification : Cette cellule est de très petite taille. Il est rare de tomber dessus. Le **noyau est gris clair et visible**, le **cytoplasme à peine visible et très clair** autour de ce dernier. Le diamètre du noyau d'une **ov** est plus important que celui occupé par son cytoplasme (>50 %).



som

cellule en division mitotique

Taille moyenne
ov : 14.28μm (±3.74μm)

Figure 7 : Figures de division dans une niche germinale avec progéniteurs en division associés à des cellules somatiques (**som**)

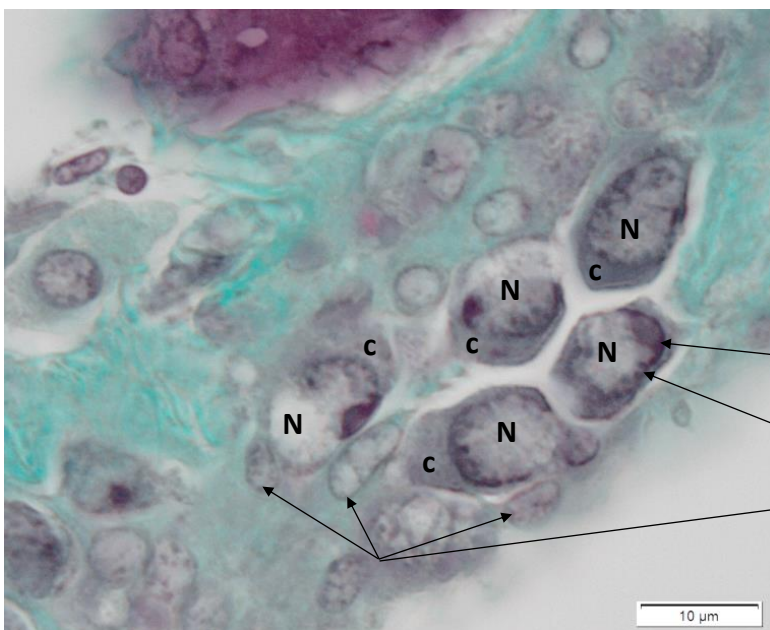


Figure 8 : Ovogenies (**ov**) avec un noyau (**N**) décondensé contenant un seul nucléole (**nl**) et des amas de chromatine (**chrom**). Le cytoplasme (**c**) est peu coloré. Présence de cellules somatiques (**som**)

nl

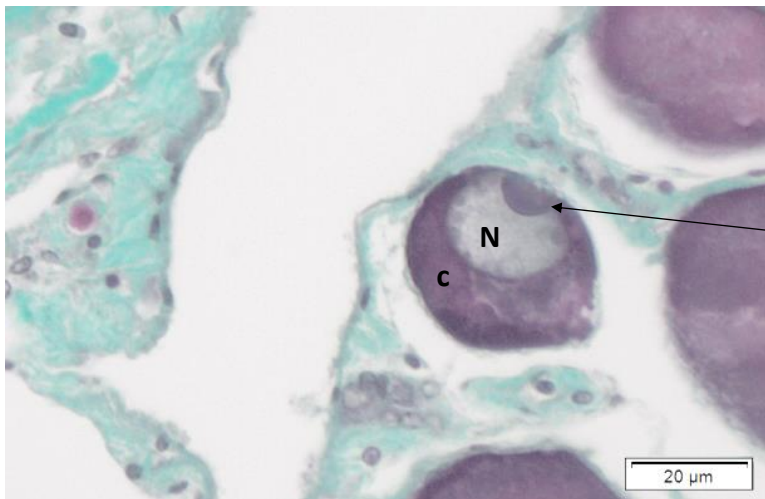
chrom

som

Ovocyte précoce stade 1 (op1)

Un ovocyte précoce au stade 1 (**op1**) possède un cytoplasme (**c**) beaucoup plus coloré que celui des ovogonies (**ov**), avec un rapport nucléocytoplasmique plus petit que celui d'une ovogonie. Le noyau (**N**) est sphérique et lisse, avec 1 nucléole seulement (possibilité de 2 gros nucléoles, cf *Figure 10*). Le diamètre du cytoplasme est inférieur ou égal à 50 % du diamètre du noyau.

Identification : Cette cellule est de taille légèrement plus grande qu'une ovogonie, mais reste relativement petite en taille par rapport aux autres structures de la gonade. Il est donc peu commun de tomber dessus. Le **noyau doit être visible, lisse**, et un **cytoplasme foncé** est présent. Le diamètre du noyau d'un **op1** est inférieur ou égal à 50 % du diamètre de son cytoplasme. Afin de lever une éventuelle indécision entre un **op1** et **op2**, prendre en compte la taille de la cellule.



Taille moyenne
op1 : 29.64μm (±5.45μm)

Figure 9 : Ovocyte précoce au stade 1 (**op1**) avec le noyau (**N**) sphérique et lisse contenant un seul nucléole (**nl**). Le cytoplasme (**c**) est plus foncé que pour une ovogonie (**ov**)

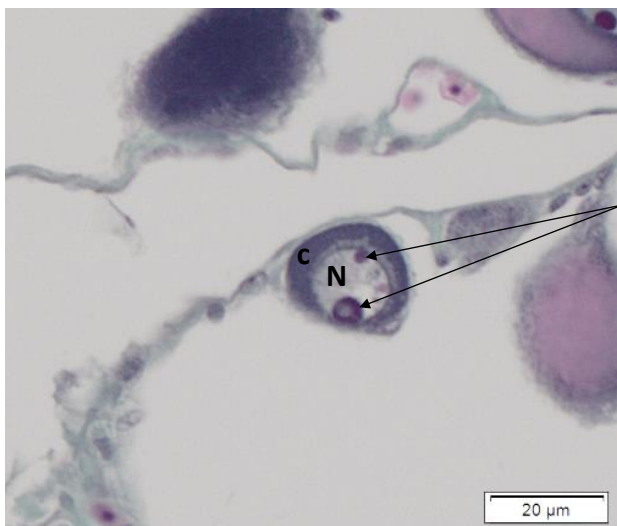
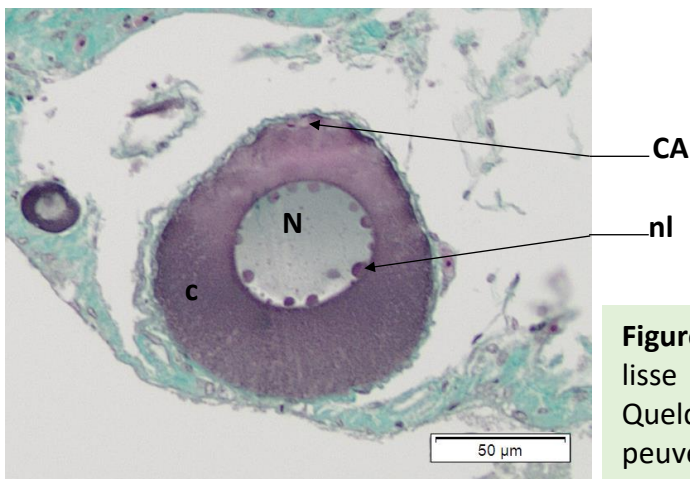


Figure 10 : Ovocyte précoce au stade 1 (**op1**) un noyau (**N**) sphérique et lisse contenant deux nucléoles (**nl**). Le cytoplasme (**c**) est plus foncé que pour une ovogonie (**ov**)

Ovocyte précoce stade 2 (op2)

Le cytoplasme des ovocytes précoces stade 2 (**op2**) peut contenir quelques rares vésicules corticales alvéolaires à contenu glucidique (**CA**) et gouttelettes lipidiques (**gl**). Ce cytoplasme (**c**) est parfois scindé en deux parties peu distinctes. Il est parfois possible d'observer des chromosomes ayant un aspect en « lampbrush » dans le noyau, caractéristiques des ovocytes immatures en diplotène.

Identification : Cellule de taille variable entre l'**op1** et l'**oca**. Généralement très nombreuses dans les gonades d'individus immatures. Elle peut posséder un **cytoplasme unique**, ou un **cytoplasme en deux parties** peu distinctes plus elle se rapproche d'un **oca**. Le **noyau est sphérique, lisse**, et contient le plus souvent de nombreux nucléoles. Quelques gouttelettes lipidiques et vésicules corticales alvéolaires peuvent être visibles dans le cytoplasme.



Taille moyenne

op2 : 82.70µm (±15.89µm)

Figure 11 : Un **op2**, avec le noyau (**N**) sphérique et lisse contenant de nombreux nucléoles (**nl**). Quelques rares vésicules corticales alvéolaires (**CA**) peuvent être présentes dans le cytoplasme (**c**)

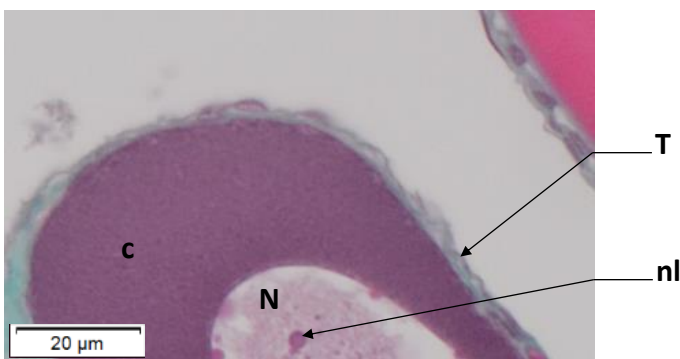


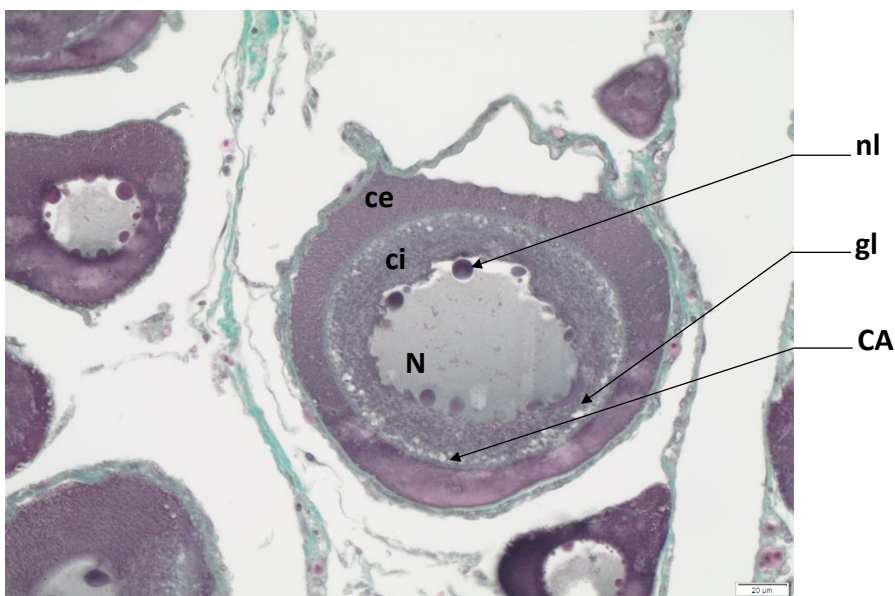
Figure 12 : Paroi d'un **op2**, avec le noyau (**N**) sphérique et lisse contenant de nombreux nucléoles (**nl**). La thèque (**T**) va venir contenir le cytoplasme (**c**)

Ovocyte à vésicules corticales alvéolaires (oca)

Un ovocyte avec vésicules corticales alvéolaires (**oca**) est caractérisé par : (1) la présence d'un cytoplasme (**c**) en 2 zones : cytoplasme interne (**ci**) et cytoplasme externe (**ce**) ; (2) par la présence dans le cytoplasme de gouttelettes lipidiques (**gl**) apparaissant en premier lieu du côté du noyau et d'alvéoles corticales (**CA**) en périphérie de la cellule ; (3) par un noyau (**N**), central à enveloppe festonnée contenant de nombreux nucléoles (**nl**) répartis autour de l'enveloppe nucléaire. Il est parfois possible d'observer des chromosomes ayant un aspect en « lampbrush » dans le noyau, caractéristiques des ovocytes immatures en diplotène. De plus, autour de l'ovocyte, la *zona radiata* (**zr**) commence à se former entre le cytoplasme et les cellules folliculaires (**cf**) et de la thèque (**T**).

Les **CA** vont prendre beaucoup de place dans le cytoplasme et peuvent être confondues avec les gouttelettes lipidiques (Anderson, 1968 ; Tyler et Sumpter, 1996). De plus, avant la vitellogenèse (**vit1**) le cytoplasme interne (**ci**) va entrer en expansion et on ne verra plus le cytoplasme externe (**ce**). On va alors retrouver les **CA** en périphérie de la *zona radiata* (**zr**).

Identification : Un ovocyte avec des alvéoles corticales est caractérisé principalement par un **noyau central à enveloppe festonnée**, contenant généralement de nombreux nucléoles proches de l'enveloppe nucléaire. Un **cytoplasme en 2 zones est souvent observé**, avec des gouttelettes lipidiques présentes à la limite des deux zones. Possibilité d'observer les chromosomes condensés (petits traits irréguliers gris foncé dans le nucléus), ainsi que des vésicules corticales alvéolaires. De plus, autour de l'ovocyte, **formation de la zona radiata (zr)**.



Taille moyenne

oca : 153.07µm (±17.83µm)

zr : 0.91µm (±0.23µm)

Figure 13 : Ovocyte avec des CA (**oca**), avec le noyau (**N**) festonné contenant de nombreux nucléoles (**nl**). Accumulation de gouttelettes lipidiques (**gl**) entre la zone des cytoplasmes interne (**ci**) et externe (**ce**) et présence de **CA** dans le **ce**

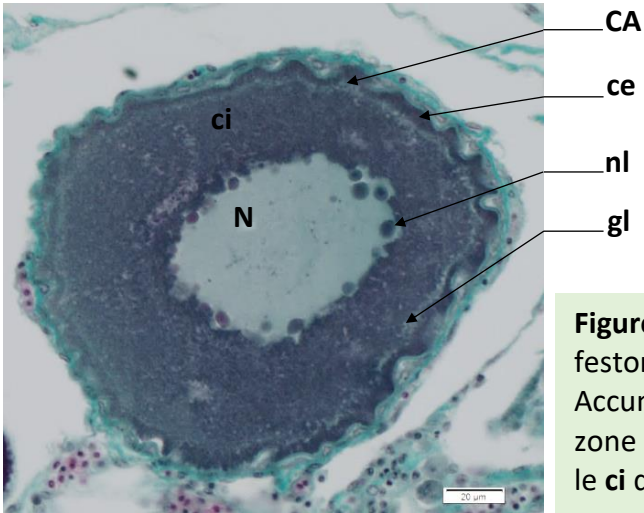


Figure 14 : Ovocyte avec des CA (oca), un noyau (N) festonné contenant de nombreux nucléoles (nl). Accumulation de gouttelettes lipidiques (gl) entre la zone des cytoplasmes interne (ci) et externe (ce), avec le ci qui repousse le ce

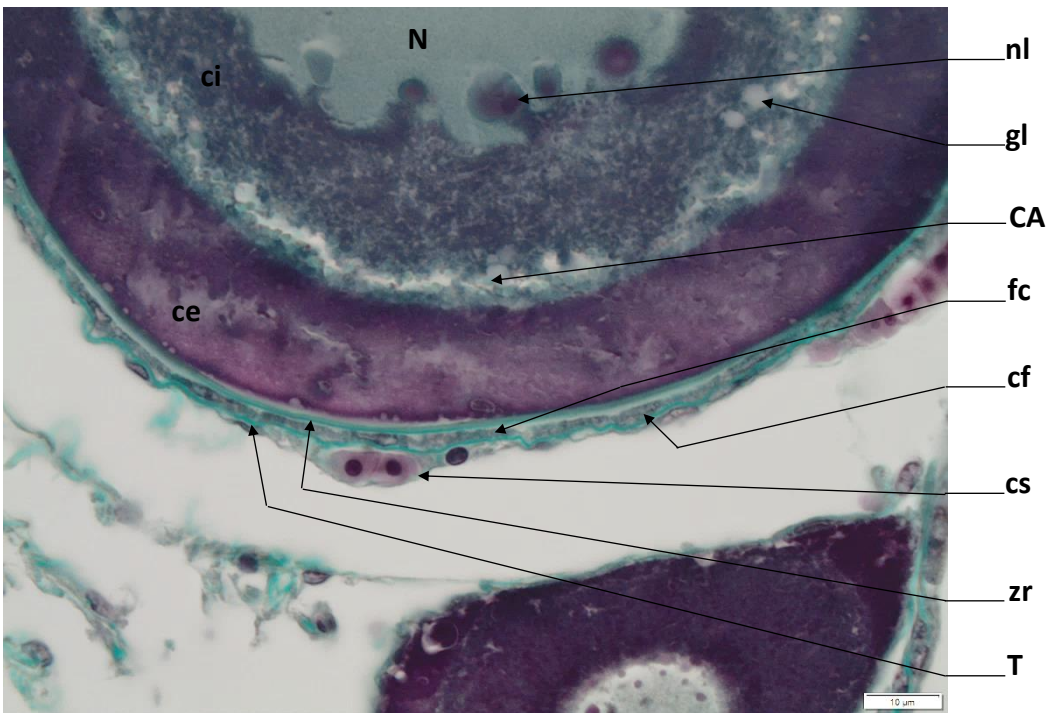


Figure 15 : Paroi d'un ovocyte avec des corticales alvéolaires (oca), avec le noyau (N) festonné contenant de nombreux nucléoles (nl). Accumulation de gouttelettes lipidiques (gl) entre la zone des cytoplasmes interne (ci) et externe (ce). Formation de la *zona radiata* (zr), présence de vésicules alvéolaires corticales (CA), de cellules folliculaires (cf), de fibre de collagène (fc) et de la thèque (T) avec des capillaires sanguins (cs)

Ovocyte en début de vitellogenèse (vit1)

Un ovocyte en début de vitellogenèse (**vit1**) est caractérisé par la formation d'un anneau de vésicules de vitellus (**gv**), gouttelettes éosinophiles roses, en périphérie du cytoplasme (**c**) qui n'est plus zoné. Quelques gouttelettes lipidiques blanches (**gl**) sont encore observées dans le cytoplasme. Le noyau (**N**) reste central, sa membrane est festonnée bordée de nombreux nucléoles. La *zona radiata* (**zr**) reste fine et de coloration verte (non acidophile).

Identification : Cet ovocyte en début de vitellogenèse est facilement identifiable grâce à l'apparition d'une **couronne rose de vitellus en périphérie du cytoplasme**. Dès l'apparition de la **première gouttelette de vitellus (gv)**, l'ovocyte entre dans le stade **vit1**. Le **noyau sera toujours festonné et centré** et la **couronne de vitellus va longer la paroi de la cellule (zona radiata)**. Dans le cas où le noyau de la cellule n'est pas visible, si la couronne de vitellus est visible et est collée à la paroi, on peut encore mettre la cellule dans la catégorie **vit1**.

Taille moyenne

vit1 : 191.52µm (±29.08µm)

zr : 1.43µm (±0.32µm)

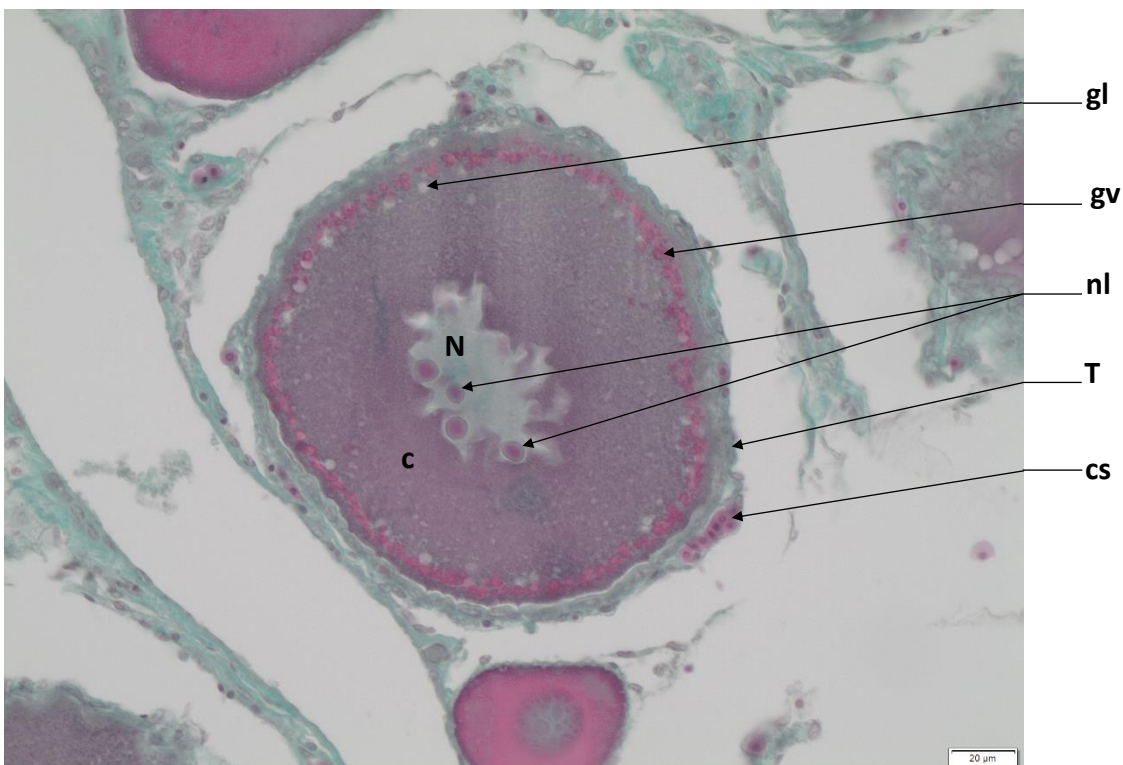


Figure 16 : Ovocyte au stade **vit1**, avec le noyau (**N**) dont l'enveloppe est festonnée et contenant de nombreux nucléoles (**nl**). Une couronne de gouttelettes de vitellus (**gv**) se forme en périphérie du cytoplasme (**c**). Des gouttelettes lipidiques (**gl**) sont encore observées à ce stade. La thèque (**T**) possède des capillaires sanguins (**cs**)

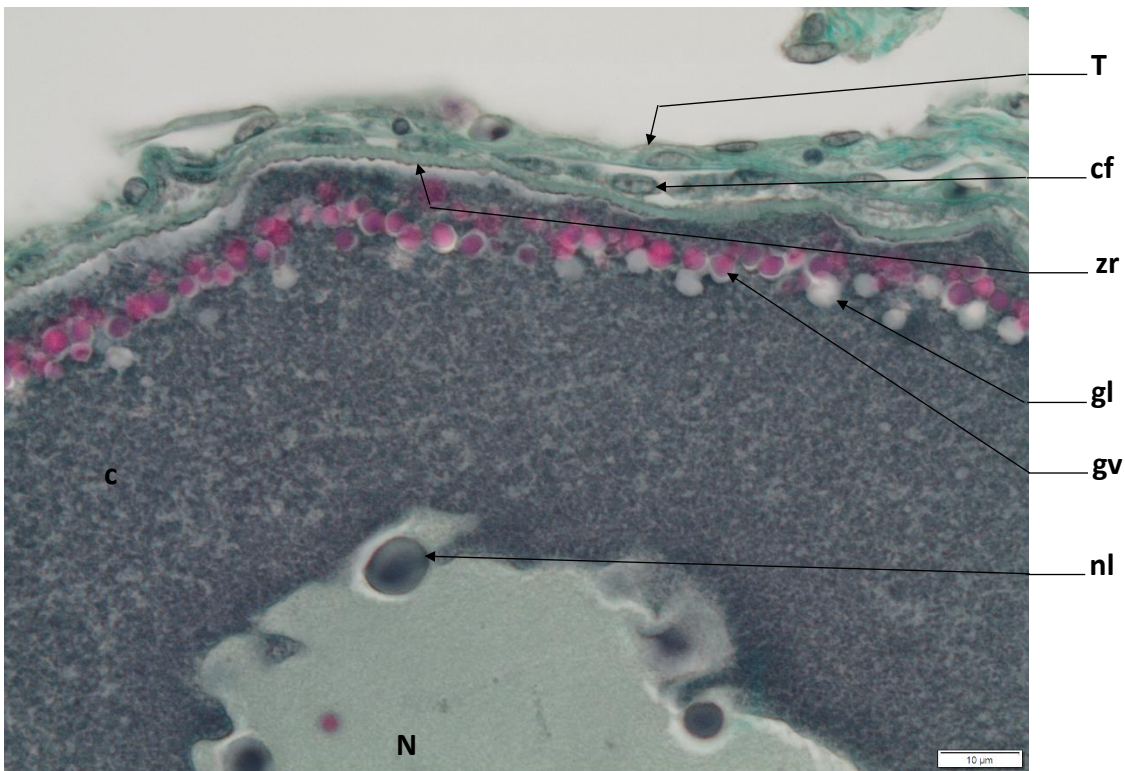


Figure 17 : Paroi d'un ovocyte au stade **vit1**, avec le noyau (**N**) festonné contenant de nombreux nucléoles (**nl**). Formation d'une couronne de gouttelettes de vitellus (**gv**) et présence de gouttelettes lipidiques (**gl**) en périphérie du cytoplasme (**c**). La thèque (**T**) contient des cellules folliculaires (**cf**) et dessous on retrouve la *zona radiata* (**zr**)

Ovocyte en vitellogénèse avec migration du noyau (vit2)

Lors du stade **vit2**, la couronne de gouttelettes de vitellus (**gv**) migre de la partie externe du cytoplasme vers la zone médiane de l'ovocyte ; le noyau (**N**) s'approche progressivement de la périphérie de l'ovocyte, il s'accôle à cette couronne de vitellus, qui finalement s'ouvre du côté du noyau. La *zona radiata* (**zr**) a toujours le même aspect qu'en **vit1**.

Un noyau (**N**) en migration sera déformé et décentré par rapport à la cellule. Attention cette déformation peut ne pas être visible en fonction de l'angle de la coupe. De plus, lors de la migration, le noyau va traverser la couronne de vitellus, la brisant.

Un noyau ayant fini sa migration sera accolé aux enveloppes de l'ovocyte d'un côté et toutes les gouttelettes de vitellus seront regroupées de l'autre côté du follicule. Cette structure est peu commune, notamment due au fait que la coupe doit avoir été faite dans le bon angle si l'on veut observer le noyau.

Identification : Ce type cellulaire ressemble aux **vit1**, mais est caractérisé par **une couronne de vitellus autour du noyau avec une zone de cytoplasme entre la zr et la couronne**, ou par un **noyau accolé à la zr d'un côté du follicule et les gv de l'autre**. Il est préférable de voir le noyau. Le **noyau peut être central, en migration ou ayant migré**.

Taille moyenne

vit2 : 220.19 μ m (\pm 25.28 μ m)

zr : 1.45 μ m (\pm 0.20 μ m)

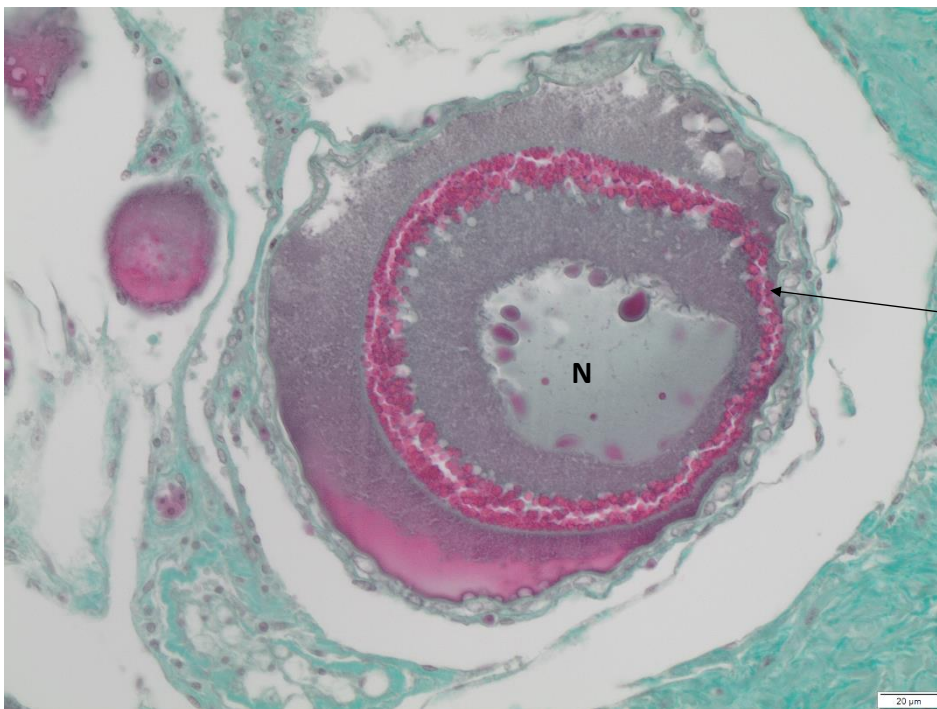
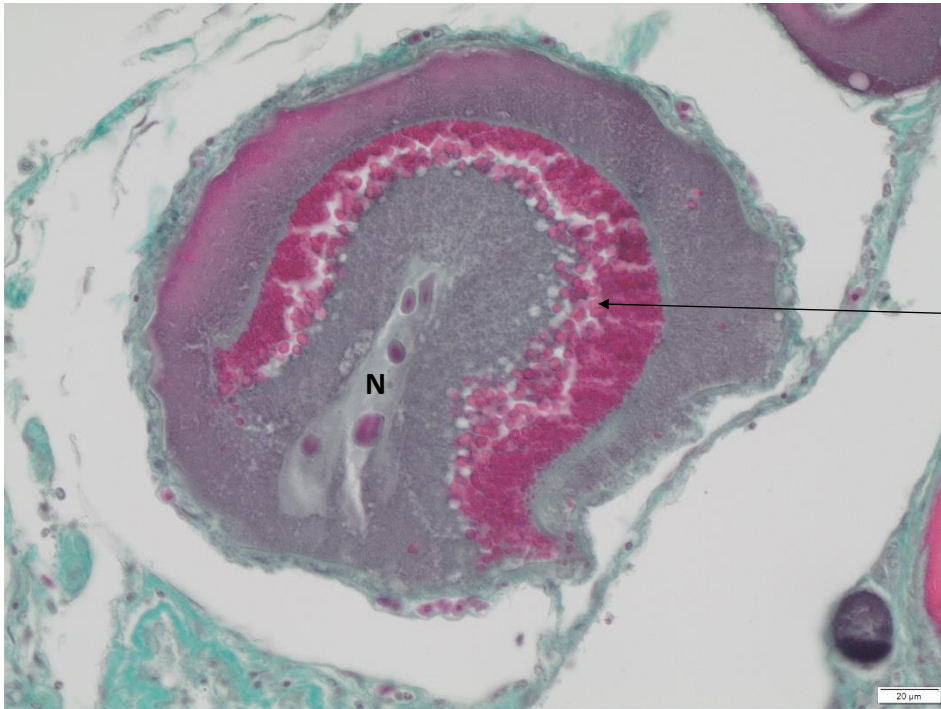
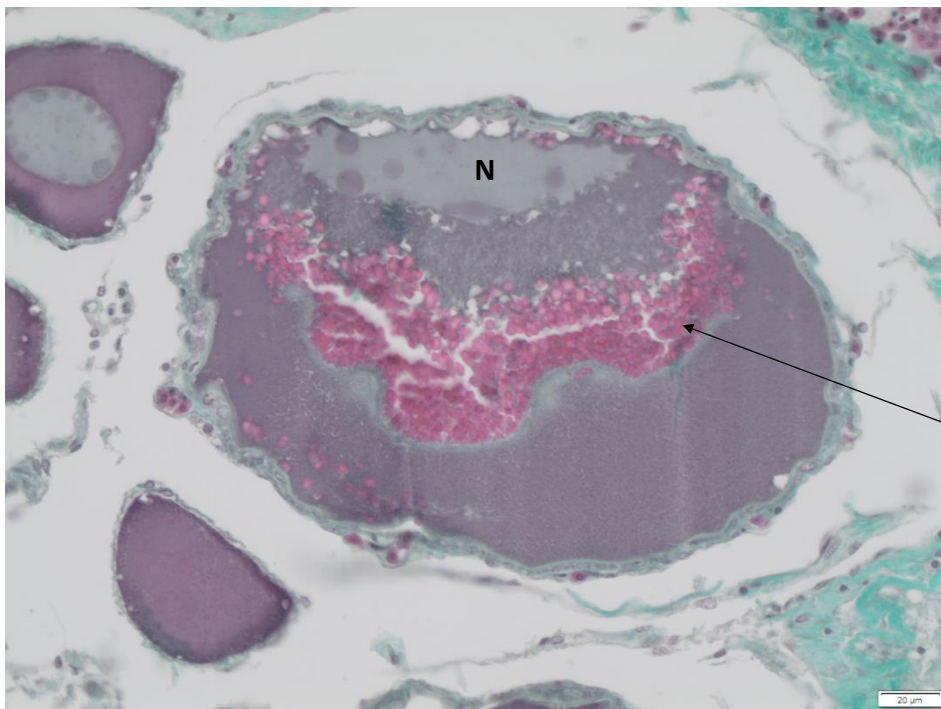


Figure 18 : Ovocyte au stade **vit2**, avec le noyau (**N**) qui a commencé sa migration vers la couronne de gouttelettes de vitellus (**gv**)



gv

Figure 19 : Ovocyte au stade **vit2**, avec le noyau (**N**) déformé qui a commencé sa migration au travers de la couronne de gouttelettes de vitellus (**gv**)



gv

Figure 20 : Ovocyte en fin de stade **vit2**, dont le noyau (**N**) a fini sa migration : il se trouve alors en dehors de la masse de gouttelettes de vitellus (**gv**) et est polarisé

Ovocyte en vitellogénèse avec croissance de la zr (vit3)

Les follicules ovariens entrent dans le stade 3 de la vitellogénèse (**vit3**) quand la *zona radiata* (**zr**) devient acidophile. La **zr** est légèrement striée, prend une teinte rose et commence à augmenter en taille. Les gouttelettes de vitellus (**gv**) vont prendre toute la place à l'intérieur du follicule et commencer à fusionner entre elles pour accroître en taille. Ce stade semble être de courte durée.

Identification : Un ovocyte en vitellogénèse avec croissance de la zona radiata (**vit3**) est caractérisé par une **zr rose, fine et peu striée**, et des **gv de petite et moyenne taille prenant tout l'espace à l'intérieur du follicule**. La présence du noyau n'est pas nécessaire pour l'identification de ce stade.



Taille moyenne

vit3 : 380.02µm (±57.16µm)

zr : 9.21µm (±1.63µm)

Figure 21 : Ovocyte **vit3** en vitellogénèse avec croissance de la *zona radiata* (**zr**) rose et légèrement striée, un noyau (**N**) et de nombreuses gouttelettes de vitellus (**gv**) de tailles variables



Figure 22 : Paroi d'un **vit3** avec une *zona radiata* (**zr**) rose et légèrement striée entre de nombreuses gouttelettes de vitellus de tailles variables (**gv**) et une thèque (**T**) avec des cellules folliculaires (**cf**)

Ovocyte en fin de vitellogénèse (vit4)

Les ovocytes en fin de vitellogénèse (**vit4**) ont des formes polygonales emboîtées. La *zona radiata* (**zr**) est épaisse et très éosinophile, elle présente en fin de stade un aspect strié (stries radiales). L'ovocyte est rempli de gouttelettes de vitellus (**gv**) éosinophiles. Le noyau (**N**) n'est que rarement visible. Autour de la **zr**, on retrouve des cellules folliculaires (**cf**) et la thèque (**T**) associée à des capillaires sanguins (**cs**).

Pour les cellules en vitellogénèse, qui sont très friables lors du processus de coupe, leurs contenues peuvent être arrachés. Ces derniers peuvent alors se retrouver à côté de leur thèque. Dans ces cas-là, si l'absence de thèque permet tout de même l'identification du type de cellule, la classer comme telle.

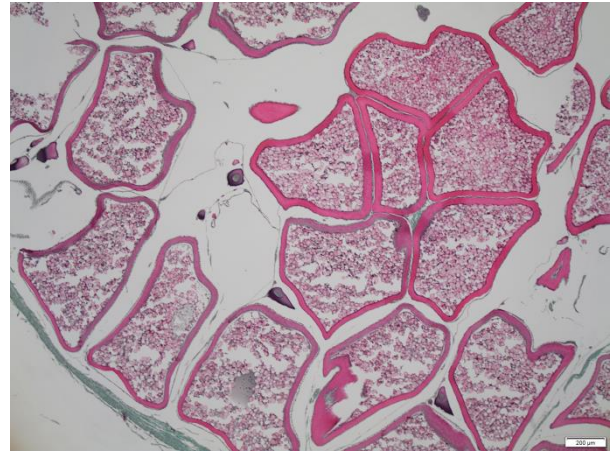


Figure 23 : Structure emboîtée d'ovocytes en fin de vitellogénèse (**vit4**)

Taille moyenne

vit4 : 629.47 μ m (\pm 88.45 μ m)

zr : 53.81 μ m (\pm 5.10 μ m)

Identification : Ces cellules de grosse taille possèdent une **zr épaisse et visible** (rose). Avec leur grande taille, plusieurs croix pourront tomber dans une même cellule. Pour chacune de ces croix il faudra mettre le type cellulaire **vit4**. **L'ovocyte est rempli de gv roses**. Le noyau est parfois visible, mais le voir n'est pas essentiel pour l'identification de ce stade.



Figure 24 : Ovocyte en fin de vitellogénèse (**vit4**) avec une *zona radiata* (**zr**) épaisse, un noyau (**N**) et de nombreuses gouttelettes de vitellus (**gv**) de grosse taille. Présence de la paroi gonadique (**pg**)

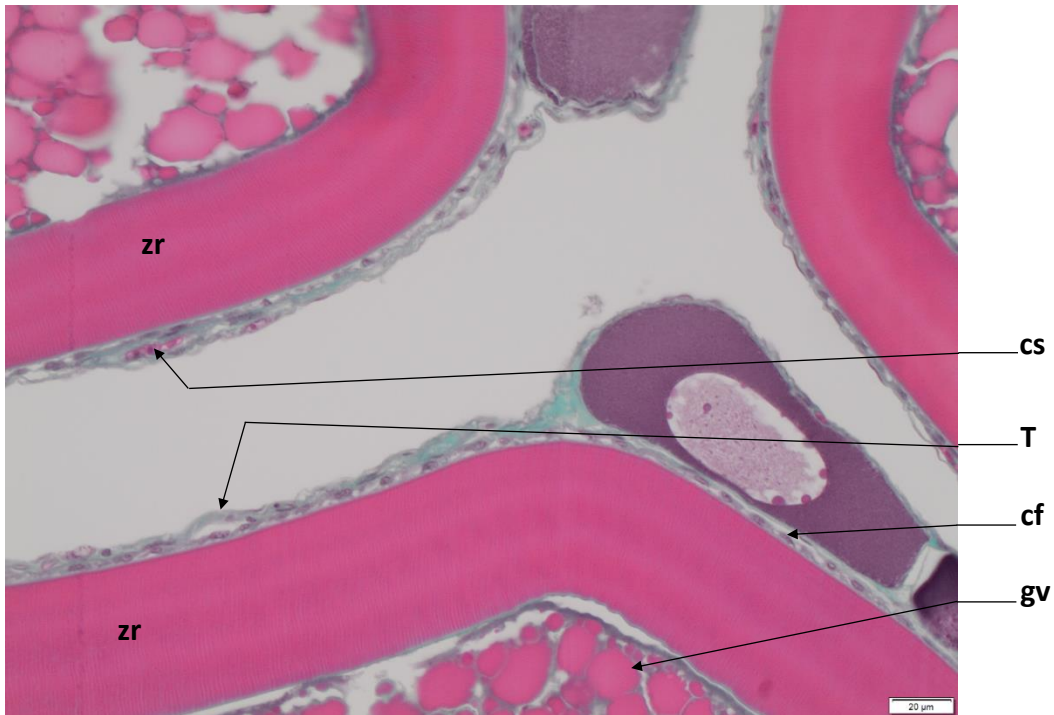
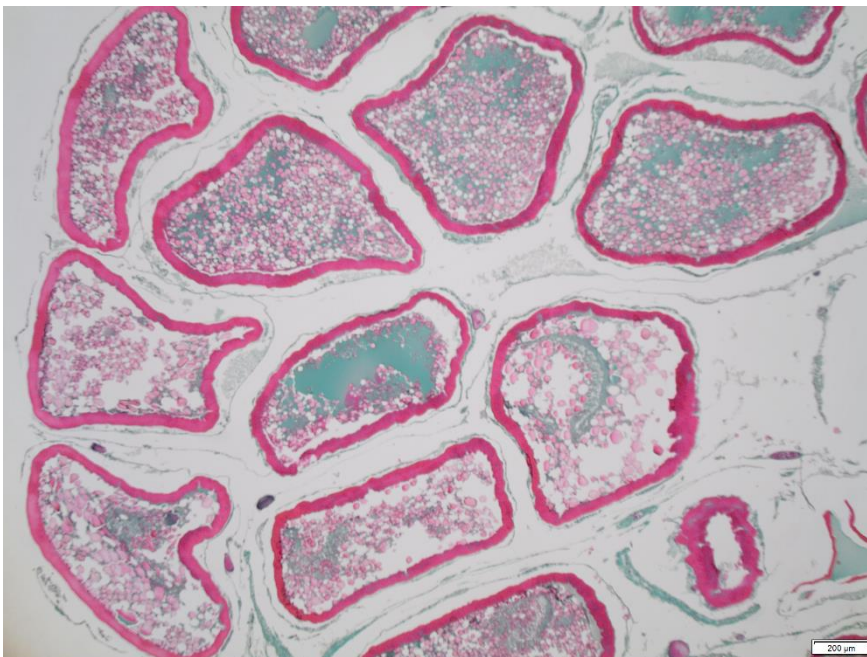


Figure 25 : Paroi d'un ovocyte en fin de vitellogenèse (**vit4**) qui entourent des gouttelettes de vitellus (**gv**). La membrane est constituée de la zona radiata (**zr**), de cellules folliculaires (**cf**) et d'une thèque (**T**) parcourue de capillaires sanguins (**cs**)

Ovocyte en cours d'hydratation (och)

Les gouttelettes de vitellus fusionnent pour donner progressivement zone de vitellus (vi) homogène basophile (zones bleues/vertes). L'ovocyte en cours d'hydratation (och) est entouré d'une épaisse *zona radiata* (zr). Les cellules restent polygonaux et emboîtées entre elles.

Identification : Cette cellule ressemble aux vit4. Les gv commencent à se fractionner afin de donner une **zone de vitellus homogène (zones bleues/vertes)**. Le noyau est parfois visible, mais le voir n'est pas essentiel pour l'identification de cette cellule.



Taille moyenne

och : 847.21µm (±104.01µm)

zr : 33.11µm (±3.50µm)

Figure 26 : Coupe d'un ovaire avec présence d'ovocytes en cours d'hydratation (och)



Figure 27 : Ovocyte en cours d'hydratation (och) avec une épaisse *zona radiata* (zr), un noyau (N), des gouttelettes de vitellus (gv), un début de zone de vitellus homogène (vi) et une thèque (T) avec des capillaires sanguins (cs)

vi

gv

T

cs

Ovocyte hydraté (oh)

L'ovocyte hydraté (**oh**) est caractérisé par un vitellus (**vi**) homogène bleu clair, qui occupe une grande surface du volume de l'ovocyte. Quelques gouttelettes lipidiques (**gl**) sont encore parfois visibles en périphérie de l'ovocyte avec une *zona radiata* (**zr**) épaisse à striations radiales.

Identification : Type cellulaire le plus grand, il sera le plus souvent déformé suite au processus de déshydratation. Qu'il soit émis ou encore dans la lamelle ovarienne, on le compte comme **oh**. La **zr striée est épaisse et rose** et l'**ovocyte est rempli uniquement de vitellus homogène (coloration bleue/verte)**.



Taille moyenne

oh : 958.66µm (±60.66µm)

zr : 40.41 µm (±5.00µm)

Figure 28 : Ovocyte hydraté (**oh**), non émis, avec sa thèque (T)

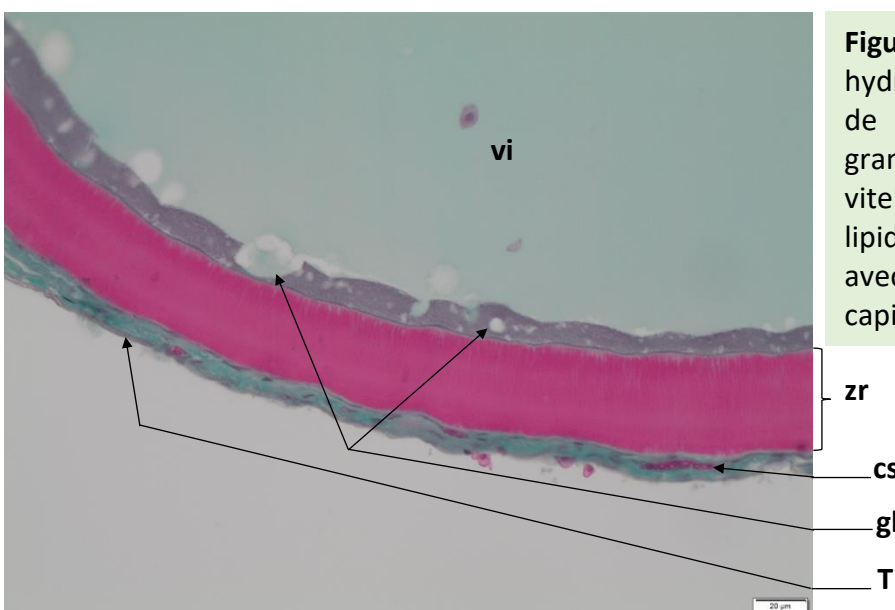


Figure 29 : Paroi d'un ovocyte hydraté (**oh**) non émis (présence de la thèque (T)), avec une grande partie homogène de vitellus (**vi**), des gouttelettes lipidiques (**gl**), la *zona radiata* (**zr**) avec des stries radiales, et des capillaires sanguins (**cs**)

Follicule Post-Ovulatoire (POF)

Les follicules post-ovulatoires, ou « post-ovulatory follicle » (**POF**), peuvent présenter des signes de lyse (présence de cellules macrophages (**cm**) à l'intérieur). La présence d'un **POF** indique qu'un ovocyte hydraté (**oh**) a été émis.

Un **POF** est l'ensemble des tissus somatiques du follicule (thèque (**T**) et cellules folliculaires (**cf**)) laissé derrière suite à l'émission de l'ovocyte hydraté (**oh**). Leur coloration verte est identique à celle du tissu conjonctif (**tc**). Il faut donc se méfier à ne pas ranger un **POF** dans la catégorie **tc**. Les **POF** sont de tailles et formes très variées, car ce sont des poches vides qui se rétractent.

Identification : Un **POF** est une **poche de tissu somatique** et peut être caractérisée par la **présence de cellules macrophages dans sa cavité centrale**. Les cellules macrophages (**cm**) sont de petites tailles, grises, et le plus souvent nombreuses et agglomérées entre elles.

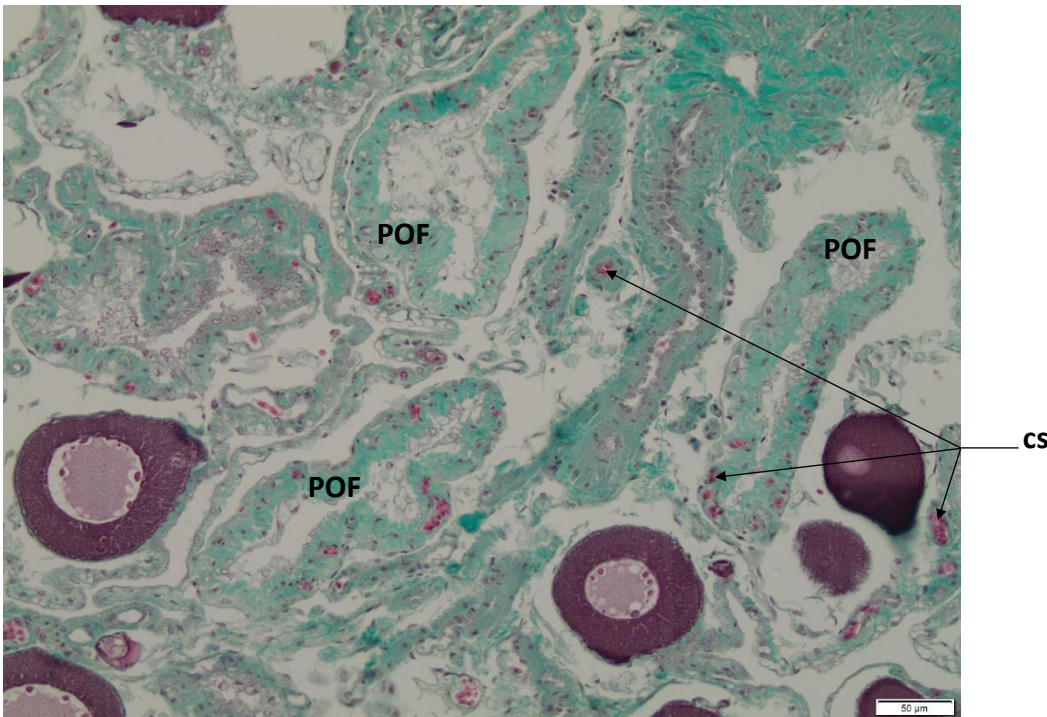


Figure 30 : Follicule post-ovulatoire (**POF**) avec présence de capillaire sanguin (**cs**)

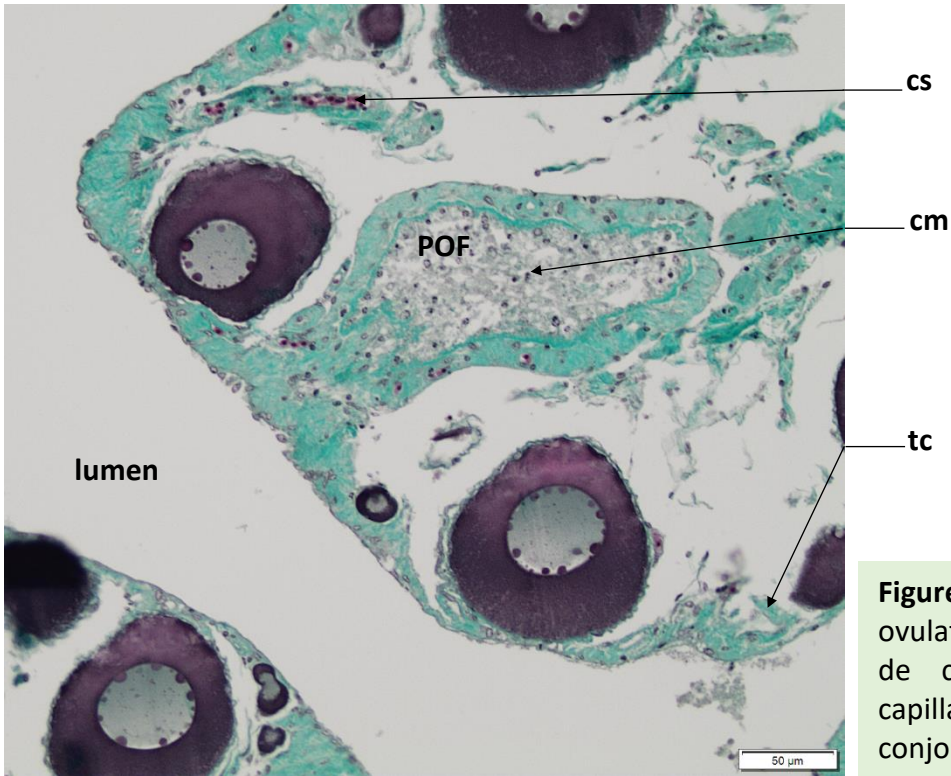


Figure 31 : Follicule post-ovulatoire (**POF**) avec présence de cellules de lyse (**cm**), capillaire sanguin (**cs**) et tissu conjonctif (**tc**)

Atrésie (oaA & oaB) et Lyse (L)

D'après Torres-Martínez et al. (2017), l'atrésie c'est la dégénérescence, la réabsorption, voir l'ablation, de follicules ovariens. En général, le premier signe d'atrésie est la désintégration de la vésicule germinative de l'ovocyte, suivi par une fragmentation de la *zona radiata* (**zr**) qui devient irrégulière et d'une hypertrophie des cellules folliculaires. On peut aussi avoir une différenciation de cellules folliculaires (**cf**) en phagocytes et/ou la présence de macrophages.

Ici, nous distinguerons l'atrésie précoce (**oaA**) de l'atrésie tardive (**oaB**). **oaA** concerne toute cellule germinale en lyse allant du stade d'ovogonie (**ov**) au stade ovocyte hydraté (**oh**) **non-émis**, et donc toujours enveloppé de cellules somatiques (cellules folliculaires (**cf**) et/ou thèque (**T**)). L'**oaB** concernera les ovocytes hydratés en lyse qui ont déjà **été émis** et ne sont donc plus entourés de cellules somatiques. Étant une structure en lyse dans la cavité centrale de la gonade, les **oaB** seront le plus souvent déformés, déchirés et accompagnés de plages de lyse (**L**).

Identification : Un **oaA** est un **follicule en état de lyse**. C'est-à-dire qu'il sera **toujours entouré d'une thèque**, et sera situé **dans la lamelle ovarienne**.

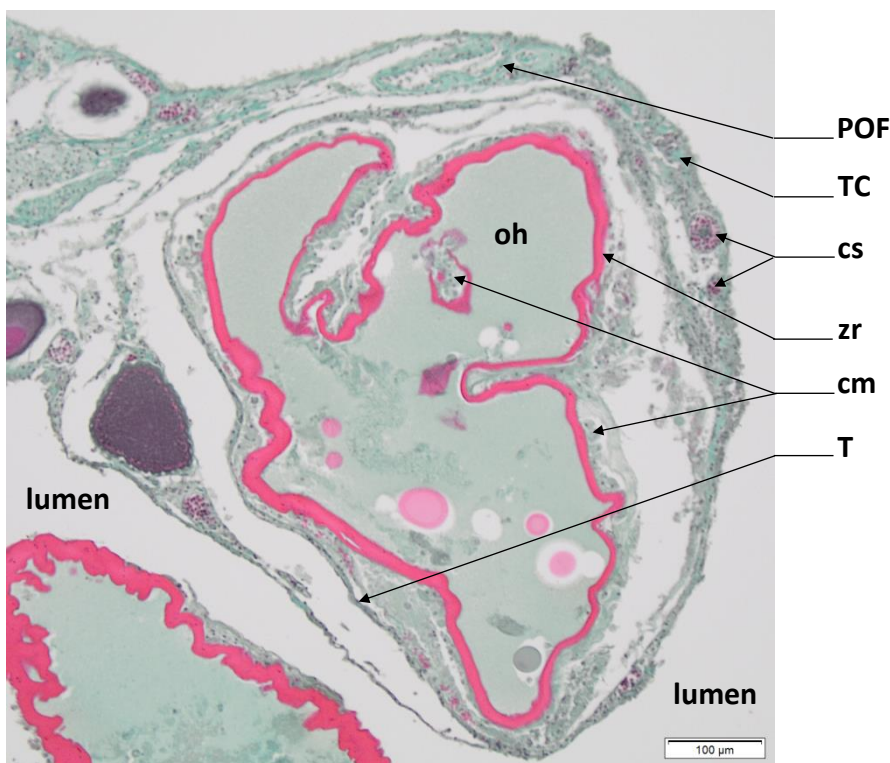


Figure 32 : Ovocyte hydraté en atrésie précoce (**oaA**). L'ovocyte hydraté (**oh**) n'a pas été émis dans le **lumen**, il est encore dans le tissu conjonctif (**tc**) de la lamelle ovarienne, entouré de sa thèque (**T**) et de macrophages (**cm**) sont observés entre la thèque et la **zr**. Présence de **POF** et capillaires sanguins (**cs**)

Identification : Un **oaB** est un **ovocyte en état de lyse**. C'est-à-dire qu'il n'est plus entouré d'une **thèque**, et sera situé **dans la lumière de la gonade**. Un **oaB** sera **délimité par sa zr**. Si une croix de comptage tombe sur une « zone blanche », même si elle est entourée de structures **oaB**, cette croix sera répertoriée sous **ei**. De plus, **toute plage de lyse proche de la masse atrétique avec la zr de l'oaB fera partie de l'oaB**.



Figure 33 : Ovocyte hydraté en atrésie tardive (**oaB**). L'ovocyte hydraté (**oh**) a été émis, il est dans la lumière de la gonade (**lumen**) et est entouré de cellules macrophages (**cm**)

Identification : Les plages de lyse peuvent être difficiles à déterminer, notamment en présence d'atrésie. Elles peuvent être **trouvées n'importe où à travers la gonade** et à **n'importe quelle phase de maturité**. C'est un **amas de cellules en lyse**, où l'on peut retrouver des cellules macrophages. Les plages de lyse sont de **tailles et formes aléatoires**, avec **absence de thèque et/ou de zona radiata**.

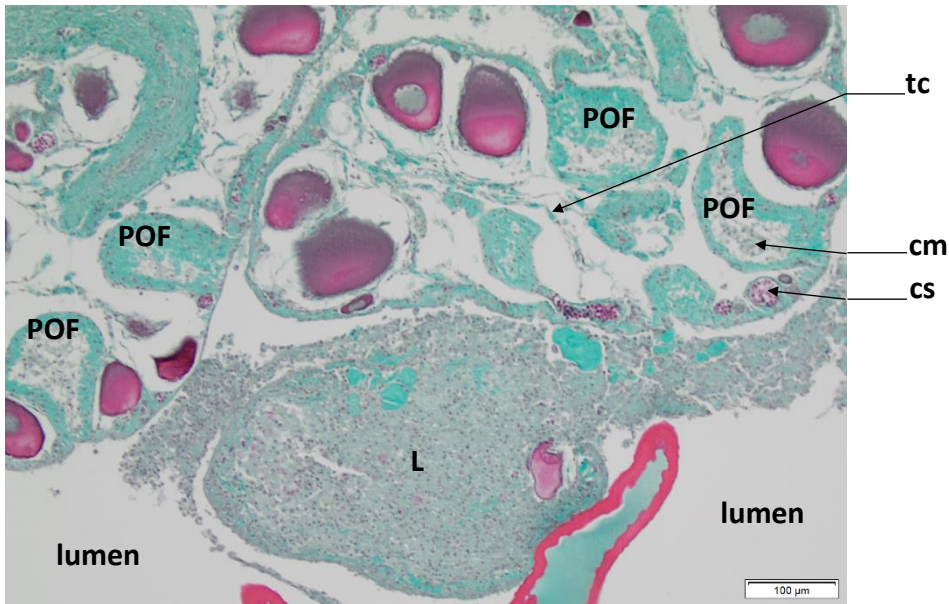


Figure 34 : Plage de lyse cellulaire (L) dans le **lumen**, avec présence de follicules post-ovulatoires (POF) qui contiennent des cellules de lyse (cm). Présence aussi de tissu conjonctif (tc) et capillaires sanguins (cs)

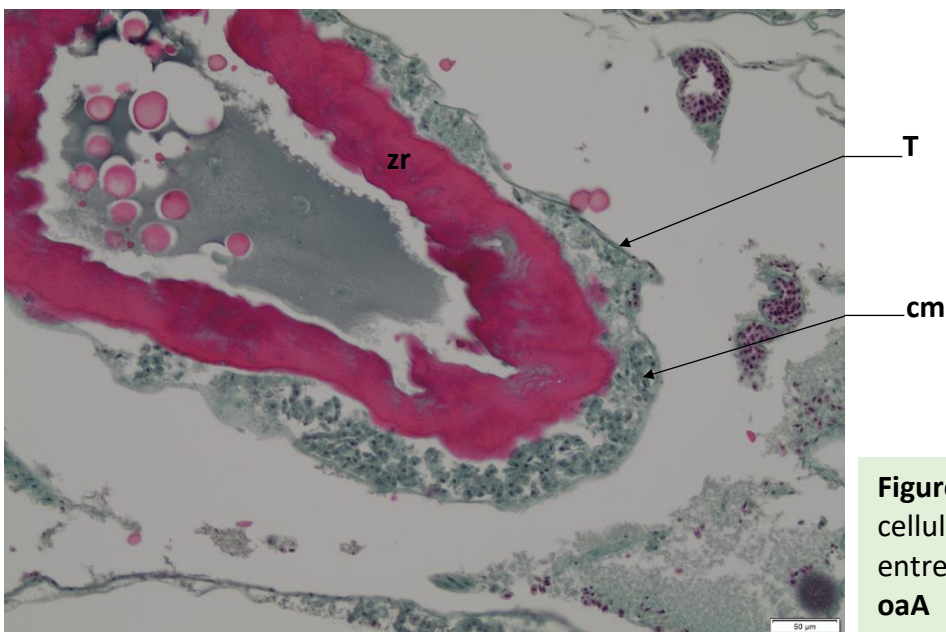


Figure 35 : Zoom sur des cellules macrophages (cm) entre la zr et la thèque (T) d'un oaA

Tissu conjonctif (tc) & Paroi gonadique (pg)

Le tissu conjonctif (**tc**) relie toutes les structures entre elles et forme les lamelles ovariennes. Dans les lamelles ovariennes on retrouve les follicules à identifier entourés de **tc**.

Le tissu conjonctif (**tc**) est composé de cellules colorées en vert, comme celles de la paroi gonadique (**pg**). Ces dernières sont du tissu musculaire alors que le **tc** ne l'est pas. Attention à ne pas les confondre ! Même si une croix de comptage tombe sur un tout petit morceau de **tc** au milieu d'un espace intercellulaire (**ei**) on coche la case de **tc** pour cette occurrence.

La paroi gonadique est de la même coloration verte que le **tc**. Des tissus musculaires, ainsi que des capillaires sanguins (**cs**), peuvent être présents dans la **pg**. Si une croix de comptage, qui se trouve dans la zone de la **pg**, tombe sur du tissu musculaire, il faut la répertorier sous **pg**. Par contre, si une croix de comptage dans la zone de la **pg** tombe sur un capillaire sanguin (**cs**), alors il faut répertorier la structure sous **cs**.

La zone de la **pg** est délimitée entre la couche de cellule la plus externe et la couche de cellule de la **pg** la plus interne, juste avant de rentrer dans les lamelles ovariennes. Si la paroi gonadique a été étirée, déchirée ou écartée, mais que la croix de comptage tombe entre la couche de cellule la plus externe et la couche de cellule la plus interne, avant d'arriver aux lamelles ovariennes, alors on compte cet espace comme de la **pg**. Ne pas hésiter à dézoomer pour obtenir une vue d'ensemble de la gonade, afin de bien voir la limite entre la **pg** et le **tc**.

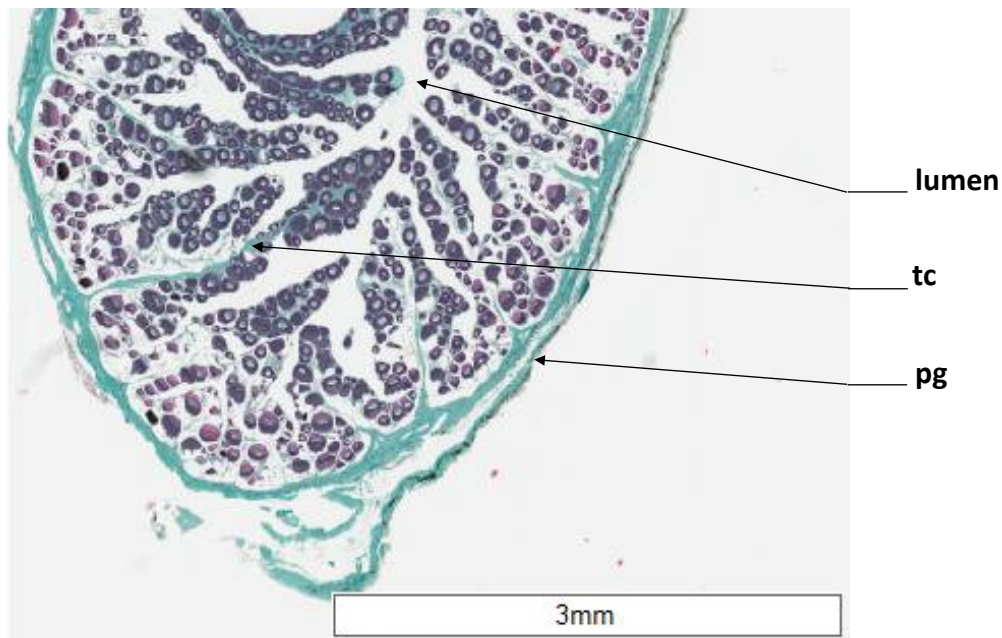


Figure 36 : Coupe d'ovaire de plie entourée de la paroi gonadique (**pg**). Les lamelles ovariennes tenues par du tissu conjonctif (**tc**) délimitent la zone du **lumen**

Capillaire sanguin (cs)

Les capillaires sanguins (**cs**) sont des structures plus ou moins petites, pouvant aller du diamètre d'une seule cellule à plus de 100µm.

Retrouvés au niveau de la thèque (**T**), dans le tissu conjonctif (**tc**) ou encore dans la paroi gonadique (**pg**), les capillaires ou vaisseaux sanguins (**cs**) sont caractérisés par la présence de cellules sanguines (petites cellules colorées en rouge avec un noyau central foncé). Si une croix de comptage tombe dans la « zone blanche » d'une cavité contenant que des cellules sanguines, cette croix sera comptée en **cs**.

Espace intercellulaire (ei) et Vide (v)

Entrent dans la catégorie **ei** toutes croix de comptage dont le centre, mesuré au pixel près, tombe dans une « zone blanche » qui est à l'intérieur de la paroi gonadique (**pg**) et/ou du tissu conjonctif (**tc**).

Dans le cas où des cellules se retrouvent en dehors de la **pg**, toute « zone blanche » entre les cellules, ou à l'intérieur du **tc**, sont considérées comme de l'**ei**.

Entrent dans la catégorie **v** toutes croix de comptage dont le centre, mesuré au pixel près, tombe dans une « zone blanche » qui est à l'extérieur de la gonade. Normalement c'est l'espace entre la **pg** et la ligne qui délimite notre plan d'échantillonnage autour de la gonade.

Dans le cas où des cellules se retrouvent en dehors de la **pg**, si la croix tombe entre la ligne rouge qui délimite la zone d'échantillonnage et du **tc** et/ou de la **pg**, alors on classe la croix de comptage sous **v**.

Si une croix tombe dans une « zone blanche » entourée uniquement d'une thèque et/ou **zr** (le centre de la cellule a été arraché), alors on classe cette croix de comptage sous **v**.

Indéterminé (i)

Cette catégorie permet de regrouper toutes les structures qui n'ont pas été identifiées parmi les 20 notées ci-dessus. **En cas de doute, mieux vaut choisir la catégorie indéterminée (i) que de valider une structure qui pourrait s'avérer fausse.**

Si deux structures se superposent au niveau d'une croix de comptage, on choisit la structure du dessous. Si cette dernière n'est pas identifiable, alors elle sera classée dans **i**.

Si la croix tombe sur deux types de structures différentes, ou que la résolution de l'image ne permet pas de définir exactement où se trouve le centre de la croix par rapport à l'image, ou que l'on met plus de 2 minutes à essayer de classer la structure, classez cette dernière dans **i**.

Mettre dans **i** :

- les structures floues
- les cellules dont la membrane nucléaire n'est pas nette
- les structures ressemblant à un **ov** sans noyau
- les structures ressemblant à un **op1** sans noyau
- les structures ressemblant à un **op2** sans noyau
- les structures ressemblant à un **oca** sans noyau
- les structures non répertoriées dans le lexique ou protocole (Sauger et al., 2019)
- les morceaux de cellules sans thèque que l'on n'arrive pas à déterminer

Références

- Alonso-Fernández, A., Villegas-Ríos, D., Valdés-López, M., Olveira-Domínguez, B., Saborido-Rey, F.,** 2013. Reproductive biology of pollack (*Pollachius pollachius*) from the Galician shelf (north-west Spain). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 93, 1951-1963.
- Anderson, E.,** 1968. Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in the Pipefish, *Syngnathus fuscus*, and the Killifish, *Fundulus heteroclitus*. *J. Morphol.* 125, 23-60.
- Aragón, L., Aranda, G., Santos, A., Medina, A.,** 2010. Quantification of ovarian follicles in bluefin tuna *Thunnus thynnus* by two stereological methods. *J. Fish Biol.* 77, 719-730.
- Barr, W.A.,** 1963. The endocrine control of the sexual cycle in the Plaice, *Pleuronectes platessa* (L). I. Cyclical changes in the normal ovary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 3, 197-204.
- Bazzoli, N., Godinho, H.P.,** 1994. Cortical alveoli in oocytes of freshwater neotropical teleost fish. *Boll. Zool.* 61, 301-308.
- Bromley, P.J., Ravier, C., Witthames, P.R.,** 2000. The influence of feeding regime on sexual maturation, fecundity and atresia in first-time spawning turbot. *J. Fish Biol.* 56, 264-278.
- Brown-Peterson, N.J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B.J., Lowerre-Barbieri, S.K.,** 2011. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. *Mar. Coast. Fish.* 3, 52-70.
- Brule, T.,** 1987. The reproductive biology and the pathological changes of the plaice *Pleuronectes platessa* (L.) after the 'Amoco Cadiz' oil spill along the north-west coast of Brittany. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 67, 237-247.
- Domínguez-Castanedo, O., Uribe, M.C., Rosales-Torres, A.M.,** 2016. Morphological development of the structures related to annualism in the ovarian follicle of the killifish *Millerichthys robustus* (Costa,1995) (Teleostei: Cyprinodontiformes). *J. Morphol.* 277, 1219-1230.
- Gabe, M.,** 1968. *Techniques Histologiques*, 2ème ed. Masson et C., Paris.
- ICES,** 2008. Report of the Workshop on Maturity Ogive Estimation for Stock Assessment (WKMOG), 3-6 June 2008, Lisbon, Portugal. ICES CM2008/ACOM:33. 72 pp.
- ICES,** 2010. Report of the ICES/HELCOM Workshop on Flatfish in the Baltic Sea (WKFLABA), 8-11 November 2010, Öregrund, Sweden. ICES CM 2010/ACOM:68. 85pp.
- ICES,** 2013. Report of the Workshop on sexual maturity staging of cod, whiting, had-dock, saithe and hake (WKMSGAD), 4-8 November 2013, San Sebastian, Spain. ICES CM 2013:57. 51pp.
- ICES,** 2014. Report of the Workshop for maturity staging chairs (WKMATCH), 11-15 June 2012, Split, Croatia. ICES CM 2012/ACOM:58. 57 pp.

ICES, 2018. Working Group on Biological Parameters (WGBIOP), 1-5 October 2018. Ghent, Belgium. ICES CM 2018/EOSG:07. 186pp.

Lincoln, R.F., 1981. Sexual maturation in female triploid plaice, *Pleuronectes platessa*, and plaice x flounder, *Platichthys flesus*, hybrids. J. Fish Biol., The Fisheries Society of the British Isles 19, 499-508.

Lowerre-Barbieri, S.K., Brown-Peterson, N.J., Murua, H., Tomkiewicz, J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., 2011. Emerging Issues and Methodological Advances in Fisheries Reproductive Biology. Mar. Coast. Fish. 3, 32-51

Miossec, L., 1984. Altération de l'ovogénèse des Plies *Pleuronectes platessa* L. capturées dans les abers Wrac'h et Benoit, depuis la pollution de l'Amoco-Cadiz. Rev. trav. Inst. pêches marit. 46, 195-207.

Sauger, C., Quinquis, J., Dubroca, L., Kellner, K., Lepoittevin, M., Heude-Berthelin, C., Elie, N., 2019. Protocole de détermination des structures histologiques d'ovaires et de l'ovogénèse de la plie, *Pleuronectes platessa* (Linné, 1758). <https://doi.org/10.13155/61235>

Torres-Martínez, A., Hernández-Franyutti, A., Uribe, M.C., Contreras-Sánchez, W.M., 2017. Ovarian structure and oogenesis of the extremophile viviparous teleost *Poecilia mexicana* (Poeciliidae) from an active sulfur spring cave in Southern Mexico. J. Morphol., Wiley Periodicals 278, 1667-1681.

Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. Rev. Fish Biol. Fish., Chapman & Hall 6, 287-318.

Publication 5

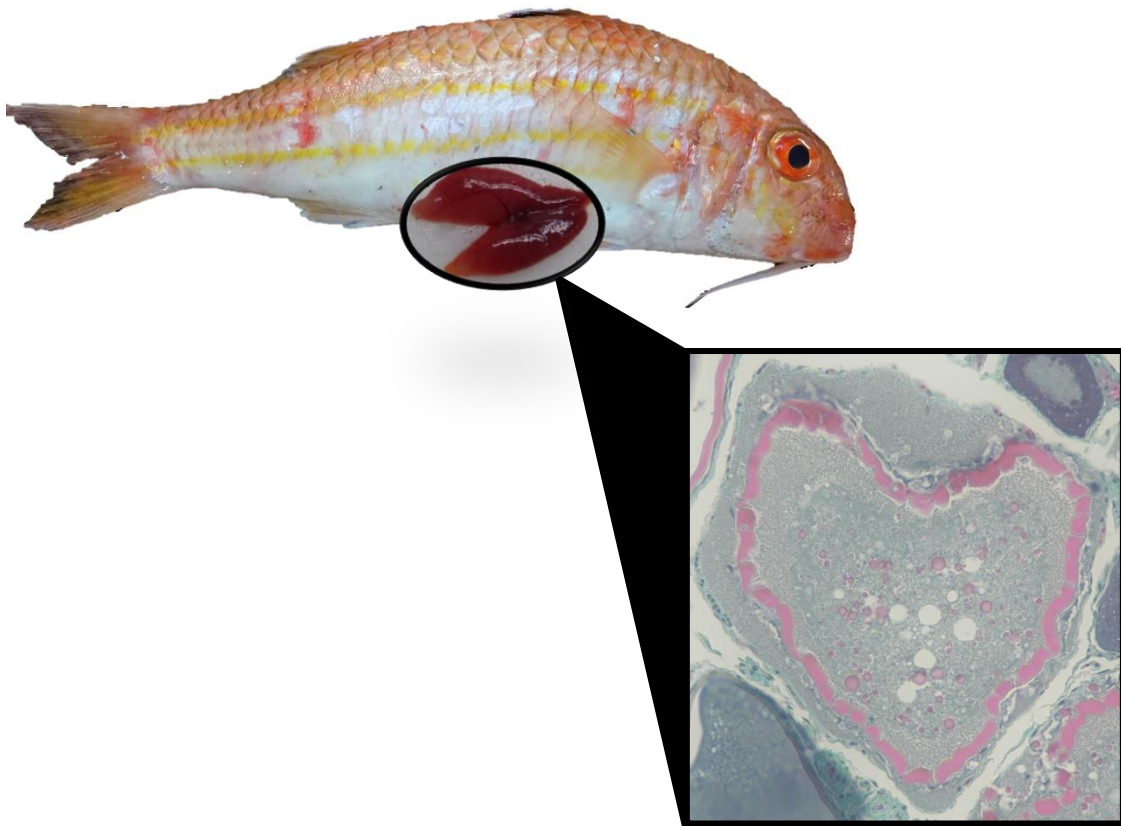
Lexique ovogenèse de *Mullus surmuletus*

Citation : Heude-Berthelin, C., Dubroca, L., Kellner, K., Le Meleder, A., Martin, V., Sauger, C. (2023) «Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the red mullet, *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758)». DOI : <https://doi.org/10.13155/75174>

Résumé : Lexique décrivant les différentes structures et stades cellulaires de la lignée germinale qui peuvent être retrouvés dans les ovaires du rouget barbet de roche (*Mullus surmuletus*). Ce document est le référentiel pour l'identification des cellules de la lignée germinale lors des lectures stéréologiques des lames ovariennes de *Mullus surmuletus*. Lexique en anglais disponible en accès libre sur **Archimer**.

Contribution : Conception et aide à la rédaction du document avec prise des photos et mesures des cellules. Mises à jour et publication des différentes versions.

Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the striped red mullet, *Mullus surmuletus* (Linnaeus, 1758)



BERTHELIN Clothilde
DUBROCA Laurent
KELLNER Kristell
LE MELEDER Anna
MARTIN Valentine
SAUGER Carine

April 2023

Cover photo: Picture of a vitellogenic oocyte in atresia found in a red mullet (*Mullus surmuletus*) ovary. Personal collection. C. Sauger©

Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the red mullet, *Mullus surmuletus* (Linnaeus, 1758)

The digital version of this document is available on the Archimer Web site.

The digital version of the reading protocol that accompanies this document is available on the Archimer Web site.

Version	Date	Comments
1.0	April 2022	Conception of the document
2.0	May 2022	Added a cellular structure, sizes and corrections
2.1	August 2022	Figure changes and pictures added
2.2	March 2023	Picture for $oa\beta$ updated
2.3	April 2023	Minor corrections

Summary

Abbreviations.....	1
Introduction.....	2
Overall ovarian organization.....	5
Decision Tree.....	7
Follicle Summary Sheet.....	8
Oogonium (og).....	9
Primary oocyte stage 1 (po1).....	10
Primary oocyte stage 2 (po2).....	11
Lipid droplets oocyte (ldo).....	12
Cortical alveoli oocyte (cao).....	13
Oocyte in early vitellogenesis (vtg1).....	15
Oocyte in vitellogenesis stage 2 (vtg2).....	17
Oocyte in hydration (oih).....	18
Hydrated oocyte (ho).....	20
Post-Ovulatory Follicle (POF).....	21
Atresia (aoA & aoB) and Lysis (L).....	22
Connective tissue (ct) & Gonadal wall (gw).....	25
Blood vessel (bv).....	26
Bibliography.....	27

Abbreviations

aoA : undischarged atretic oocyte
aoB : discharged atretic oocyte
bv : blood vessel
CA : cortical alveoli
cao : cortical alveoli oocyte
chr : condensed chromosome
chrom : chromatin
ct : connective tissue
E : unnatural emptiness (from the section's cut)
fc : follicular cell
gw : gonadal wall
ho : hydrated oocyte
Is : Intercellular space
L : lysis
ld : lipid droplet
ldo : lipid droplets oocyte
mc : macrophage cell
N : nucleus
NC : Nucleo-Cytoplasmic
nl : nucleolus
og : oogonium
oih : oocyte in hydration
po1 : primary oocyte stage 1
po2 : primary oocyte stage 2
POF : Post-Ovulatory Follicle
SI : sexually immature
SM : sexually mature
som : somatic cell
T : theca
U : undetermined structure
vd : vitellus droplet
vi : vitellus
vtg1 : oocyte in stage 1 of vitellogenesis
vtg2 : oocyte in stage 2 of vitellogenesis
zr : *zona radiata*



Introduction

During this study, the terminology used was that of Brown-Peterson *et al.* (2011), following the criteria set by the working groups of the International Council for the Exploration of the Sea (ICES) that described the different maturity phases for European stock species (ICES 2008, 2010, 2012, 2018, 2019).

For the description of the female germinal cells that will become gametes, the terms **oogonia** (before meiosis) or **oocyte** (meiosis has begun) will be used. An oocyte is characterized by an **ooplasm** encased in an **oolemma** (plasmic membrane) (Tyler and Sumpter, 1996). A **zona radiata** will also be present once the cell becomes dependent on follicle-stimulating hormone (FSH).

The term **follicle** will be used to designate an oocyte encased in somatic cells: **follicular cells** and **theca cells** (Tyler and Sumpter, 1996).

For the description of geminal cells development, the term **stage** will be used to designate the different gametogenesis stages (Brown-Peterson *et al.*, 2011) :

- Oogonia
- Primary growth oocytes
- Secondary growth oocytes
- Oocyte maturation
- Ovulation stage

The sexual maturity cycle (*Figure 1*) is split into two **states**. The Sexually Immature (**SI**) state and the Sexually Mature (**SM**) state. The terminology **phase** will be used for the gonadal development. The reproduction cycle of fish is divided into seven **phases** (Brown-Peterson *et al.*, 2011; ICES, 2012; 2018).

- Immature
- Developing
- Spawning
- Regressing
- Regenerating
- Omitted spawning
- Abnormal

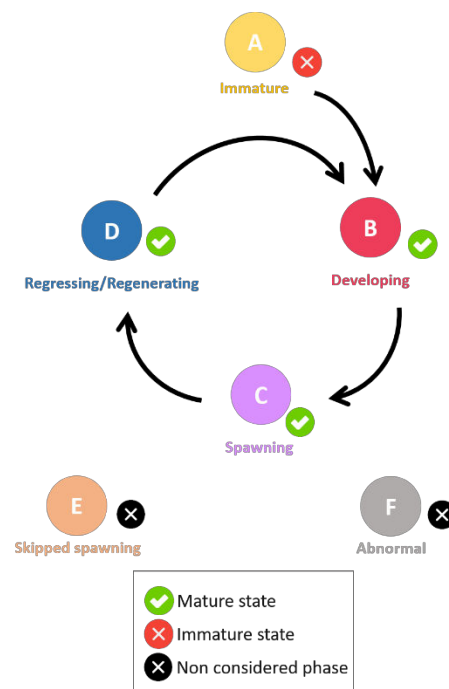


Figure 1 : Different phases found in the teleost maturation cycle, from the ICES (2018). The phases being: Immature (A), Developing (B), Spawning (C), Regressing/Regenerating (D), Skipped spawning (E) and Abnormal (F)

Sub-divisions/Sub-phases (Ba, Bb, Ca, Cb, Da, Db) should be used for specific particularities, meaning that their use is optional and must be evaluated for each species (ICES, 2012).

Table 1 : Macroscopic and microscopic descriptions of the phases in the reproductive cycle of female fish, from Brown-Peterson *et al.* (2011). Timing within each phase is species dependent. Some criteria listed for phases may vary depending on species, reproductive strategy, or water temperature. Subphases that apply to all fishes are listed; additional subphases can be defined by individual researchers. With CA = cortical alveoli, GVBD = germinal vesicle breakdown, GVM = germinal vesicle migration, OM = oocyte maturation, PG = primary growth, POF = post-ovulatory follicle complex, Vtg1 = primary vitellogenic, Vtg2 = secondary vitellogenic and Vtg3 = tertiary vitellogenic

Phase	Previous terminology	Macroscopic and histological features
Immature (never spawned)	Immature, virgin	Small ovaries, often clear, blood vessels indistinct. Only oogonia and PG oocytes present. No atresia or muscle bundles. Thin ovarian wall and little space between oocytes.
Developing (ovaries beginning to develop, but not ready to spawn)	Maturing, early developing, early maturation, mid-maturation, ripening, previtellogenic	Enlarging ovaries, blood vessels becoming more distinct. PG, CA, Vtg1, and Vtg2 oocytes present. No evidence of POFs or Vtg3 oocytes. Some atresia can be present. <i>Early developing subphase</i> : PG and CA oocytes only.
Spawning capable (fish are developmentally and physiologically able to spawn in this cycle)	Mature, late developing, late maturation, late ripening, total maturation, gravid, vitellogenic, ripe, partially spent, fully developed, prespawning, running ripe, final OM, spawning, gravid, ovulated	Large ovaries, blood vessels prominent. Individual oocytes visible macroscopically. Vtg3 oocytes present or POFs present in batch spawners. Atresia of vitellogenic and/or hydrated oocytes may be present. Early stages of OM can be present. <i>Actively spawning subphase</i> : oocytes undergoing late GVM, GVBD, hydration, or ovulation.
Regressing (cessation of spawning)	Spent, regression, postspawning, recovering	Flaccid ovaries, blood vessels prominent. Atresia (any stage) and POFs present. Some CA and/or vitellogenic (Vtg1, Vtg2) oocytes present.
Regenerating (sexually mature, reproductively inactive)	Resting, regressed, recovering, inactive	Small ovaries, blood vessels reduced but present. Only oogonia and PG oocytes present. Muscle bundles, enlarged blood vessels, thick ovarian wall and/or gamma/delta atresia or old, degenerating POFs may be present.

For the histological slides, fresh ovaries were placed in a Davidson solution before their inclusion in paraffin. 3 µm thick sections were cut using a microtome (HM330) and were either trichrome stained with a Prenant-Gabe (Gabe, 1968) solution or Alcian blue stained.

The histological pictures found in this lexicon were taken with a Nikon Eclipse 80i microscope using the NIS-Elements D (v. 5.02.03) software. Mean cell diameters and mean *zona radiata* widths were taken with an Olympus AX70 microscope using the Olympus CellSens© software, on a minimum of 20 oocytes found throughout multiple slides.

As seen in Table 1, different **phases** are correlated with the presence or absence of specific cell types. Following the terminologies and definitions of Brown-Peterson *et al.* (2011) and the ICES (2012; 2018). For the red striped mullet (*Mullus surmuletus*), the different cell types described in this work will be shown in bold (**og**, **po1**, **po2**, **ldo**, **cao**, **vtg1**, **vtg2**, **oih**, **ho**, **POF**) while their matching *Figures* will be indicated in italic.

- Oogonium stage :
 - oogonium (**og**) (*Figure 6 & 7*)
- Primary growth oocytes :
 - Primary stage 1 oocyte (**po1**) (*Figures 8 & 9*)
 - Primary stage 2 oocyte (**po2**) (*Figures 10 & 11*)
 - Lipid droplets oocytes (**ldo**) (*Figure 12*)
- Secondary growth oocytes :
 - cortical alveoli oocytes with lipid droplets (**cao**) (*Figures 13 to 15*)
 - vitellogenic oocytes
 - subphase vtg1 : **vtg1** (*Figures 16 to 18*)
 - subphase vtg2 : **vtg2** (*Figure 19*)
- Oocyte maturation :
 - nucleus migration :
 - germinal vesicle breakdown : oocyte enters metaphase I of meiosis
 - vitellus coalescence : oocyte in hydration (**oih**) (*Figures 20 & 21*)
 - hydration : hydrated oocytes (**ho**) (*Figure 22*)
- Ovulation stage : discharge of the hydrated oocytes into the ovary's lumen, leaving behind a post-ovulatory follicle (**POF**) (*Figure 23*)

Determination key for the germinal cells of female *Mullus surmuletus*

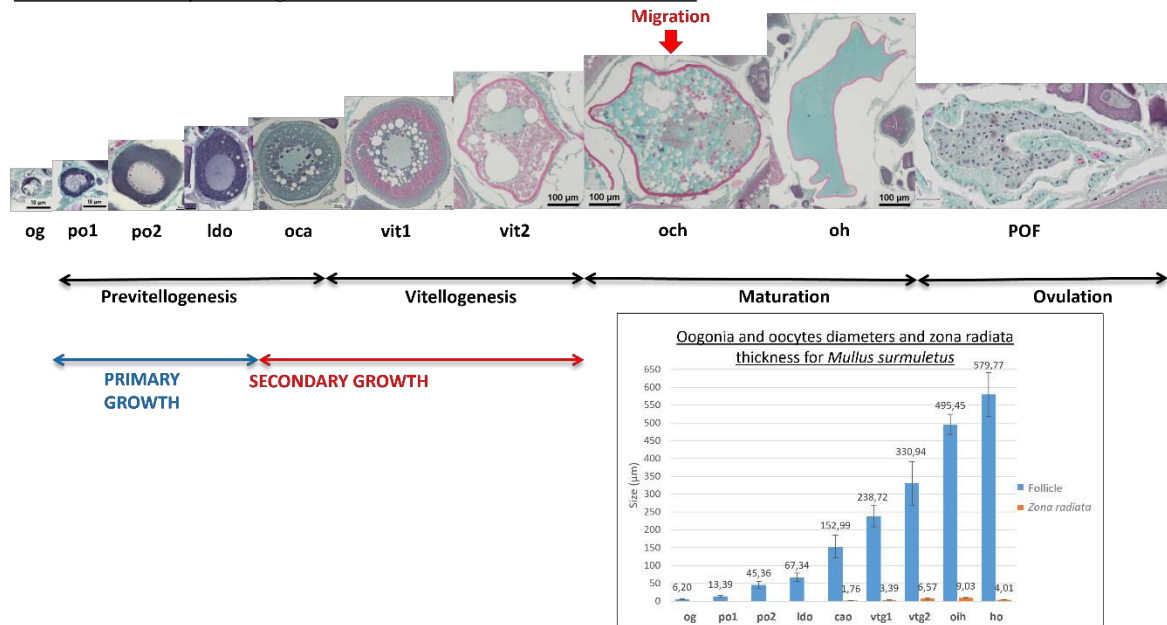


Figure 2 : Determination key for the different female germinal cells that are found in the ovaries of *Mullus surmuletus* at different oogenesis stages. With average oogonium and oocyte diameters (µm ± standard deviation), and *zona radiata* widths (µm ± standard deviation)

Overall ovarian organization

The red mullet is a **batch spawner** species, meaning that females will release hydrated oocytes multiple times, at different time intervals, during a single breeding season.



Figure 3 : Dissected female red striped mullet, *Mullus surmuletus*, with both ovaries uncovered

left ovary

right ovary

Criteria like gonadal wall (**gw**) thickness, connective tissue (**ct**) quantity, gonad vascularization (**bv**) or the surface area of the **lumen**, will depend on the fish's maturity phase. The histological cross sections will be visually different, with germinal cells at various stages of oogenesis.

Each gonad is organized concentrically (*Figure 4* and *Figure 5*), with the ovarian lamellas delimited by the germinal epithelium. The germinal cells (oogonia and oocytes) are found within these ovarian lamellas, inside follicles, at different stages of oogenesis. The connective tissue (**ct**) will hold the germinal cells together, and the gonad wall (**gw**) can vary in thickness. Finally, the **lumen** is the naturally empty space found between the germinal epithelium lamellas inside the ovary.

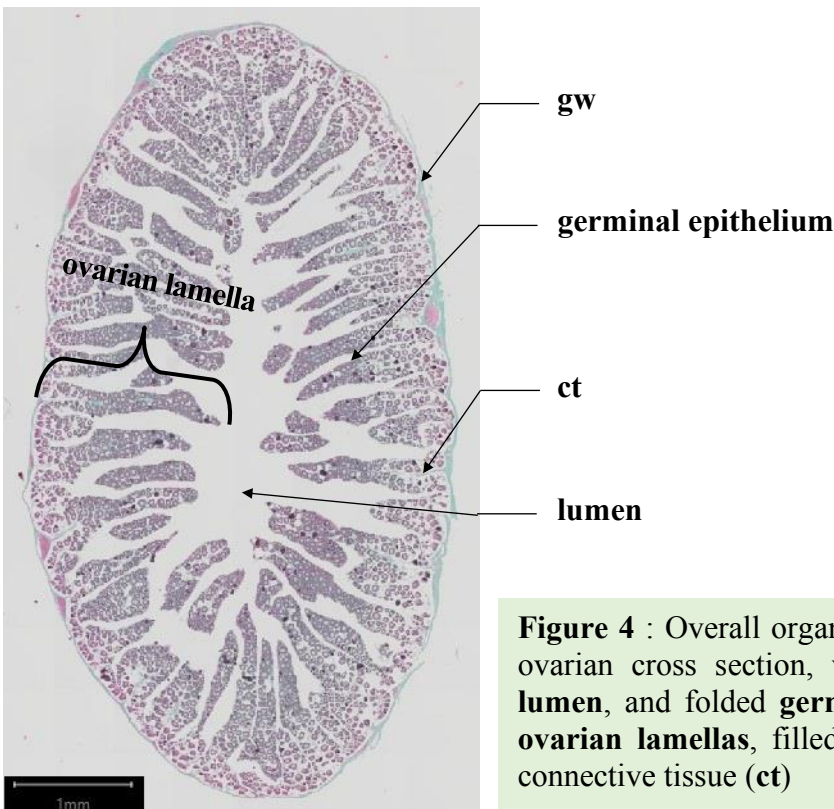


Figure 4 : Overall organization of a red striped mullet's ovarian cross section, with the gonad wall (**gw**), the **lumen**, and folded **germinal epithelium** that make the **ovarian lamellas**, filled with oocytes held together by connective tissue (**ct**)

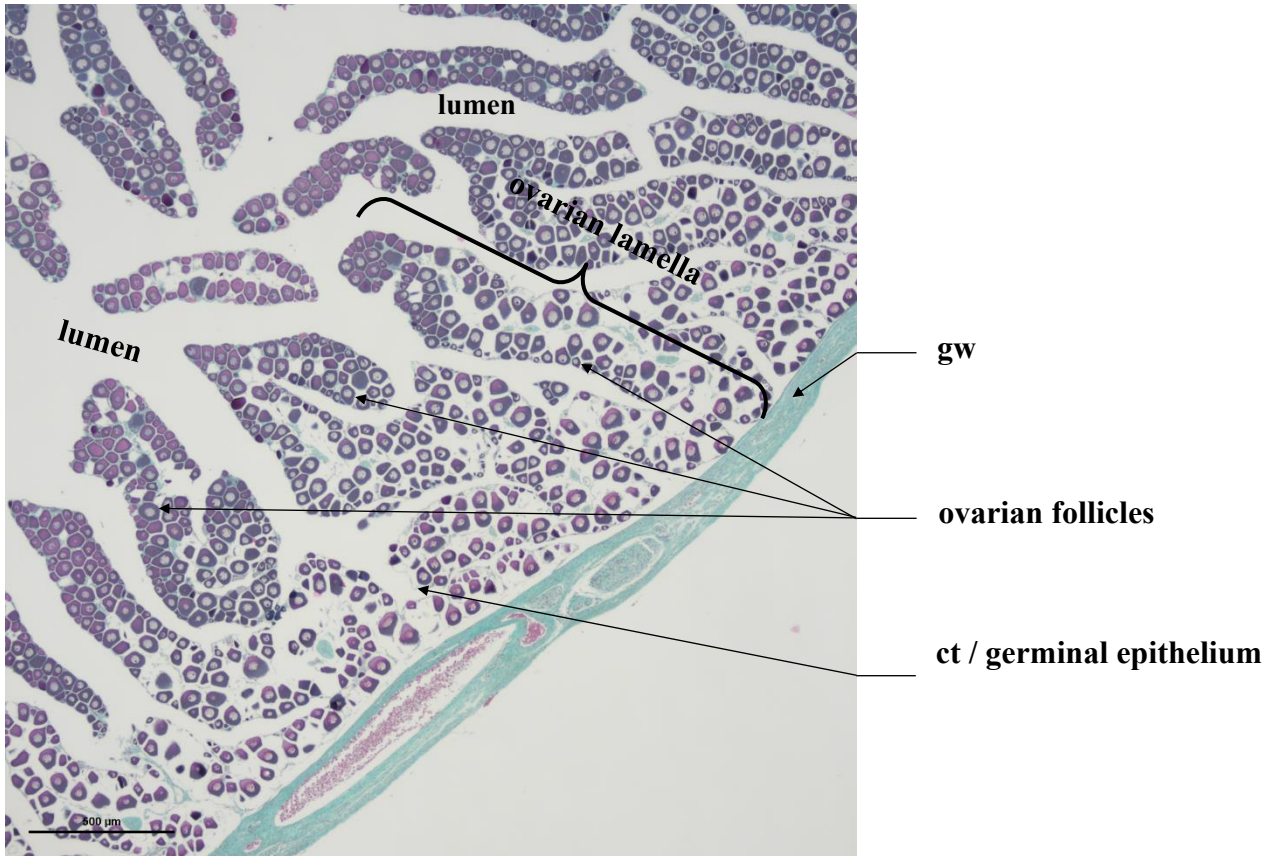
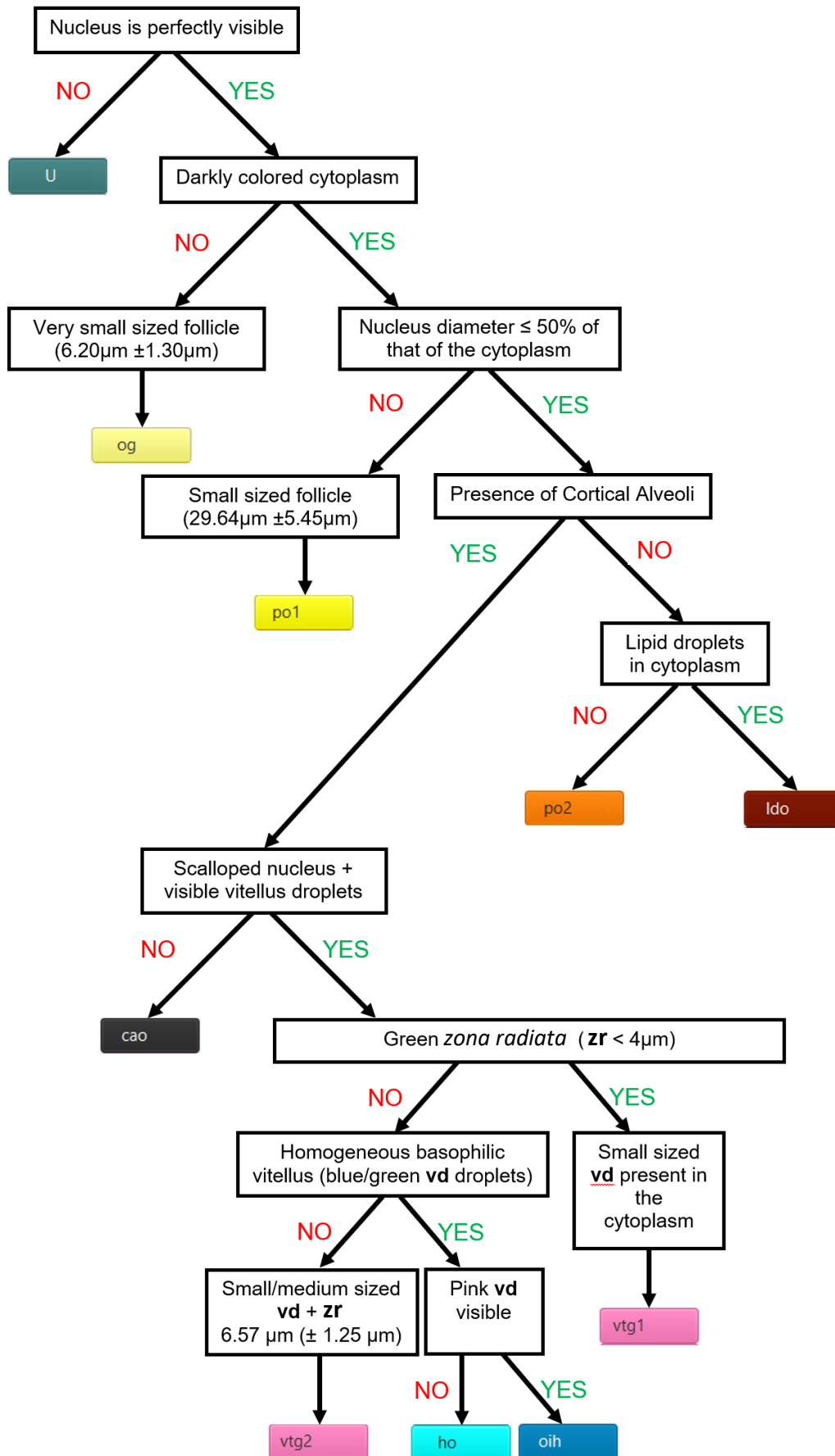
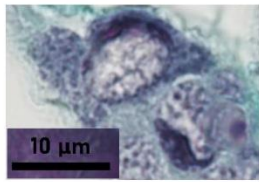


Figure 5 : Partial view of a red striped mullet ovary cross section, with the gonad wall (**gw**), the **lumen**, and oocytes in **follicles** held together by connective tissue (**ct**), organized inside **ovarian lamellas**

Decision Tree



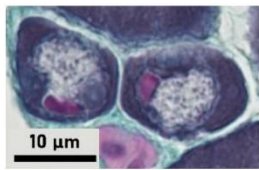
Follicle Summary Sheet



og

6.20 μm ($\pm 1.30\mu\text{m}$)

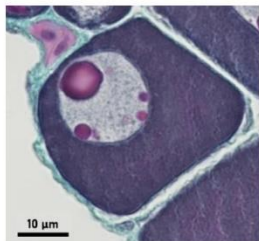
Light gray nucleus taking most of the space, barely visible light-colored cytoplasm with chromatin. Single nucleolus may be present



po1

13.39 μm ($\pm 3.40\mu\text{m}$)

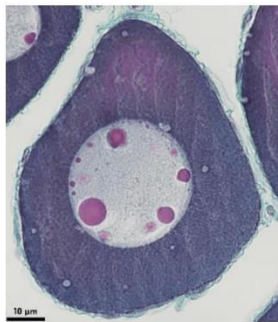
Nucleus diameter >50% of the cytoplasm's. Nucleus is visible, smooth and round, one or two nucleoli can be present. Dark colored cytoplasm



po2

45.36 μm ($\pm 10.48\mu\text{m}$)

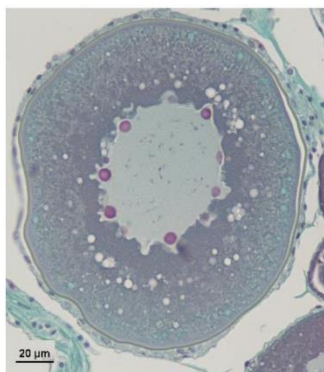
Nucleus is visible, smooth and round. Many nucleoli can be present. Dark colored cytoplasm



ldo

67.34 μm ($\pm 11.28\mu\text{m}$)

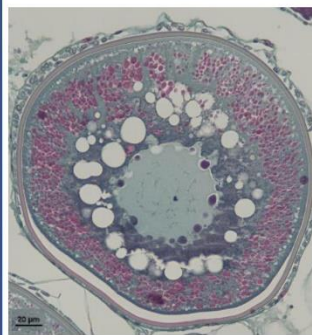
Nucleus is visible, smooth or slightly scalloped, many nucleoli. Dark colored cytoplasm containing white lipid droplets



cao

152.99 μm ($\pm 31.65\mu\text{m}$)

Cortical alveoli near the outer periphery, green *zona radiata* ($1.76\mu\text{m} \pm 0.42\mu\text{m}$), scalloped nucleus with multiple nucleoli, growing white lipid droplets in the cytoplasm



vtg1

238.72 μm ($\pm 30.55\mu\text{m}$)

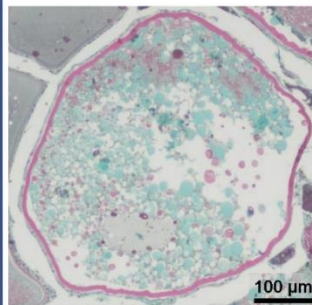
First appearance of small pink vitellus droplets amongst the cortical alveoli, under the thin greenish *zona radiata* ($3.39\mu\text{m} \pm 0.85\mu\text{m}$). Scalloped nucleus with multiple nucleoli. Large lipid droplets around the nucleus



vtg2

330.94 μm ($\pm 61.21\mu\text{m}$)

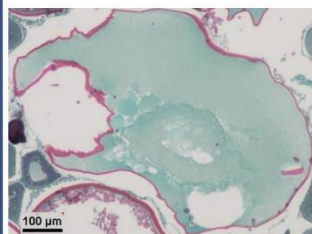
Zona radiata thickens ($6.57\mu\text{m} \pm 1.25\mu\text{m}$) and is pink and striated. Large vitellus droplets take up the entire space in the cytoplasm. Lipid droplets fuse and become bigger



oih

495.45 μm ($\pm 29.01\mu\text{m}$)

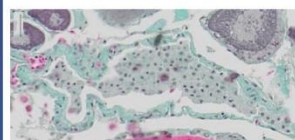
Vitellus droplets fuse and take a turquoise color. The *zona radiata* ($9.03\mu\text{m} \pm 1.06\mu\text{m}$) is pink and striated



ho

579.77 μm ($\pm 61.12\mu\text{m}$)

Homogeneous basophilic vitellus (turquoise blue areas). *Zona radiata* ($4.01\mu\text{m} \pm 0.63\mu\text{m}$) pink and striated.



POF

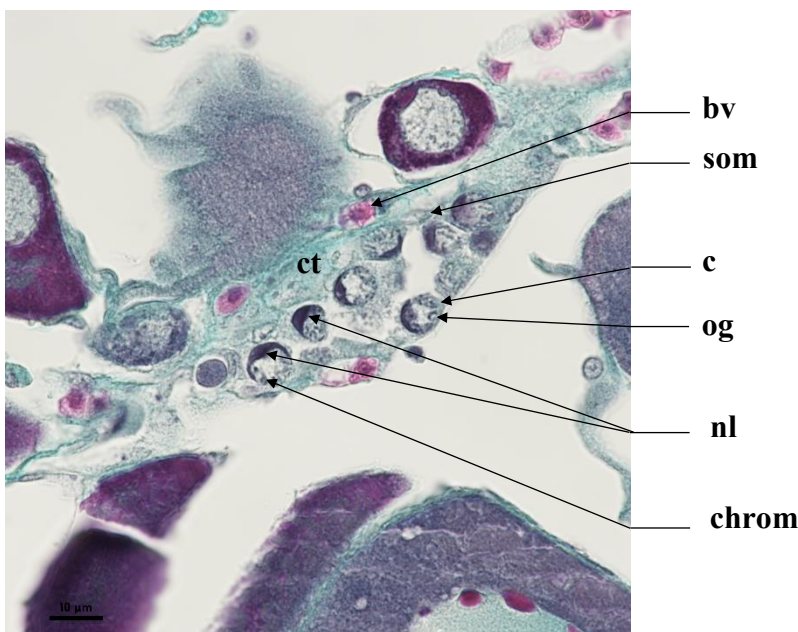
Empty theca, green colored like connective tissue. Macrophage cells may be present. Great variability in size



Oogonium (og)

An oogonium (**og**) has a pale nucleus (**N**), due to low chromosome condensation, and a high nucleo-cytoplasmic (NC) ratio (very little cytoplasm). Chromatin clusters can be seen near the edges of the nucleus. Inside this nucleus, a single large nucleolus can generally be found. The cytoplasm (**c**) is light-colored (*Figure 6*). Oogonia stem from germinal cells through gonial mitosis. They can be found alone or in a germinal niche within the germinal epithelium, accompanied by somatic cells (**som**).

Identification : It is uncommon to fall on this very small sized cell. The **nucleus is light-gray and fully apparent** while the **cytoplasm is barely visible and very light-colored**. A **single** light-colored and smooth **nucleolus** can be present. The diameter of the nucleus of an oogonium is greater than the surface area of the cytoplasm (>50 %).



Average size
og : 6.20 μm (± 1.30μm)

Figure 6 : Germinal niche surrounded in connective tissue (**ct**) with oogonia (**og**) and their apparent, decondensed, nucleus with a single large nucleolus (**nl**) and clusters of chromatin (**chrom**). Light-colored cytoplasm (**c**). Presence of somatic cells (**som**) and blood vessels (**bv**)

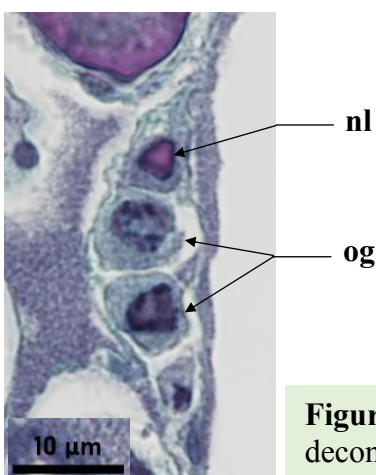


Figure 7 : Oogonias (**og**) and their apparent decondensed nucleus and single nucleolus (**nl**)



Primary oocyte stage 1 (po1)

A primary oocyte stage 1 (**po1**) has a darker cytoplasm (**c**) compared to an oogonium (**og**), with a smaller NC ratio. The diameter of the cytoplasm is inferior or equal to 50 % of the nucleus' diameter. The nucleus (**N**) is spherical, smooth, with the possibility of one or two visible nucleoli. It is sometimes possible to see lampbrush chromosomes inside the nucleus, typically found in immature diplotene oocytes.

Identification : This cell type is slightly bigger than an oogonium, but is still relatively small in size compared to the other cellular structures found inside the ovary. Falling on this follicle in stereology is still uncommon. The **nucleus must be fully visible, smooth, and the cytoplasm is darkly-colored**. The nucleus diameter of a **po1** is superior to 50 % of the cytoplasm's diameter, and can contain up to **2 nucleoli**. If there is a hesitation between a **po1** and a **po2**, the cell size can be taken into consideration. Somatic cells (**som**) may be seen nearby.

Average size
po1 : 13.39 μm (\pm 3.40 μm)

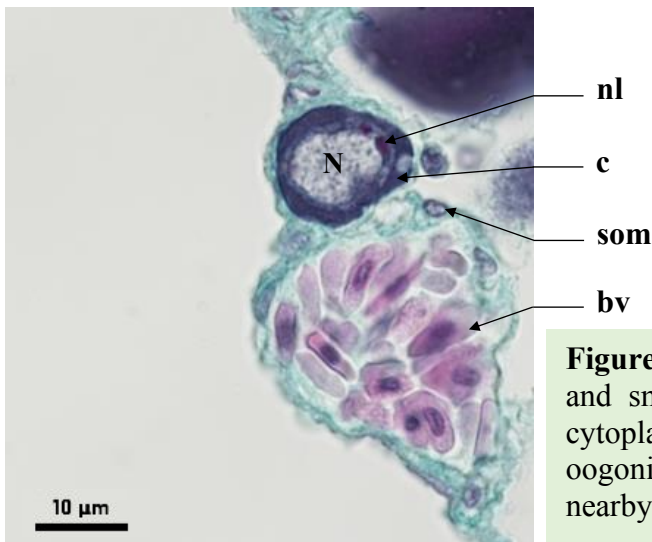


Figure 8 : Primary oocyte stage 1 (**po1**) with a spherical and smooth nucleus (**N**) and two nucleoli (**nl**). The cytoplasm (**c**) is darker compared to that of an oogonium. Somatic cells (**som**) and blood cells (**bv**) are nearby

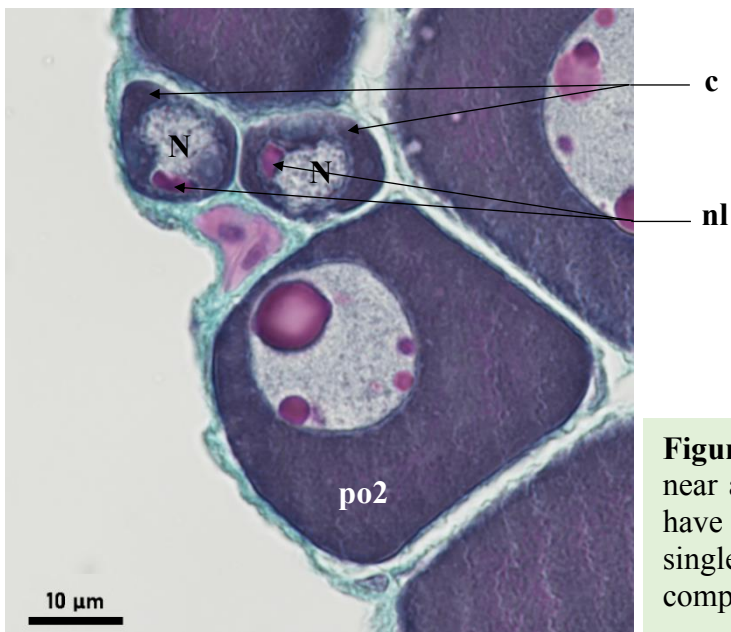


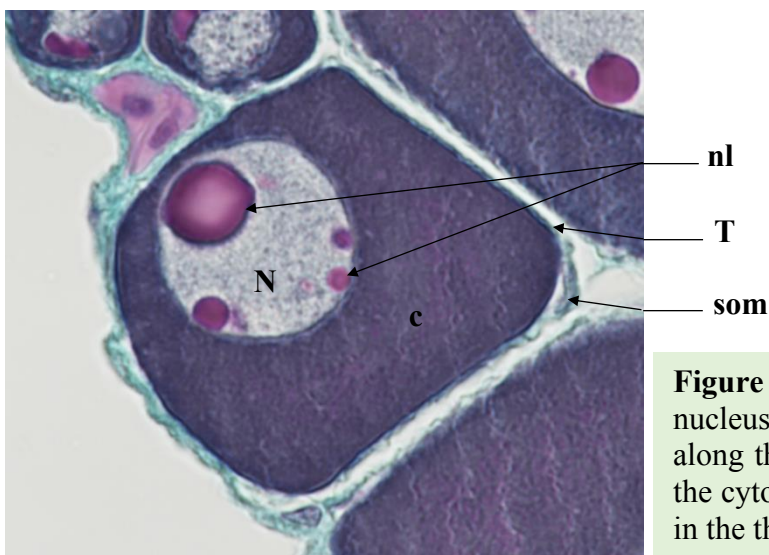
Figure 9 : Two primary oocytes stage 1 (**po1**) near a primary stage oocyte stage 2 (**po2**). **po1** have a spherical and smooth nucleus (**N**) with a single nucleolus (**nl**). The cytoplasm (**c**) is darker compared to that of an oogonium (**og**)



Primary oocyte stage 2 (po2)

A primary oocyte stage 2 (**po2**) has a dark colored cytoplasm (**c**), with a high **NC** ratio. The diameter of the cytoplasm is superior or equal to 50 % of the nucleus' diameter. The nucleus (**N**) is spherical, smooth, with the possibility of multiple nucleoli. They vary in sizes and are present along the nuclear envelope. It is sometimes possible to see lampbrush chromosomes inside the nucleus, typically found in immature diplotene oocytes.

Identification : This ovarian follicle varies in size, between the **po1** and **cao** stage. The **nucleus must be fully visible, smooth, and the cytoplasm is darkly-colored**. The nucleus diameter of a **po2** is inferior or equal to 50 % of the cytoplasm's diameter, and can contain **multiple nucleoli of different sizes** against the nuclear envelope. If there is a hesitation between a **po1** and a **po2**, the cell size can be taken into consideration.



Average size
po2 : 45.36 μm (\pm 10.48 μm)

Figure 10 : A **po2** with a spherical and smooth nucleus (**N**) filled with multiple nucleoli (**nl**) along the inside of its nuclear envelope, inside the cytoplasm (**c**). A somatic cell (**som**) is seen in the theca (**T**)

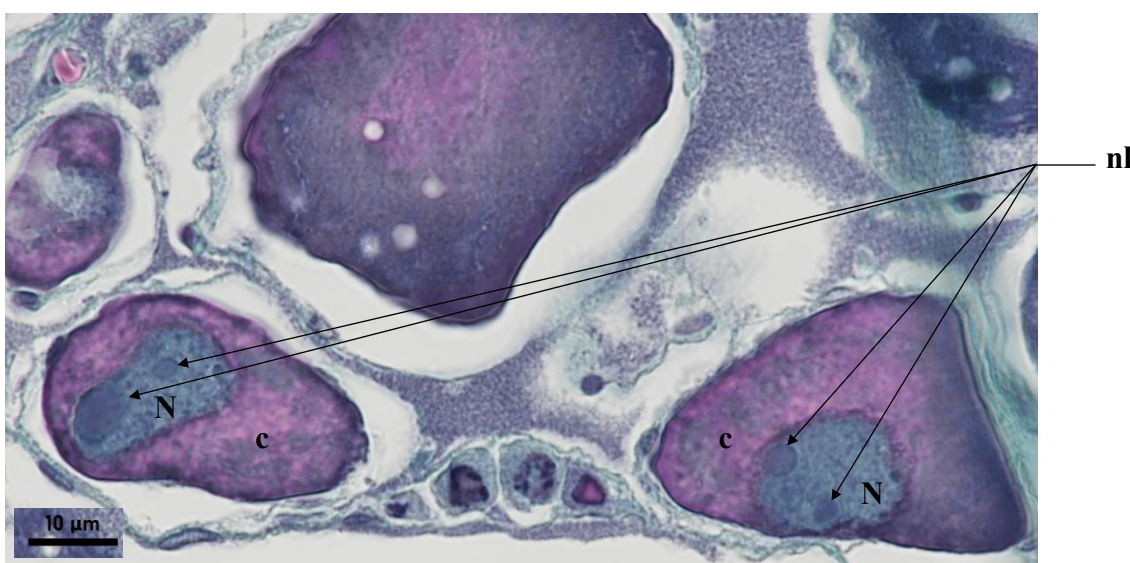


Figure 11 : Two **po2**, with spherical and smooth nucleus (**N**) filled with multiple nucleoli (**nl**). The cytoplasm (**c**) is large and homogenous

Lipid droplets oocyte (ldo)

Before reaching the cortical alveoli (cao) stage, the follicle will grow in size and accumulate lipid droplets (ld) in its cytoplasm (c). These lipid droplets first appear along the outer periphery of the cytoplasm. They will later gather around the nucleus (N). The nucleus is smooth, round and contains multiple nucleoli (nl) against its nuclear membrane. Staining follicles Alcian blue shows that the vesicles in the cytoplasm are unstained : they do not contain acidic polysaccharides and probably consist in lipid droplets. Lampbrush chromosomes may sometimes be seen in the nucleus.

Identification : A lipid droplet oocyte (ldo) is characterized by a **smooth and round nucleus** with **multiple nucleoli** along its nuclear membrane. **White lipid droplets** are present in the cytoplasm.

Average size

ldo : $67.34\mu\text{m}$ ($\pm 11.28\mu\text{m}$)

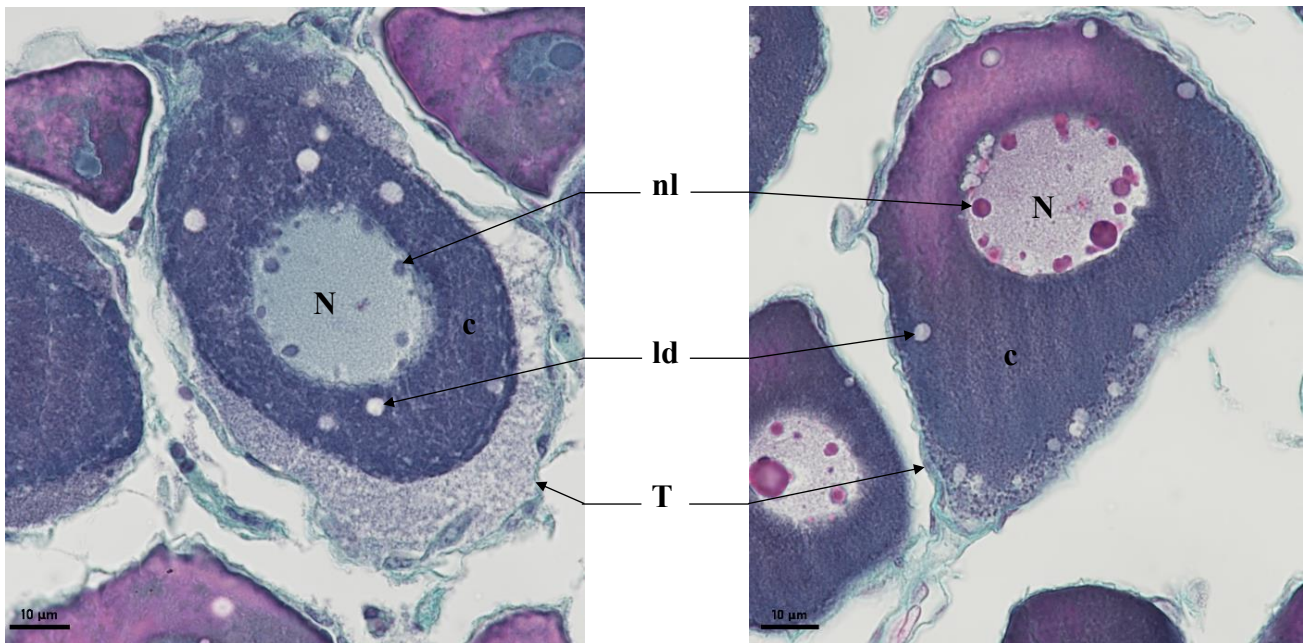


Figure 12 : Lipid droplet oocytes (ldo) with white lipid droplets (ld) in the cytoplasm (c). The nucleus (N) is round and smooth and holds multiple nucleoli (nl) along its nuclear envelope, surrounded by a theca (T)

Cortical alveoli oocyte (cao)

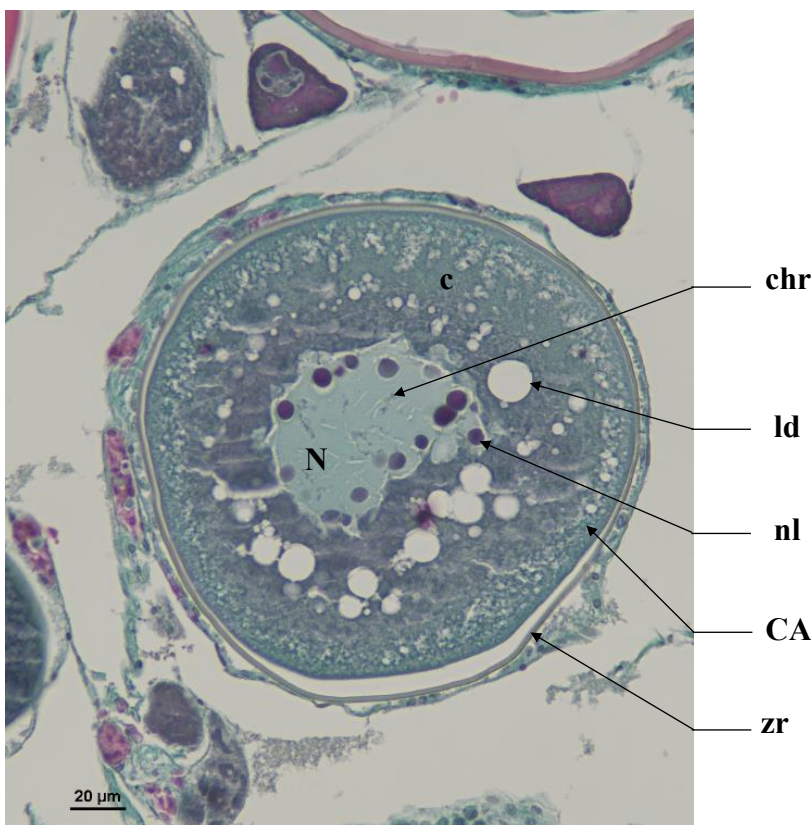
An oocyte with cortical alveoli (**cao**) is defined by the first appearance of cortical alveoli (**CA**) in the cytoplasm (**c**), on the periphery of the oocyte, under the somatic cells layer. The nucleus (**N**) is in the center of the cytoplasmic mass, with a smooth or slightly scalloped nuclear envelope and multiple nucleoli (**nl**) against it. Sometimes, it is possible to see lampbrush chromosomes (**chr**) inside the nucleus, typically found in immature diplotene oocytes.

As the **cao** matures, the **CA** and lipid droplets (**ld**) will grow in size and take more place inside the cytoplasm, with small **CA** against the outer periphery in the cytoplasm. At this point, the nucleus is scalloped and filled with multiple nucleoli against the nuclear envelope.

The oolemma will start to grow and the *zona radiata* (**zr**) will start developing between the cytoplasm and the follicular cells (**fc**) + theca (**T**). The *zona radiata* (**zr**) is thin and green/yellowish (not acidophilus).

The **CA** will appear in the outer periphery of the outer cytoplasm. Only the Alcian blue coloration, which gives them blue color, allows us to differentiate perfectly them from other structure. With the trichrome stain, it is possible to observe some **CA**, with a turquoise blue coloring.

Identification : An oocyte with cortical alveoli is primarily defined by a the **presence of cortical alveoli in the cytoplasm**, with a first appearance on the outer periphery of the cytoplasm. The **nucleus in the center of the follicle contains multiple nucleoli** along its **scalloped nuclear envelope**.



Average size

cao : 152.99 μm (± 31.65μm)

zr : 1.76 μm (± 0.42μm)

Figure 13 : Cortical alveoli oocyte (**cao**) with a scalloped nucleus (**N**) holding multiple nucleoli (**nl**) and lampbrush chromosomes (**chr**). Cortical alveoli (**CA**) and lipid droplets (**ld**) build-up in the cytoplasm (**c**) and the *zona radiata* (**zr**) forms

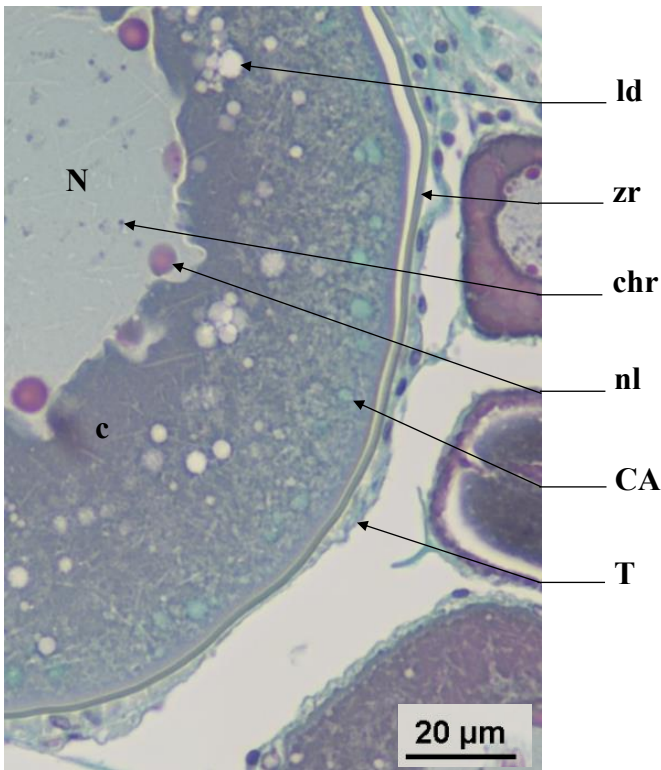


Figure 14 : Cell wall of an oocyte with cortical alveoli (cao), with Gabe's trichrome stain to give a turquoise blue color to the cortical alveoli (CA). The nucleus (N) is scalloped and contains multiple nucleoli (nl) along its nuclear envelope. Lampbrush chromosomes can be seen (chr). Large lipid droplets (ld) start to build-up around the N, in the cytoplasm (c). Cortical alveoli (CA) start to form on the periphery of the cytoplasm, under the green zona radiata (zr) that is beginning to grow under the theca (T)

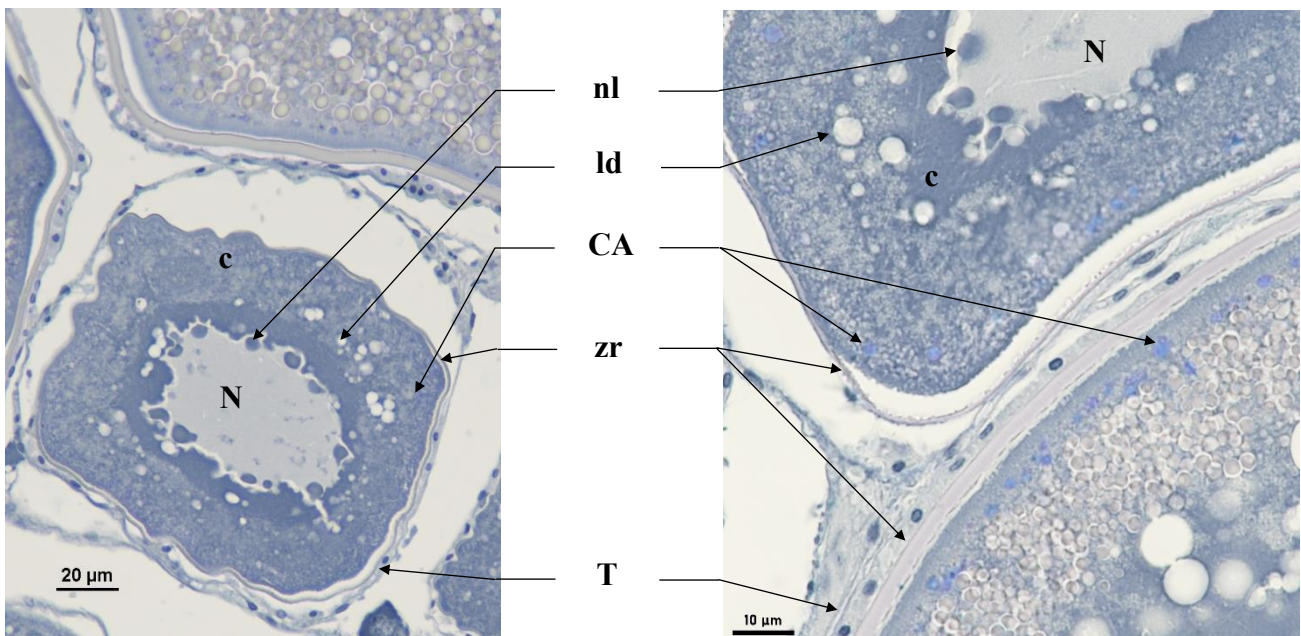


Figure 15 : Cortical alveoli oocytes (cao) Alcian blue stained to highlight the cortical alveoli (CA) in purple-blue. cao have a scalloped nucleus (N) holding multiple nucleoli (nl). CA build-up in the cytoplasm (c) near the outer periphery of the follicle while lipid droplets (ld) gather around the N. The zona radiata (zr) is forming under the theca (T)



Oocyte in early vitellogenesis (vtg1)

An oocyte at the beginning of the vitellogenic stage (**vtg1**) is defined by the presence of vitellus droplets (**vd**), pink eosinophilic droplets, that form in the periphery of the cytoplasm (**c**), under the somatic cell layer. The *zona radiata* (**zr**) will thicken but keep a green tint. The nucleus (**N**) is still centered in the follicle, with multiple nucleoli (**nl**) along the scalloped nuclear envelope.

As the cell matures, lipid droplets (**ld**) around the **N**, cortical alveoli (**CA**) in the outer periphery of the cytoplasm and vitellus droplets (**vd**) in the cytoplasm between the **ld** and **CA**, will grow in size.

Identification : This oocyte in early vitellogenesis is identifiable by the appearance of **pink vitellus droplets in the outer periphery of the cytoplasm**. At the **first appearance of a vitellus droplet**, the oocyte is considered to be in the **vtg1** stage, **even if the nucleus (N) is not visible**. The **nucleus is still scalloped and centered inside the follicle**, containing multiple the nucleoli. **Vitellus droplets usually run along the edge of the inner cell wall**, along the *zona radiata* (**zr**) and amongst the cortical alveoli (**CA**). **The *zona radiata* (zr) is small and green**, as it thickens under the Theca (**T**).

Average size

vtg1 : 238.72 μm (\pm 30.55 μm)

zr : 3.39 μm (\pm 0.85 μm)

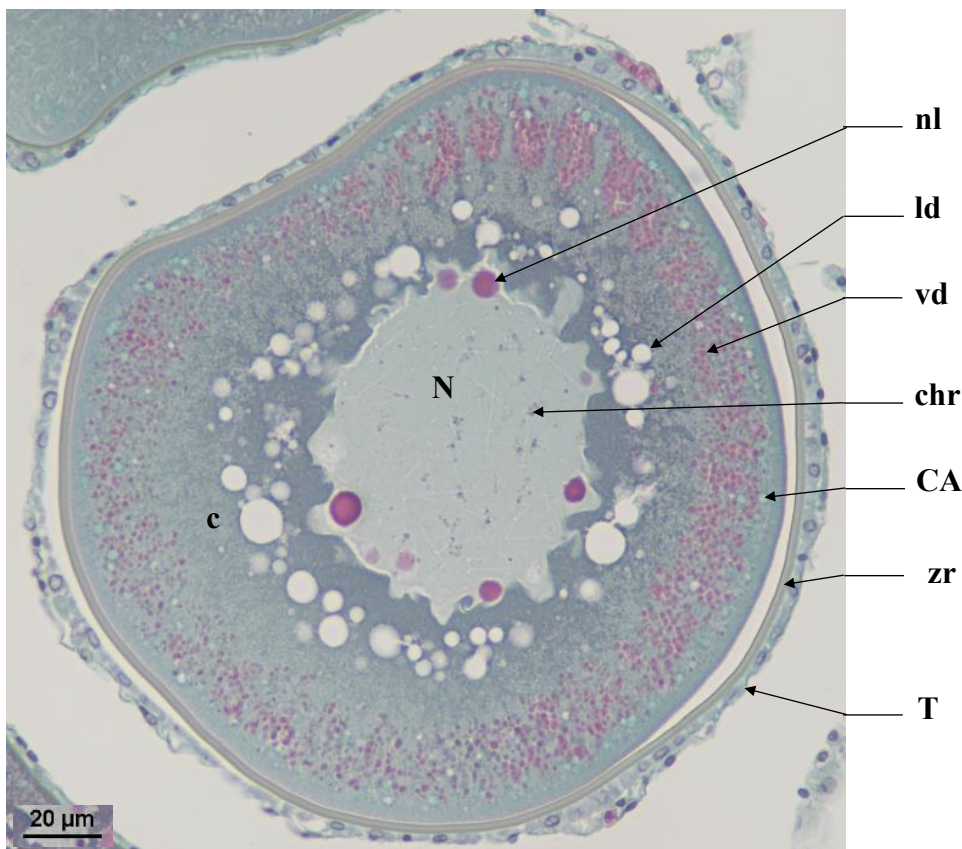


Figure 16 : An early stage **vtg1** oocyte, with a scalloped nucleus (**N**) containing multiple nucleoli (**nl**) and lampbrush chromosomes (**chr**). Vitellus droplets (**vd**) form on the outer periphery of the cytoplasm (**c**) amongst the cortical alveoli (**CA**) under the green *zona radiata* (**zr**) under a layer of somatic cells forming the theca (**T**). Large lipid droplets (**ld**) aggregate around the **N**

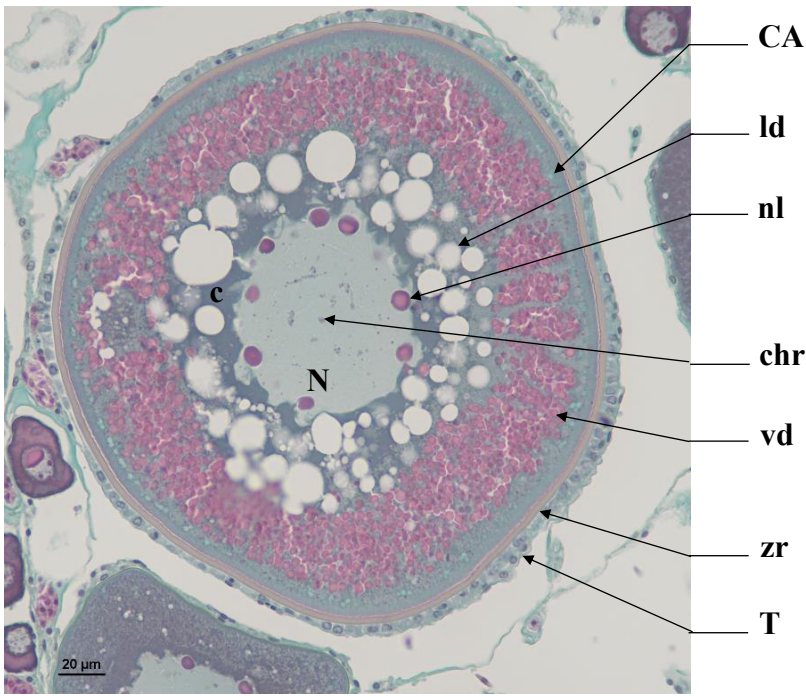


Figure 17 : A late stage **vtg1** oocyte, with a scalloped nucleus (**N**) envelope containing multiple nucleoli (**nl**) and lampbrush chromosomes (**chr**). Vitellus droplets (**vd**) fill the cytoplasm (**c**) from the outer periphery, amongst the cortical alveoli (**CA**) under the *zona radiata* (**zr**) that is starting to take a pink tint under theca (**T**). Large lipid droplets (**ld**) aggregate around the **N**

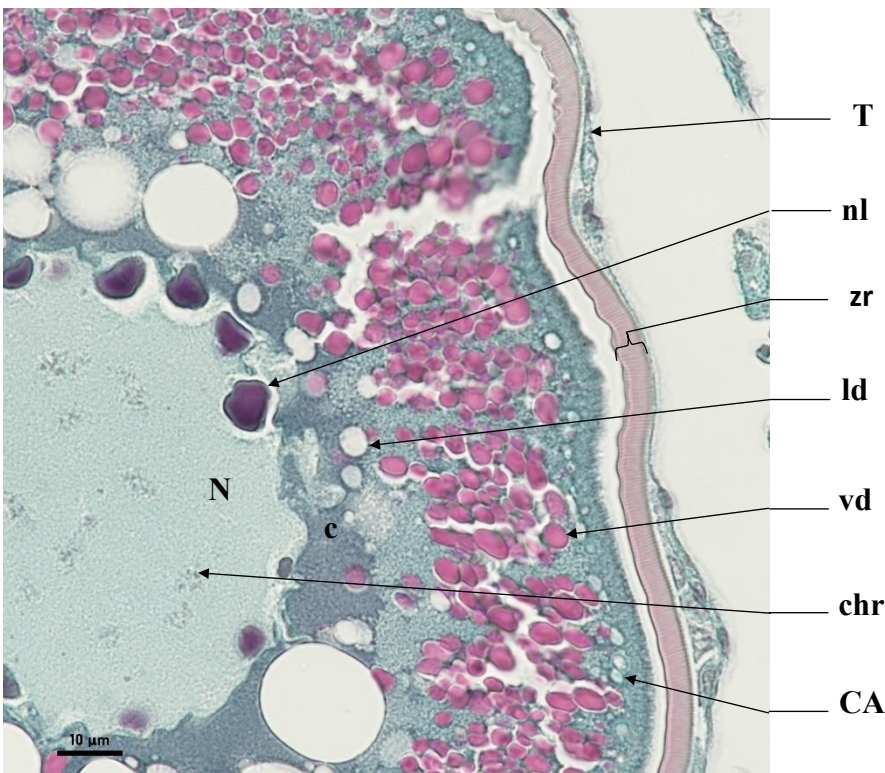


Figure 18 : Cell wall of a **vtg1** oocyte with a scalloped nucleus (**N**) containing multiple nucleoli (**nl**) and lampbrush chromosomes (**chr**). Vitellus droplets (**vd**) form on the outer periphery of the cytoplasm (**c**), amongst the cortical alveoli (**CA**) under the *zona radiata* (**zr**) that is starting to take a pink tint under theca (**T**). Large lipid droplets (**ld**) aggregate around the **N**



Oocyte in vitellogenesis stage 2 (vtg2)

During the **vtg2** stage, the *zona radiata* (**zr**) thickens and becomes striated as it takes on a pink tinge. The vitellus droplets (**vd**) will take up the entire space inside the follicle as they start to fuse together and grow in size. The lipid droplets (**ld**) fuse together into larger masses. The nucleus (**N**) is still scalloped and contains multiple nucleoli (**nl**).

Identification : A **vtg2** oocyte is defined by a **pink, thick, and slightly striated zr**, as well as **small to medium sized vitellus droplets (vd) that take up the entire space inside the follicle**. Lipid droplets (**ld**) have fused into bigger masses. It is preferable, but not mandatory for the nucleus to be visible.

Average size

vtg2 : 330.94 μm (\pm 61.21 μm)

zr : 6.57 μm (\pm 1.25 μm)

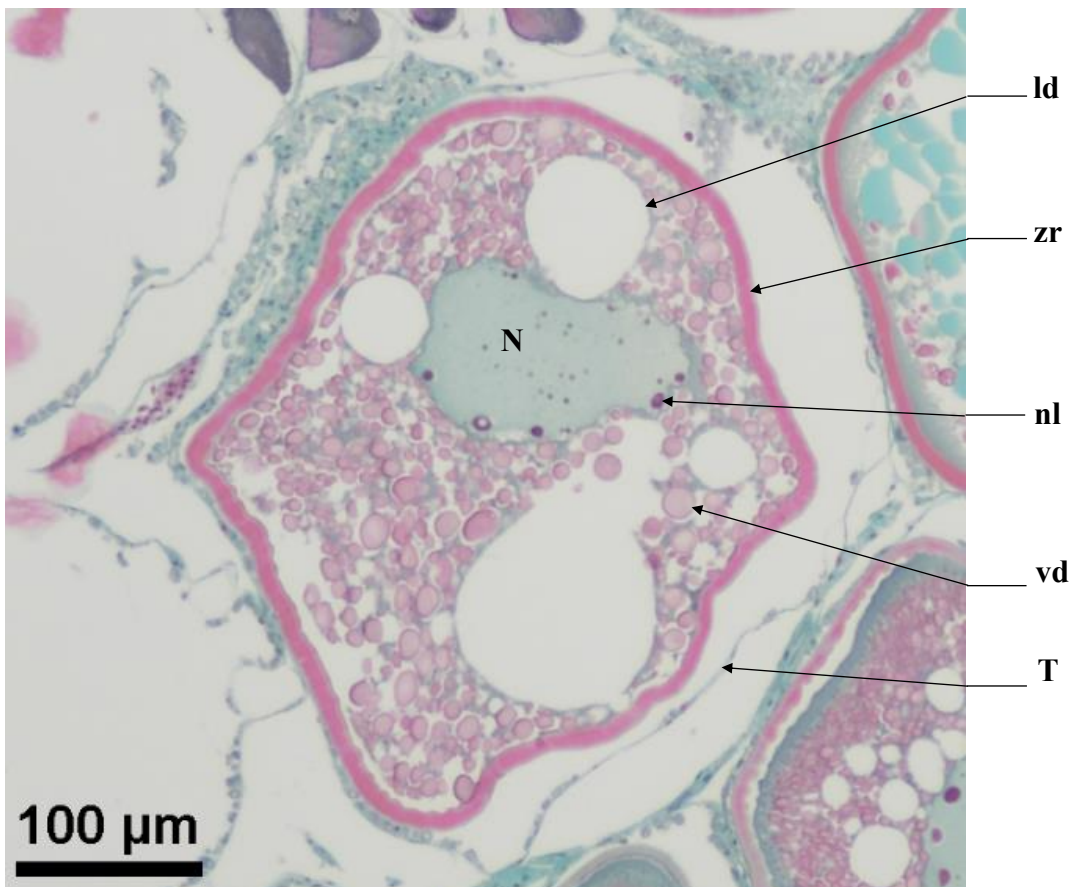


Figure 19 : Stage **vtg2** oocyte, with a scalloped nucleus (**N**) containing multiple nucleoli (**nl**). The *zona radiata* (**zr**) is pink and slightly striated. Medium sized vitellus droplets (**vd**) take up the entire space inside the follicle. Large lipid droplets (**ld**) are also present

Oocyte in hydration (oih)

During the oih stage, the nucleus (N) migrates and progressively approaches the oocyte's periphery until it is pushed up against the *zona radiata*. The vitellus droplets (vd) become turquoise blue and gradually fuse together, giving way to zones of homogeneous basophilic vitellus (vi) (turquoise blue areas). The *zona radiata* (zr) is pink, striated and at its thickest.

Identification : The vd fuse to become turquoise blue and to break down to form a **zone of homogeneous vitellus (turquoise blue areas)**. The zona radiata will be pink, striated and at its thickest. The nucleus can sometimes be seen, but its visibility is not mandatory for the identification of this stage.

Average size

oih : 495.45 μm (\pm 29.01 μm)

zr : 9.03 μm (\pm 1.06 μm)

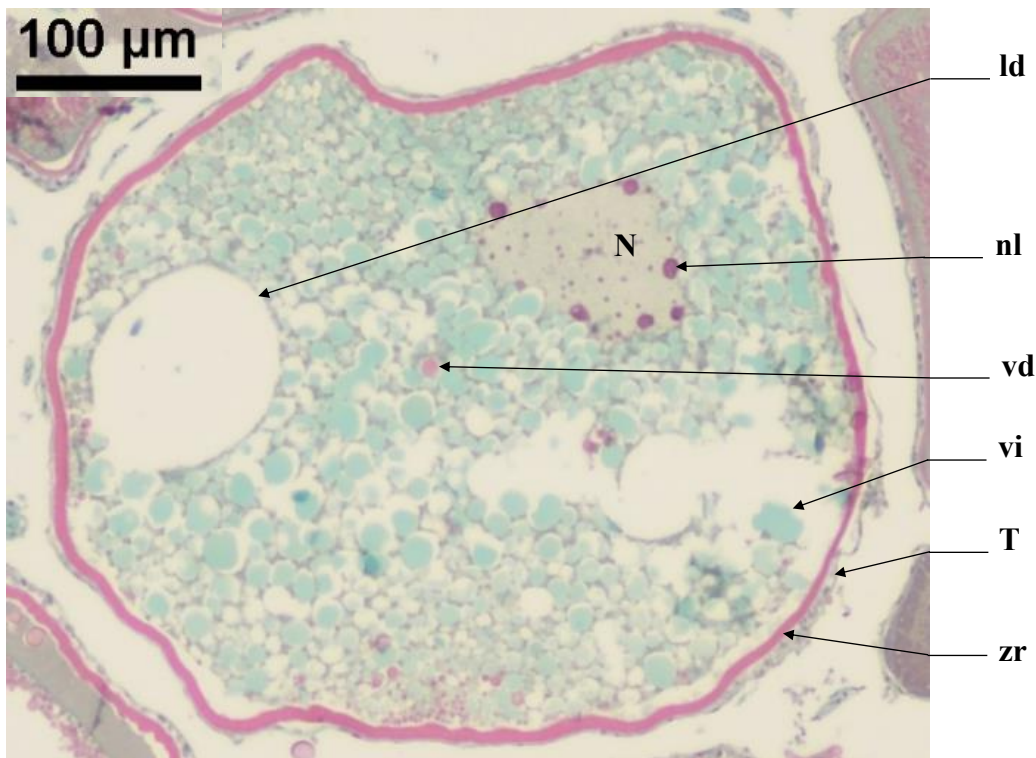


Figure 20 : Oocyte in hydration (oih) with a pink *zona radiata* (zr) under the theca (T). The scalloped nucleus (N) has nucleoli (nl). Vitellus droplets (vd) fuse and break down into a homogeneous vitellus (vi), and large lipid droplets (ld) are present

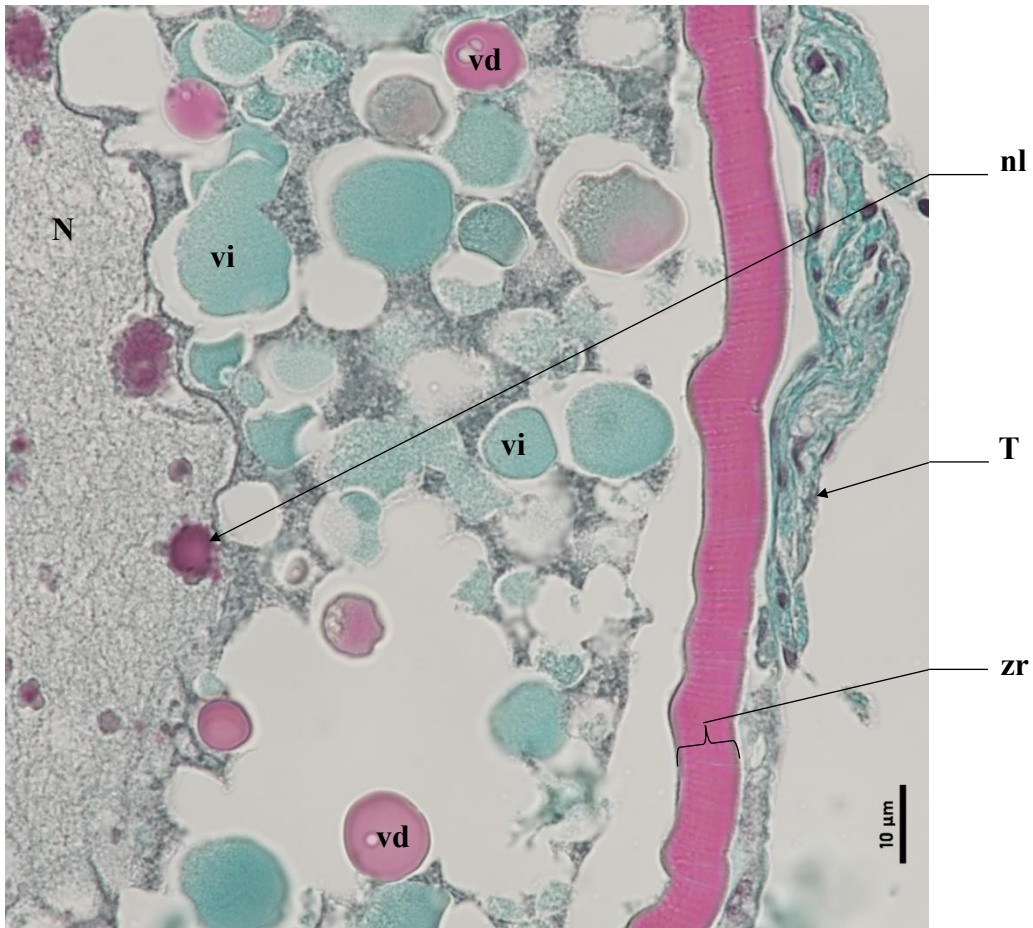


Figure 21 : Cell wall of an oocyte in hydration (**oih**) with a pink, thick and striated *zona radiata* (**zr**) under the theca (**T**). The scalloped nucleus (**N**) has nucleoli (**nl**). Vitellus droplets (**vd**) fuse and break down into a homogeneous vitellus (**vi**), and large lipid droplets (**ld**) are present

Hydrated oocyte (ho)

A hydrated oocyte (**oh**) is defined by a turquoise blue homogeneous vitellus (**vi**) that takes up the entire volume of the oocyte. A few lipid droplets (**ld**) can sometimes be seen near the thick and striated *zona radiata* (**zr**).

Identification : Biggest cell type found in the ovary. Because of the dehydration process, this type of oocyte doesn't always have a smooth and circular shape, and the theca (**T**) may be detached from the *zona radiata* (**zr**). Whether this oocyte has been discharged from its follicle in the lamella or not, this cell type will be categorized as **oh**. The **zr** is pink, thick and striated, and the oocyte is filled entirely with homogeneous vitellus (turquoise blue color).

Average size

ho : 579.77 μm (\pm 61.12 μm)

zr : 4.01 μm (\pm 0.63 μm)

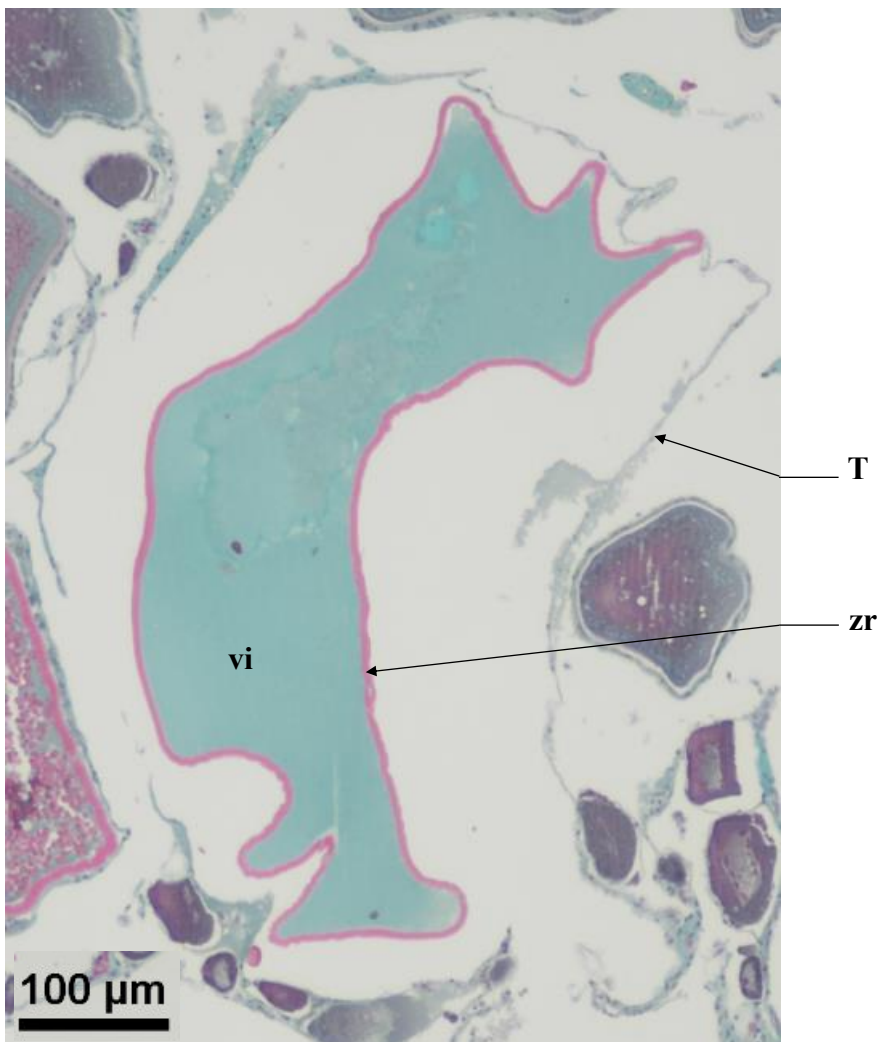


Figure 22 : Hydrated oocyte (**oh**) that has not been discharged still encased within its theca (**T**), with a homogeneous vitellus (**vi**) and a thick, pink and striated *zona radiata* (**zr**)

Post-Ovulatory Follicle (POF)

A Post-Ovulatory Follicle (POF) may show signs of lysis, with the presence of macrophage cells (cm) inside their cavity. A POF indicates that a hydrated oocyte (oh) has been discharged into the lumen. A POF is composed of all the somatic tissues of the follicle (theca (T) and follicular cells (fc)) left behind after the mature oocyte (oh) has been discharged into the lumen. Their green dye is identical to that of connective tissue (ct). Be careful not to put a POF into the ct category. POF vary in size and shape and are essentially empty sockets that have receded onto themselves.

Identification : A POF is a sack of somatic tissue that may be identified by the presence of macrophage cells inside its cavity. Macrophage cells (mc) are very small, gray tinged, and are often found clustered together. A POF will vary greatly in size and shape and can easily be mistaken with connective tissue (ct).

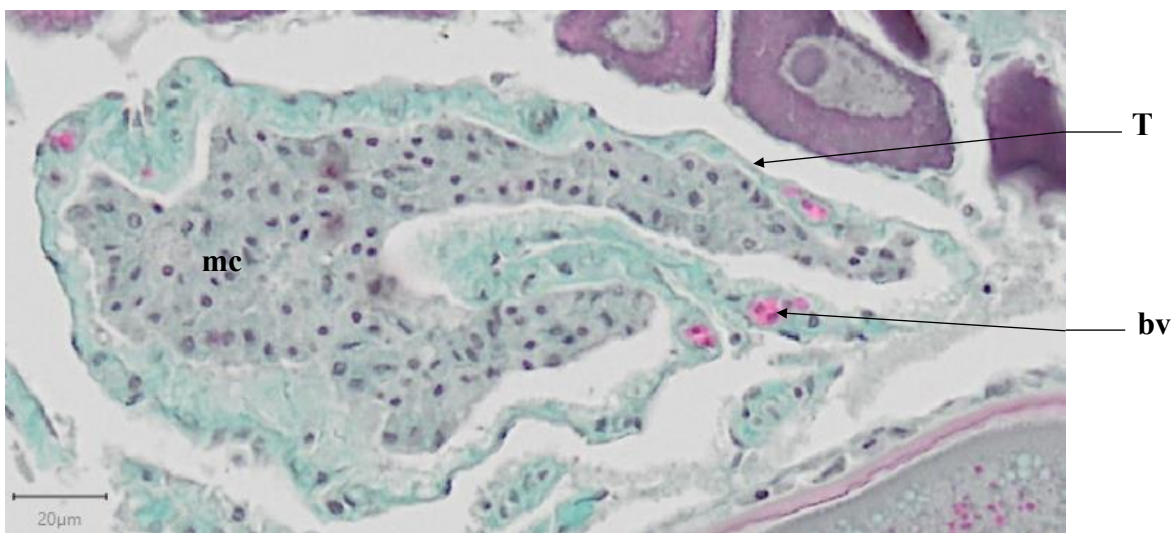


Figure 23 : Post-Ovulatory Follicle (POF), with the theca (T) left behind, with blood vessels (bv). Macrophage cells (mc) are present in the POF's cavity

Atresia (aoA & aoB) and Lysis (L)

Torres-Martinez *et al.* (2017) defined atresia as the degeneration, reabsorption, or even ablation, of ovarian follicles. In general, the first sign of atresia is the degeneration of the germinal vesicle of the oocyte, followed by the fragmentation of the *zona radiata* (zr) that will take an irregular appearance. This will lead to an hypertrophy of the follicular cells. There can be cell differentiations of the follicular cells (fc) into phagocytes and/or macrophages (mc).

In this study, we will define two types of atresia. Oocytes in early atresia (aoA) and oocytes in late atresia (aoB). aoA are all germinal cells in lysis, from the oogonium (og) stage until the **undischarged** hydrated oocyte (oh) stage. They will always be encased in somatic cells (follicular cells (fc) and/or theca (T)). aoB are all hydrated oocytes in lysis that have been **discharged**, and are thus not encased in somatic cells anymore. Since an aoB is a cellular structure in lysis in the middle of the **lumen**, their shapes will often be warped, scattered and surrounded by lysis (L).

Identification : An aoA is a follicle in lysis. This means that the **oocyte is still encased inside a theca, within the ovarian lamella**, but is undergoing lysis : degeneration of the germinal vesicle of the oocyte, fragmentation of the *zona radiata* (zr) with an irregular appearance, hypertrophy of follicular cells. Phagocytes and/or macrophages (mc) may be present between the Theca (T) and the zr.

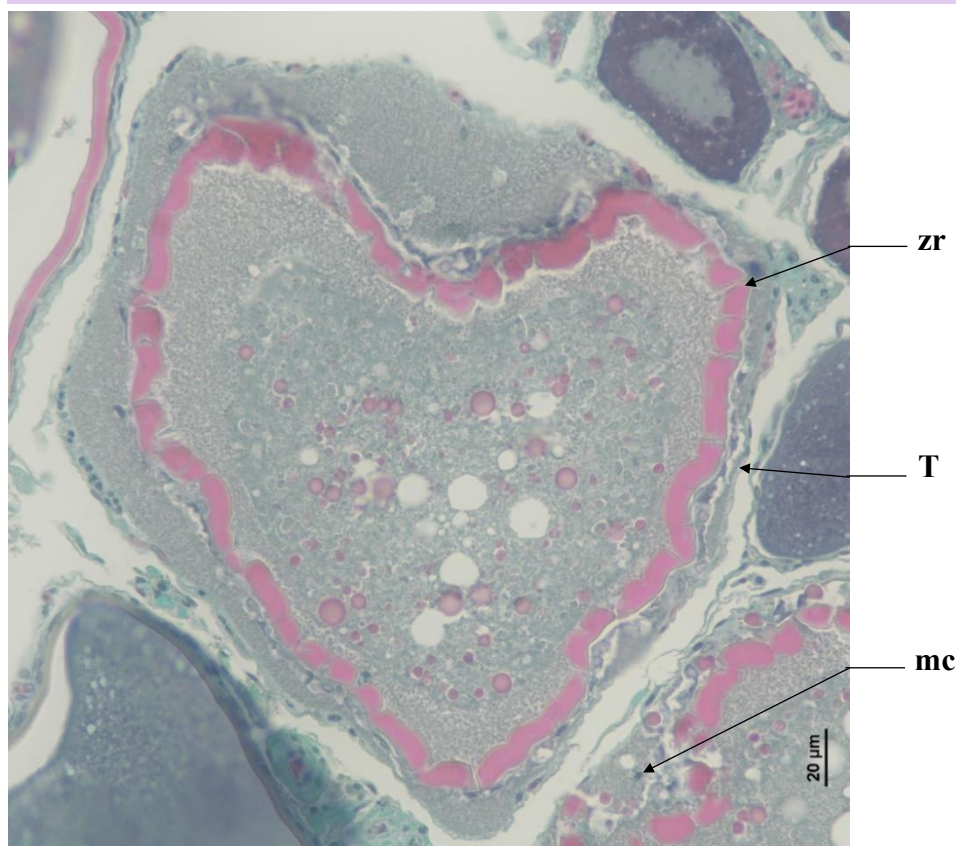


Figure 24 : Oocyte in early atresia (aoA). The oocyte has not been discharged into the **lumen**, and the follicle is still encased by its theca (T). the *zona radiata* (zr) is distorted and macrophage cells (mc) can be seen between the zr and T

Identification : An **oaB** is a **discharged follicle in lysis**. This means that the **oocyte is in the lumen without a theca** and is undergoing lysis. The mature follicle may show fragmentation of its zona radiata (**zr**) that will take an irregular appearance. Possible presence of macrophage cells lysis.

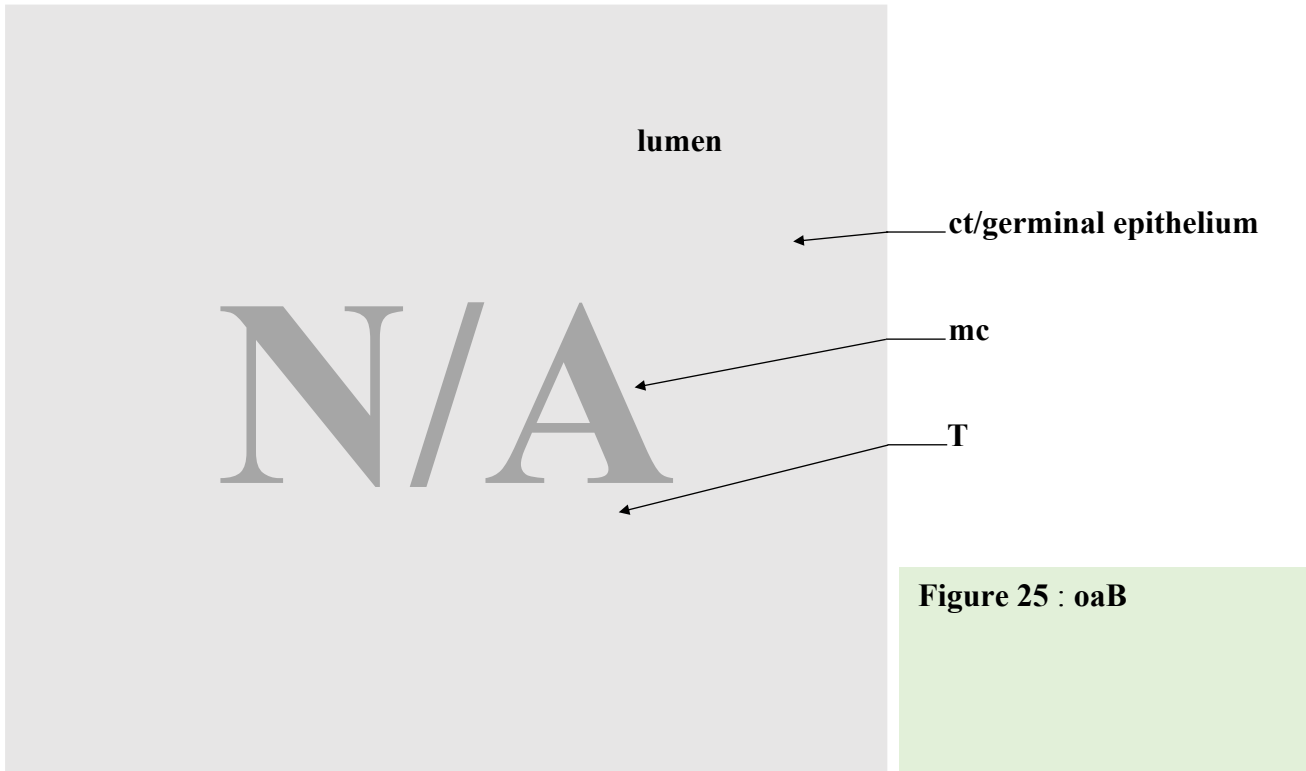


Figure 25 : oaB

Identification : Lysis can be difficult to identify, especially with the presence of atresia. They can be found **anywhere inside the gonad, at any maturity phase**. This **cluster of cells in lysis** can contain macrophages, are of **different shapes and sizes**, and do **not possess a theca and/or zona radiata**

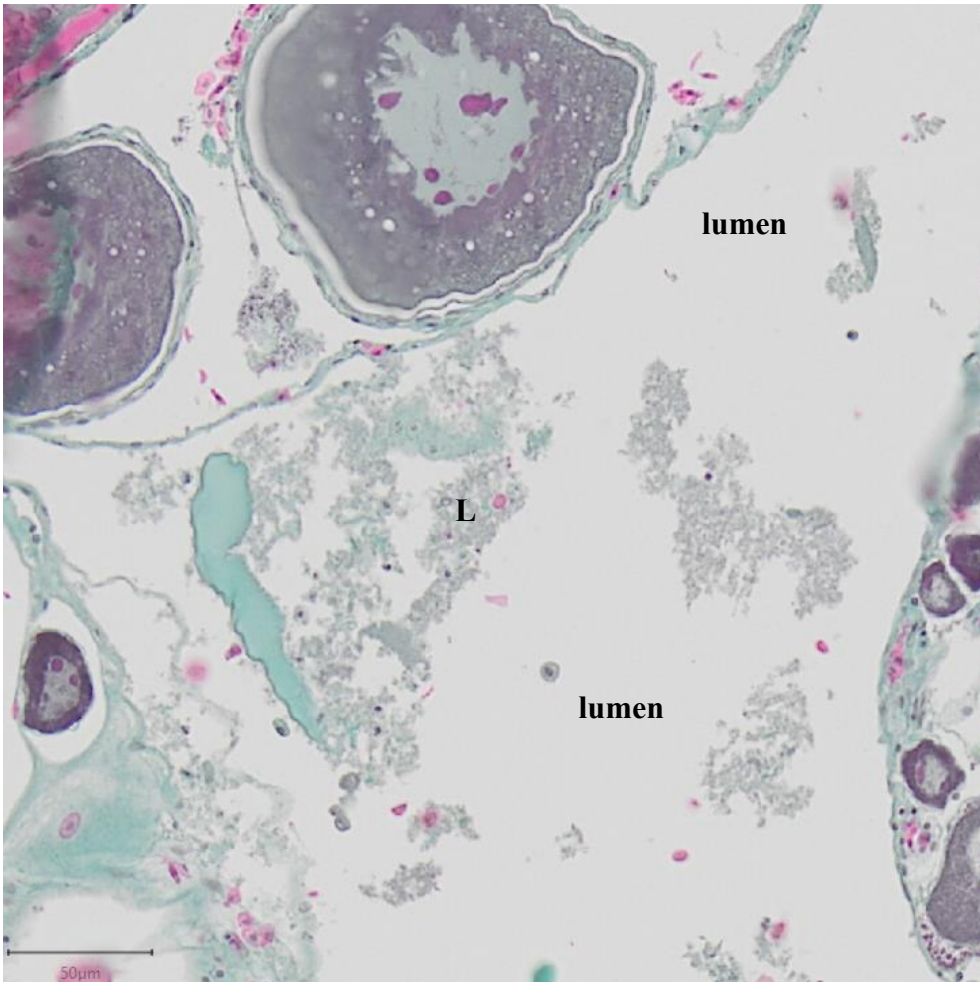


Figure 26 : Lysis (L) in the lumen

Connective tissue (ct) & Gonadal wall (gw)

The connective tissue (**ct**) links all ovarian structures together to form the ovarian lamellas. Follicles can be found inside the ovarian lamellas, encased in **ct**.

With the trichrome stain, connective tissue (**ct**) is made of green-colored cells, just like the cells that make up the gonad wall (**gw**). Gonad wall cells are muscular tissue while **ct** is not.

The gonad wall (**gw**) will have the same green tint as the **ct**. Muscle bundles and blood vessels (**bv**) can be found in the **gw**.

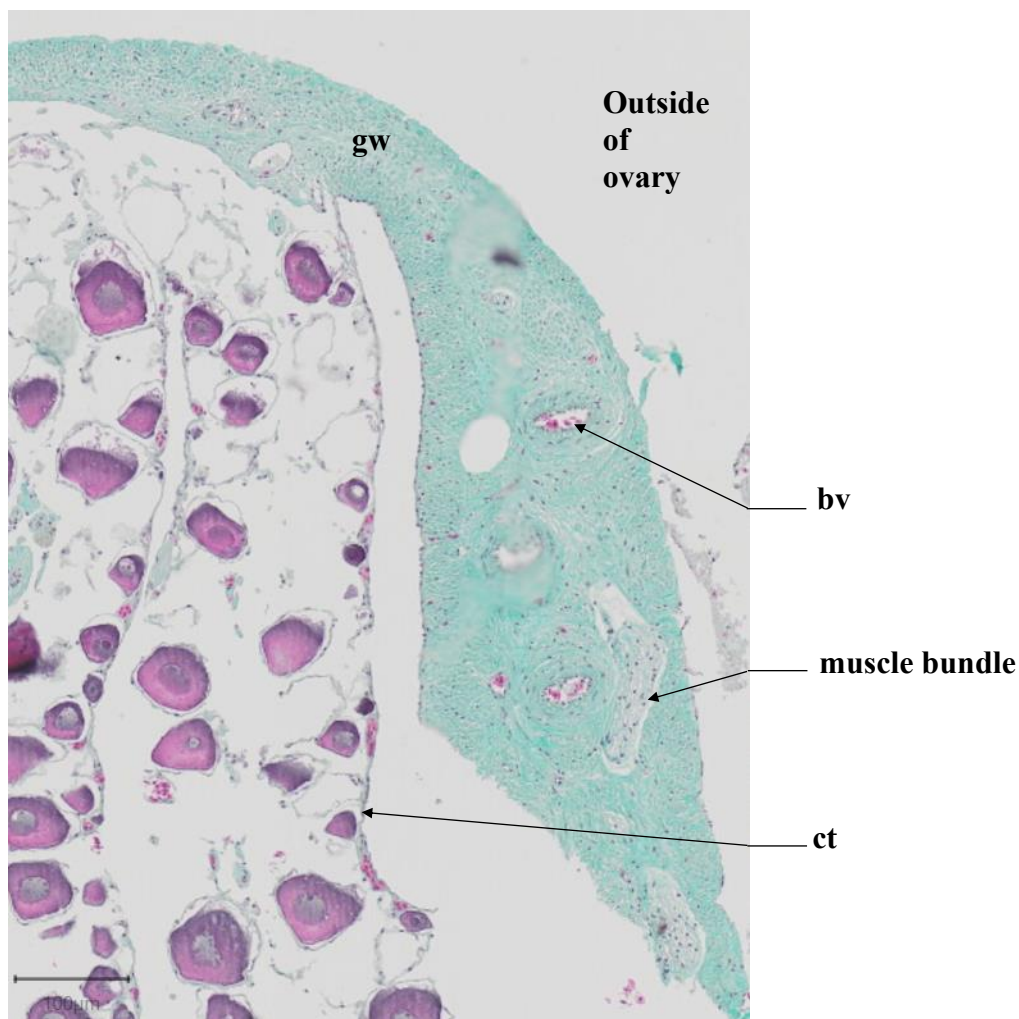


Figure 27 : Cross section of a red striped mullet ovary with its gonad wall (**gw**). The ovarian lamellas are held together by connective tissue (**ct**), delimiting the **lumen** and the outside of the ovary. Blood vessels (**bv**) and **muscle bundles** can be seen

Blood vessel (bv)

Blood vessels (**bv**) are numerous and of variable diameter, with a size that can vary from that of a single cell to over 100 μ m.

Found within a follicle's theca (**T**) or the gonad wall (**gw**), blood vessels (**bv**) are identifiable by the presence of blood cells (small red cells with a darker nucleus).

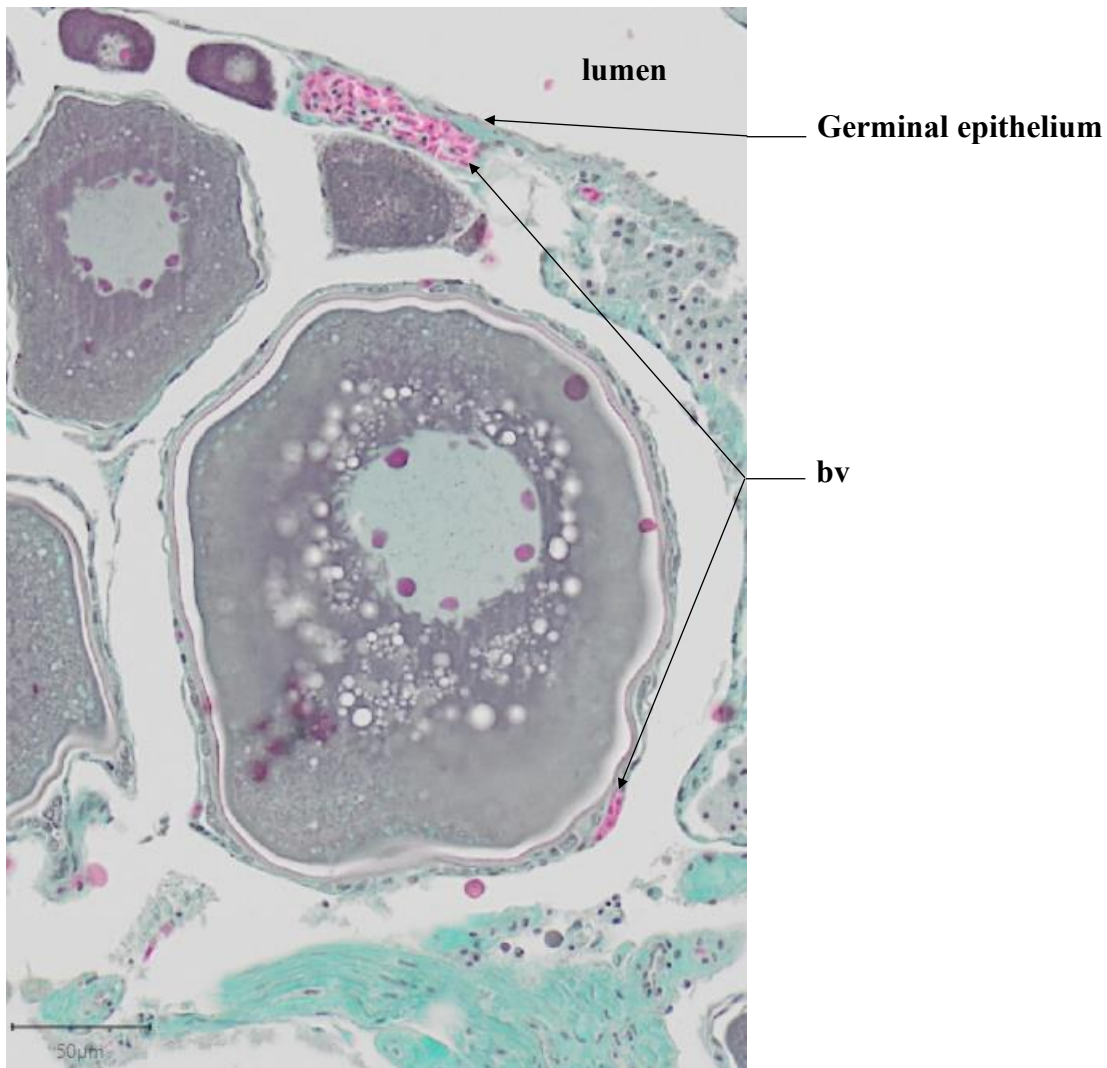


Figure 28 : Presence of blood vessels (**bv**) in the theca (**T**) of a cao, as well as in the **germinal epithelium** of the lamella

Bibliography

Anderson, E., 1969. Oocyte-follicle Cell Differentiation in Two Species of Amphineurans (Mollusca), *Mopalia mucosa* and *Chaetopleura apiculata*. J. Morphol. 129, 89-126.

Anderson, E., 1968. Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in the Pipefish, *Syngnathus fuscus*, and the Killifish, *Fundulus heteroclitus*. J. Morphol. 125, 23-60.

Aragón, L., Aranda, G., Santos, A., Medina, A., 2010. Quantification of ovarian follicles in bluefin tuna *Thunnus thynnus* by two stereological methods. J. Fish Biol. 77, 719-730.

Brown-Peterson, N.J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B.J., Lowerre-Barbieri, S.K., 2011. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. Mar. Coast. Fish. 3, 52-70.

Domínguez-Castanedo, O., Uribe, M.C., Rosales-Torres, A.M., 2016. Morphological development of the structures related to annualism in the ovarian follicle of the killifish *Millerichthys robustus* (Costa,1995) (Teleostei: Cyprinodontiformes). J. Morphol. 277, 1219-1230.

Gabe, M., 1968. Techniques Histologiques, 2ème ed. Masson et C., Paris.

ICES, 2008. Report of the Workshop on Maturity Ogive Estimation for Stock Assessment (WKMOG), 3-6 June 2008, Lisbon, Portugal. ICES CM2008/ACOM:33. 72 pp.

ICES, 2010. Report of the ICES/HELCOM Workshop on Flatfish in the Baltic Sea (WKFLABA), 8-11 November 2010, Öregrund, Sweden. ICES CM 2010/ACOM:68. 85pp.

ICES, 2012 Report of the Workshop for maturity staging chairs (WKMATCH), 11-15 June 2012, Split, Croatia. ICES CM 2012/ACOM:58. 57 pp.

ICES, 2018. Report of the Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF), 30 April - 4 May 2018, ICES Headquarters, Copenhagen, Denmark. ICES CM/EOSG: 38. 75 pp.

ICES, 2019. Working Group on Biological Parameters (WGBIOP), 7-10 October 2019, Lisbon, Portugal. ICES Scientific Reports. 1:85. 93 pp.

Lowerre-Barbieri, S.K., Brown-Peterson, N.J., Murua, H., Tomkiewicz, J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., 2011. Emerging Issues and Methodological Advances in Fisheries Reproductive Biology. Mar. Coast. Fish. 3, 32-51

Robson, S.M., 2004. Age, growth, reproductive biology and population dynamics of the common megrim *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792) from off the west coast of Ireland. Unpublished thesis (Doctor of Philosophy in Fisheries Biology), Galway-Mayo Institute of Technology.

Sauger, C., Quinquis, J., Dubroca, L., Parrad, S., Kellner, K., Heude-Berthelin, C., 2019. Sample collection protocol for the extraction of female gonads in the megrim (*Lepidorhombus spp.*) for maturity staging through histology. IFREMER, <https://doi.org/10.13155/70724>

Sauger, C., Dubroca, L., Villain-Naud, N., Kellner, K., Heude-Berthelin, C., Elie, N., 2020. Protocol for the determination of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the megrim, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792). IFREMER

Torres-Martínez, A., Hernández-Franyutti, A., Uribe, M.C., Contreras-Sánchez, W.M., 2017. Ovarian structure and oogenesis of the extremophile viviparous teleost *Poecilia mexicana* (Poeciliidae) from an active sulfur spring cave in Southern Mexico. *J. Morphol.*, Wiley Periodicals 278, 1667-1681.

Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish Biol. Fish.*, Chapman & Hall 6, 287-318.



Publication 6

Lexique ovogenèse de *Lepidorhombus whiffiagonis*

Citation : Heude-Berthelin, C., Kellner, K., Sauger, C. (2023) «Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the megrim, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792)». DOI : <https://doi.org/10.13155/75170>

Résumé : Lexique décrivant les différentes structures et stades cellulaires de la lignée germinale qui peuvent être retrouvés dans les ovaires de la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*). Ce document est le référentiel pour l'identification des cellules de la lignée germinale lors des lectures stéréologiques des lames ovariennes de *Lepidorhombus whiffiagonis*. Lexique en anglais disponible en accès libre sur **Archimer**.

Contribution : Création, conception et rédaction du document avec prise des photos et mesures des cellules. Mises à jour et publication des différentes versions.

Lexicon of histological structures found in the ovaries
and during the oogenesis of the megrim,
Lepidorhombus whiffiagonis (Walbaum, 1792)



HEUDE-BERTHELIN Clothilde
KELLNER Kristell
SAUGER Carine

May 2023

Cover photo: Picture of a female megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*). Personal collection.
C. Sauger©

Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the megrim, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792)

The digital version of this document is available on the Archimer Web site.

The digital version of the reading protocol that accompanies this document is available on the Archimer Web site.

Version	Date	Comments
1.0	March 2020	Conception of the document
1.1	April 2020	First review
1.2	June 2020	Alcian blue review and ldo added
2.0	April 2023	Added last germline cells + Summary sheets
2.1	May 2023	Added aoB

Summary

Abbreviations.....	1
Introduction.....	2
Overall ovarian organization.....	5
Decision Tree.....	7
Follicle Summary Sheet.....	8
Oogonium (og).....	9
Primary oocyte stage 1 (po1).....	10
Primary oocyte stage 2 (po2).....	11
Lipid droplet oocyte (ldo).....	12
Cortical alveoli oocyte (cao).....	13
Oocyte in early vitellogenesis (vtg1).....	15
Oocyte in vitellogenesis stage 2 (vtg2).....	17
Oocyte in hydration (oih).....	19
Hydrated oocyte (ho).....	20
Post-Ovulatory Follicle (POF).....	21
Atresia (aoA & aoB) and Lysis (L).....	22
Connective tissue (ct) & Gonadal wall (gw).....	25
Blood vessel (bv).....	26
Bibliography.....	27

Abbreviations

aoA : undischarged atretic oocyte
aoB : discharged atretic oocyte
bv : blood vessel
CA : cortical alveoli
cao : cortical alveoli oocyte
chr : condensed chromosome
chrom : chromatin
ct : connective tissue
E : unnatural emptiness (from the section's cut)
fc : follicular cell
gw : gonadal wall
ho : hydrated oocyte
Is : Intercellular space
L : lysis
ld : lipid droplet
ldo : lipid droplets oocyte
mc : macrophage cell
N : nucleus
NC : Nucleo-Cytoplasmic
nl : nucleolus
og : oogonium
oih : oocyte in hydration
po1 : primary oocyte stage 1
po2 : primary oocyte stage 2
POF : Post-Ovulatory Follicle
SI : sexually immature
SM : sexually mature
som : somatic cell
T : theca
U : undetermined structure
vd : vitellus droplet
vi : vitellus
vtg1 : oocyte in stage 1 of vitellogenesis
vtg2 : oocyte in stage 2 of vitellogenesis
vtg3 : oocyte in stage 3 of vitellogenesis
zr : *zona radiata*



Introduction

During this study, the terminology used was that of Brown-Peterson *et al.* (2011), following the criteria set by the working groups of the International Council for the Exploration of the Sea (ICES) that described the different maturity phases for European stock species (ICES 2008, 2010, 2012, 2018, 2019).

For the description of the female germinal cells that will become gametes, the terms **oogonia** (before meiosis) or **oocyte** (meiosis has begun) will be used. An oocyte is characterized by an **ooplasm** encased in an **olemma** (plasmic membrane) (Tyler and Sumpter, 1996). A **zona radiata** will also be present once the cell becomes dependent on follicle-stimulating hormone (FSH).

The term **follicle** will be used to designate an oocyte encased in somatic cells: **follicular cells** and **theca cells** (Tyler and Sumpter, 1996).

For the description of geminal cells development, the term **stage** will be used to designate the different gametogenesis stages (Brown-Peterson *et al.*, 2011) :

- Oogonia
- Primary growth oocytes
- Secondary growth oocytes
- Oocyte maturation
- Ovulation stage

The sexual maturity cycle (*Figure 1*) is split into two **states**. The Sexually Immature (**SI**) state and the Sexually Mature (**SM**) state. The terminology **phase** will be used for the gonadal development. The reproduction cycle of fish is divided into seven **phases** (Brown-Peterson *et al.*, 2011; ICES, 2012; 2018).

- Immature
- Developing
- Spawning
- Regressing
- Regenerating
- Omitted spawning
- Abnormal

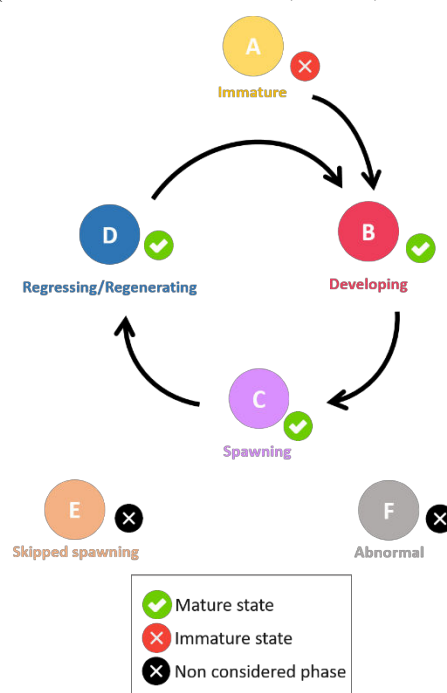


Figure 1 : Different phases found in the teleost maturation cycle, from the ICES (2018). The phases being: Immature (A), Developing (B), Spawning (C), Regressing/Regenerating (D), Skipped spawning (E) and Abnormal (F)

Sub-divisions/Sub-phases (Ba, Bb, Ca, Cb, Da, Db) should be used for specific particularities, meaning that their use is optional and must be evaluated for each species (ICES, 2012).

Table 1 : Macroscopic and microscopic descriptions of the phases in the reproductive cycle of female fish, from Brown-Peterson *et al.* (2011). Timing within each phase is species dependent. Some criteria listed for phases may vary depending on species, reproductive strategy, or water temperature. Subphases that apply to all fishes are listed; additional subphases can be defined by individual researchers. With CA = cortical alveoli, GVBD = germinal vesicle breakdown, GVM = germinal vesicle migration, OM = oocyte maturation, PG = primary growth, POF = post-ovulatory follicle complex, Vtg1 = primary vitellogenic, Vtg2 = secondary vitellogenic and Vtg3 = tertiary vitellogenic

Phase	Previous terminology	Macroscopic and histological features
Immature (never spawned)	Immature, virgin	Small ovaries, often clear, blood vessels indistinct. Only oogonia and PG oocytes present. No atresia or muscle bundles. Thin ovarian wall and little space between oocytes.
Developing (ovaries beginning to develop, but not ready to spawn)	Maturing, early developing, early maturation, mid-maturation, ripening, previtellogenic	Enlarging ovaries, blood vessels becoming more distinct. PG, CA, Vtg1, and Vtg2 oocytes present. No evidence of POFs or Vtg3 oocytes. Some atresia can be present. <i>Early developing subphase</i> : PG and CA oocytes only.
Spawning capable (fish are developmentally and physiologically able to spawn in this cycle)	Mature, late developing, late maturation, late ripening, total maturation, gravid, vitellogenic, ripe, partially spent, fully developed, prespawning, running ripe, final OM, spawning, gravid, ovulated	Large ovaries, blood vessels prominent. Individual oocytes visible macroscopically. Vtg3 oocytes present or POFs present in batch spawners. Atresia of vitellogenic and/or hydrated oocytes may be present. Early stages of OM can be present. <i>Actively spawning subphase</i> : oocytes undergoing late GVM, GVBD, hydration, or ovulation.
Regressing (cessation of spawning)	Spent, regression, postspawning, recovering	Flaccid ovaries, blood vessels prominent. Atresia (any stage) and POFs present. Some CA and/or vitellogenic (Vtg1, Vtg2) oocytes present.
Regenerating (sexually mature, reproductively inactive)	Resting, regressed, recovering, inactive	Small ovaries, blood vessels reduced but present. Only oogonia and PG oocytes present. Muscle bundles, enlarged blood vessels, thick ovarian wall and/or gamma/delta atresia or old, degenerating POFs may be present.

For the histological slides, fresh ovaries were placed in a Davidson solution before their inclusion in paraffin. 3 µm thick sections were cut using a microtome (HM330) and were either trichrome stained with a Prenant-Gabe (Gabe, 1968) solution or Alcian blue stained.

The histological pictures found in this lexicon were taken with a Nikon Eclipse 80i microscope using the NIS-Elements D (v. 5.02.03) software. Mean cell diameters and mean *zona radiata* widths were taken with an Olympus AX70 microscope using the Olympus CellSens© software, on a minimum of 20 oocytes found throughout multiple slides.

As seen in Table 1, different **phases** are correlated with the presence or absence of specific cell types. Following the terminologies and definitions of Brown-Peterson *et al.* (2011) and the ICES (2012; 2018). For the red striped mullet (*Mullus surmuletus*), the different cell types described in this work will be shown in bold (**og**, **po1**, **po2**, **ldo**, **cao**, **vtg1**, **vtg2**, **oih**, **ho**, **POF**) while their matching *Figures* will be indicated in italic.

- Oogonium stage :
 - oogonium (**og**) (*Figure 6 & 7*)
- Primary growth oocytes :
 - Primary stage 1 oocyte (**po1**) (*Figures 8 & 9*)
 - Primary stage 2 oocyte (**po2**) (*Figures 10 & 11*)
 - Lipid droplets oocytes (**ldo**) (*Figure 12*)
- Secondary growth oocytes :
 - cortical alveoli oocytes with lipid droplets (**cao**) (*Figures 13 to 15*)
 - vitellogenic oocytes
 - subphase vtg1 : **vtg1** (*Figures 16 to 18*)
 - subphase vtg2 : **vtg2** (*Figures 19 & 20*)
- Oocyte maturation :
 - nucleus migration :
 - germinal vesicle breakdown : oocyte enters metaphase I of meiosis
 - vitellus coalescence : oocyte in hydration (**oih**) (*Figure 21*)
 - hydration : hydrated oocytes (**ho**) (*Figure 22*)

Ovulation stage : discharge of the hydrated oocytes into the ovary's lumen, leaving behind a post-ovulatory follicle (**POF**) (*Figure 23*)

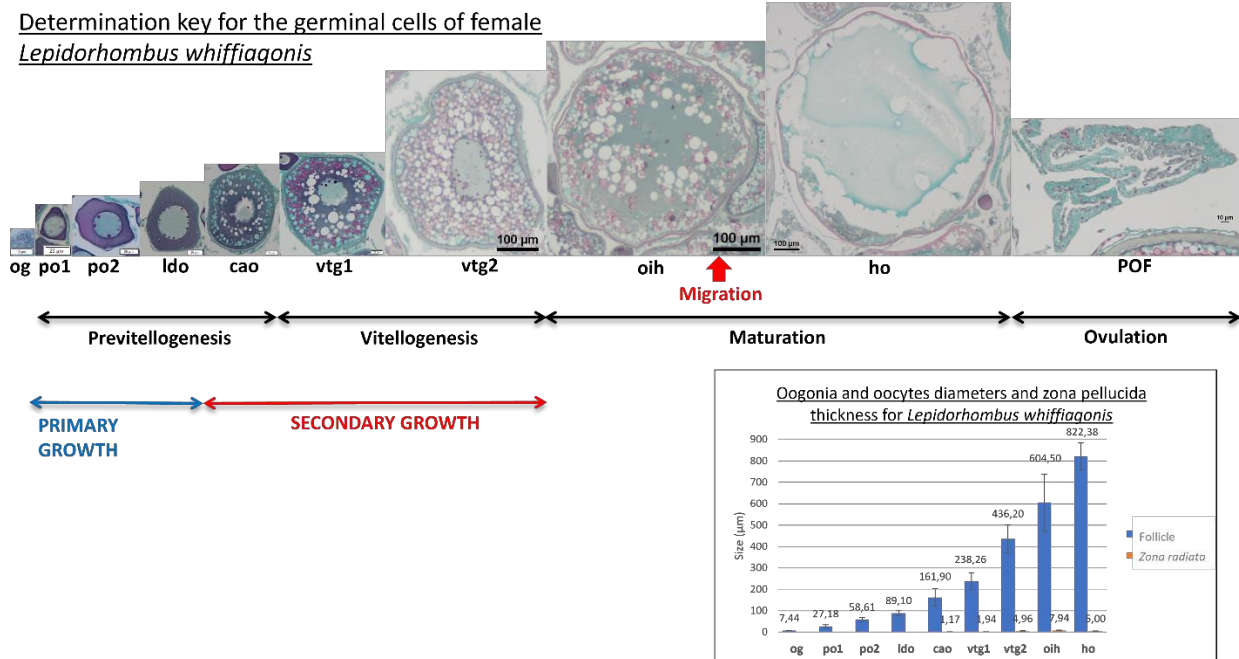


Figure 2 : Determination key of the different female germinal cells that can be found in the ovaries of *Lepidorhombus whiffiagonis* at different oogenesis stages. With average oogonium and oocyte diameters ($\mu\text{m} \pm$ standard deviation), and *zona radiata* widths ($\mu\text{m} \pm$ standard deviation)



Overall ovarian organization

The megrim is a **total spawner** species, meaning that the females will release all of their oocytes as a unique event during the breeding season.



Figure 3 : Dissected megrim, *Lepidorhombus whiffiagonis*, with the dorsal ovary uncovered

dorsal ovary

Criteria like the gonad wall (**gw**) thickness, connective tissue (**ct**) quantity, gonad vascularization (**bv**) or the surface area of the **lumen**, will depend on the maturity phase the fish is in. The histological cross sections will visually be quite different, with oocytes at various stages of gametogenesis.

Each gonad is organized concentrically (*Figure 4* and *Figure 5*), with the ovarian lamellas delimited by the germinal epithelium. The germinal cells (oogonia and oocytes) are found within these ovarian lamellas, inside follicles, at different stages of ovogenesis. The connective tissue (**ct**) will hold the germinal cells together, and the gonad wall (**gw**) can vary in thickness. Finally, the **lumen** is the naturally empty space found between the germinal epithelium lamellas inside the ovary.

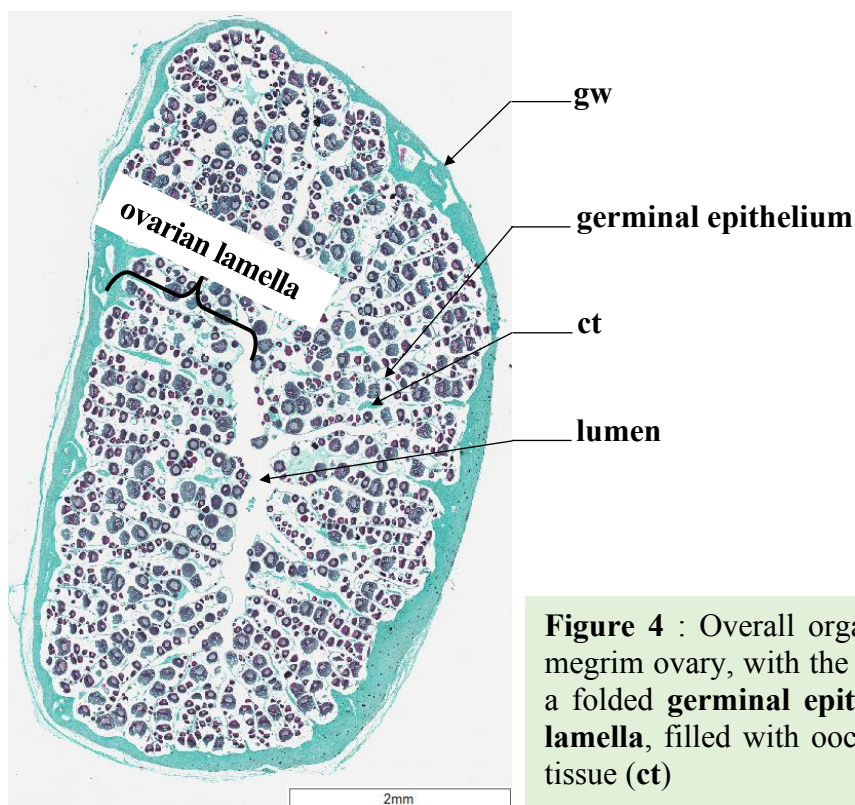


Figure 4 : Overall organization of a cross section of a megrim ovary, with the gonad wall (**gw**), the **lumen**, and a folded **germinal epithelium**, that makes the **ovarian lamella**, filled with oocytes held together by connective tissue (**ct**)

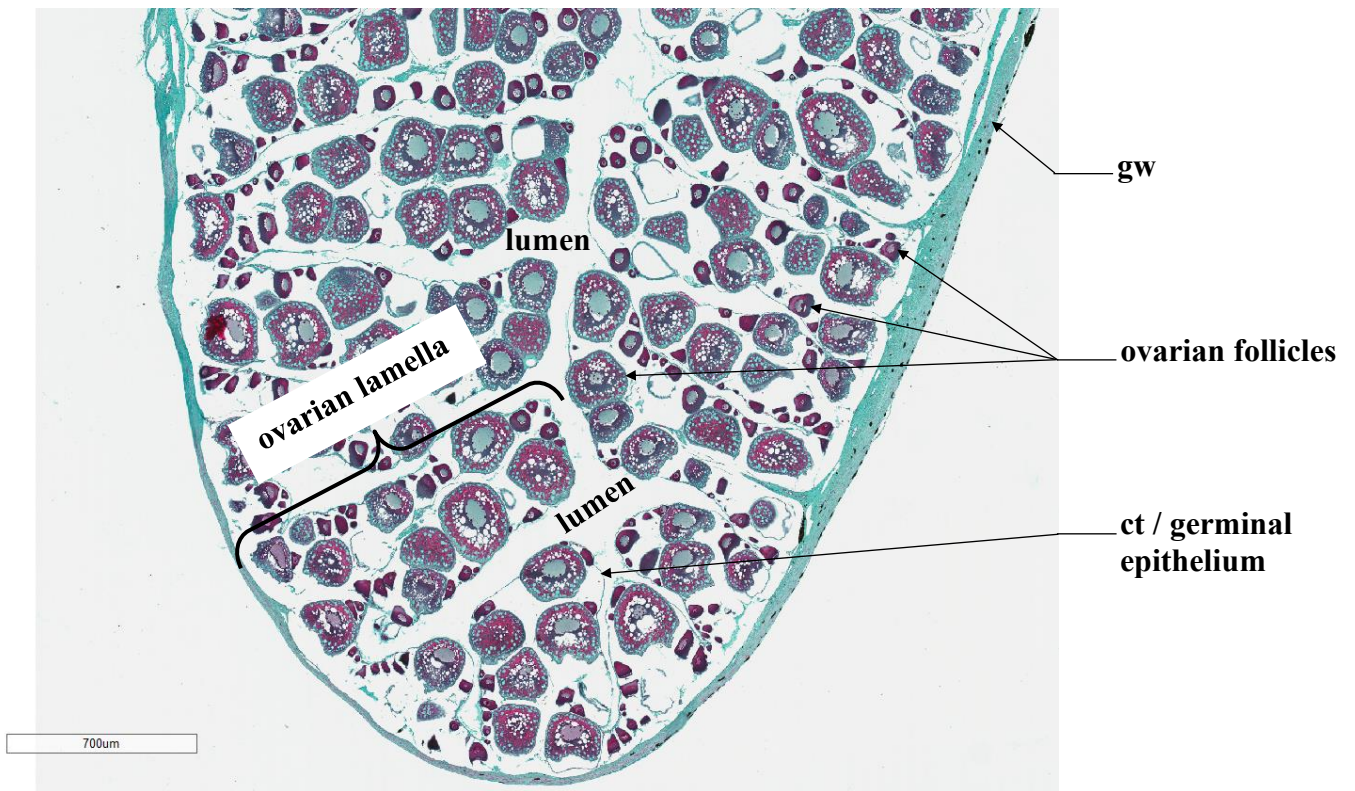
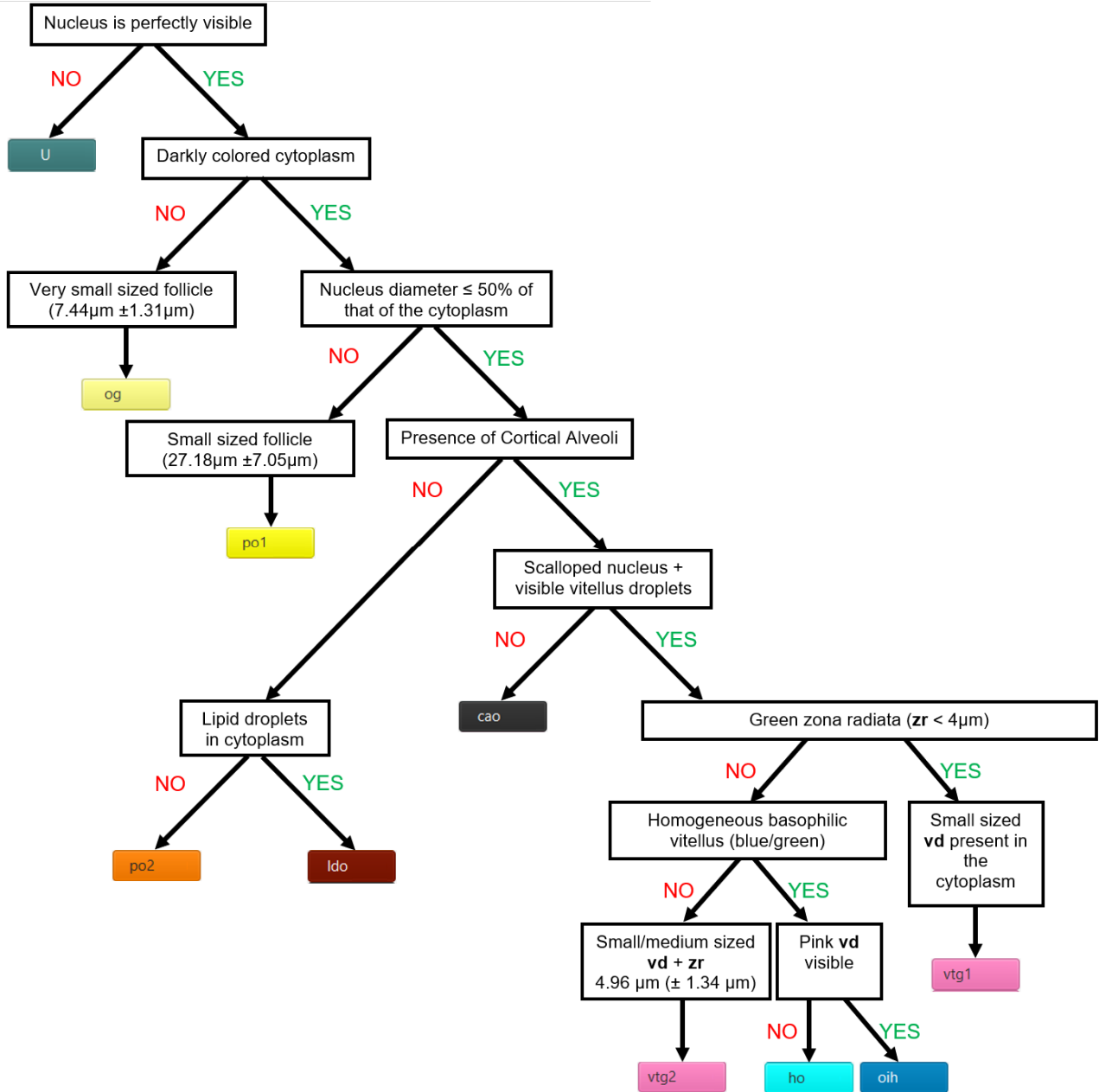


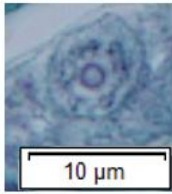
Figure 5 : Partial view of a megrim ovary cross section, with the gonad wall (**gw**), the **lumen**, and oocytes in **follicles** held together by connective tissue (**ct**), organized inside **ovarian lamellas**

Decision Tree



Follicle Summary Sheet

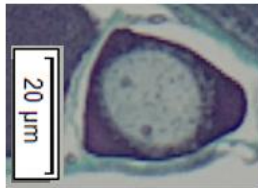
og



7.44μm (±1.31μm)

Light gray nucleus taking most of the space, barely visible light-colored cytoplasm with chromatin. Single nucleolus may be present

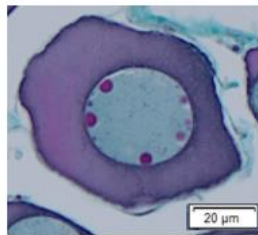
po1



27.18μm (±7.05μm)

Nucleus diameter >50% of the cytoplasm's. Nucleus is visible, smooth and round, one or two nucleoli can be present. Dark colored cytoplasm

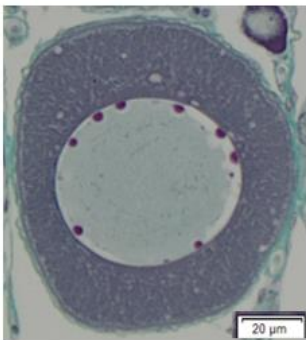
po2



58.61μm (±9.27μm)

Nucleus is visible, smooth and round. Many nucleoli can be present. Dark colored cytoplasm

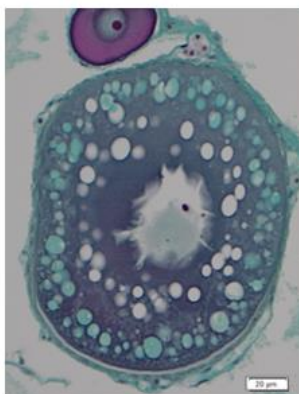
ido



89.10μm (±10.81μm)

Nucleus is visible, smooth, many nucleoli. Dark colored cytoplasm containing white lipid droplets

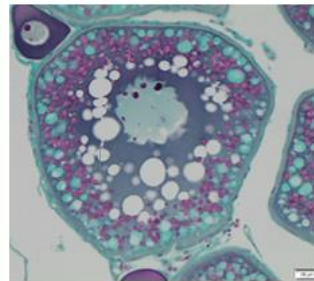
cao



161.90 (±40.21 μm)

Cortical alveoli near the outer periphery, green *zona radiata* (1.17μm±0.29μm), scalloped nucleus with multiple nucleoli, growing white lipid droplets in the cytoplasm

vtg1

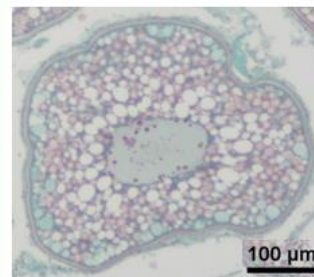


238.36μm (±36.50μm)

First appearance of small pink vitellus droplets amongst the cortical alveoli, under the thin greenish *zona radiata* (1.89μm±0.37μm).

Scalloped nucleus with multiple nucleoli. Large lipid droplets around the nucleus

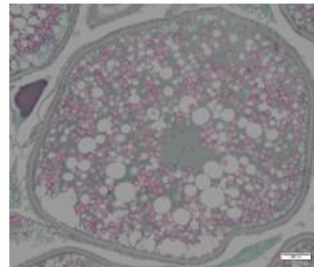
vtg2



436.20μm (±66.51μm)

Zona radiata thickens (4.96μm±1.34μm) and is pink and striated. Large vitellus droplets take up the entire space in the cytoplasm. Lipid droplets fuse and become bigger

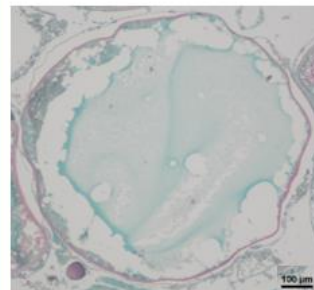
oih



604.50μm (±133.81μm)

Vitellus droplets fuse, giving the cytoplasm a homogenous dark turquoise color. The *zona radiata* (7.94μm±1.76μm) is pink and striated

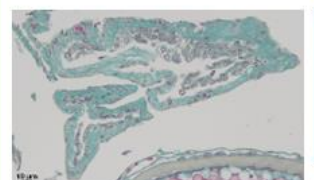
ho



822.38μm (±62.92μm)

Homogeneous basophilic vitellus (turquoise blue areas). *Zona radiata* (5.00μm±0.82μm) pink and striated.

POF



Empty theca, green colored like connective tissue. Macrophage cells may be present. Great variability in size and shape



Oogonium (og)

An oogonium (**og**) has a pale nucleus (**N**), due to low chromosome condensation, and a high nucleo-cytoplasmic (NC) ratio (very little cytoplasm). Chromatin clusters can be seen near the edges of the nucleus. Inside this nucleus, a single large nucleolus can generally be found. The cytoplasm (**c**) is light-colored (*Figure 6*). Oogonia stem from germinal cells through gonial mitosis. They can be found alone or in a germinal niche within the germinal epithelium, accompanied by somatic cells (**som**).

Identification : It is uncommon to fall on this very small sized cell. The **nucleus is light-gray and fully apparent** while the **cytoplasm is barely visible and very light-colored**. A **single** light-colored and smooth **nucleolus** can be present. The diameter of the nucleus of an oogonium is greater than the surface area of the cytoplasm (>50 %).

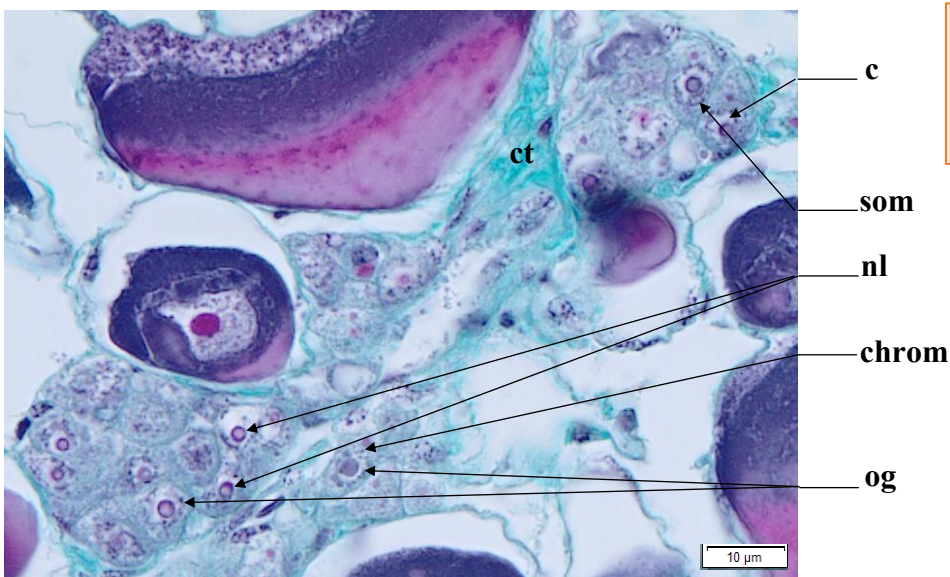
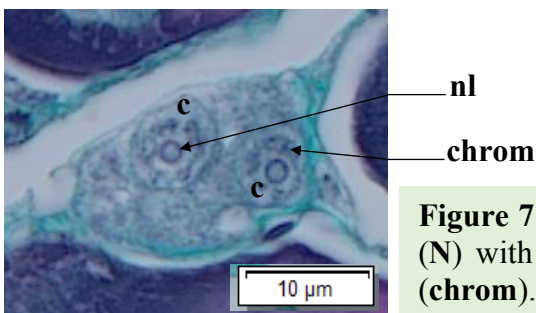


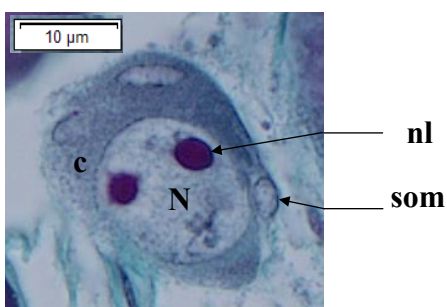
Figure 6 : Germinal niche with oogonia (**og**) and their apparent, decondensed, nucleus (**N**) with a single large nucleolus (**nl**) and clusters of chromatin (**chrom**). Light-colored cytoplasm (**c**). Presence of somatic cells (**som**)



Primary oocyte stage 1 (po1)

A primary oocyte stage 1 (**po1**) has a darker cytoplasm (**c**) compared to an oogonium (**og**), with a smaller NC ratio. The diameter of the cytoplasm is inferior or equal to 50 % of the nucleus' diameter. The nucleus (**N**) is spherical, smooth, with the possibility of one or two visible nucleolus.

Identification : This cell type is slightly bigger than an oogonium, but is still relatively small in size compared to the other cellular structures found inside the ovary. Falling on this follicle in stereology is still uncommon. The **nucleus must be fully visible, smooth**, and the **cytoplasm is darkly-colored**. The nucleus diameter of a **po1** is inferior or equal to 50 % of the cytoplasm's diameter, and can contain up to **2 nucleolus**. If there is a hesitation between a **po1** and a **po2**, the cell size can be taken into consideration.



Average size

po1 : 27.18μm (±7.05μm)

Figure 8 : Primary oocyte stage 1 (**po1**) with a spherical and smooth nucleus (**N**) with two nucleolus (**nl**). The cytoplasm (**c**) is darker compared to that of an oogonium (**og**). Somatic cells (**som**) can be seen

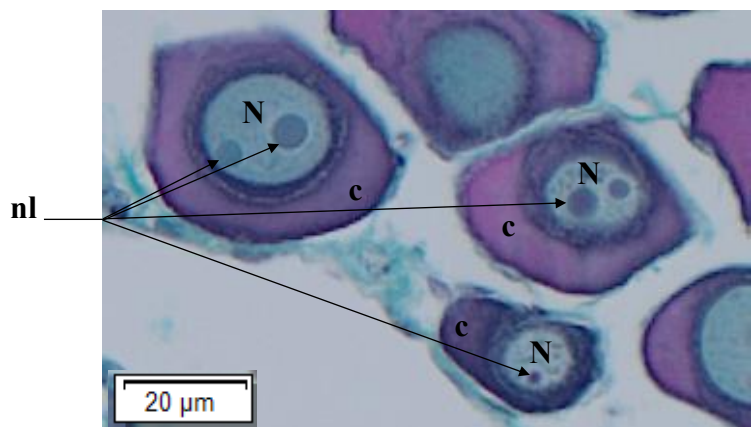
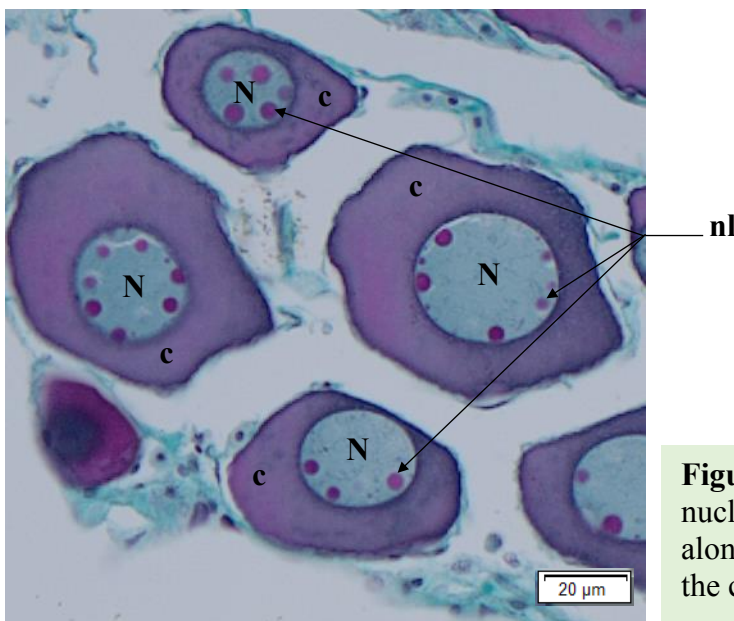


Figure 9 : Three primary oocyte stage 1 (**po1**) with a spherical and smooth nucleus (**N**) with a single, or two, nucleolus (**nl**). The cytoplasm (**c**) is darker compared to an oogonium (**og**)

Primary oocyte stage 2 (po2)

A primary oocyte stage 2 (**po2**) dark cytoplasm (**c**), with a high **NC** ratio. The diameter of the cytoplasm is superior to 50 % of the nucleus' diameter. The nucleus (**N**) is spherical, smooth, with the possibility of more than 3 large visible nucleolus present along the nuclear envelope. It is sometimes possible to see lampbrush chromosomes inside the nucleus, typically found in immature diplotene oocytes.

Identification : This ovarian follicle varies in size, between the **po1** and **cao** stage. The **nucleus must be fully visible, smooth, and the cytoplasm is darkly-colored**. The nucleus diameter of a **po2** is superior to 50 % of the cytoplasm's diameter, and can contain **3 or more large nucleoli** against the nuclear envelope. If there is a hesitation between a **po1** and a **po2**, the cell size can be taken into consideration.



Average size
po2 : 58.61μm (±9.27μm)

Figure 10 : A **po2**, with a spherical and smooth nucleus (**N**) filled with multiple nucleoli (**nl**) along the inside of its nuclear envelope, inside the cytoplasm (**c**)

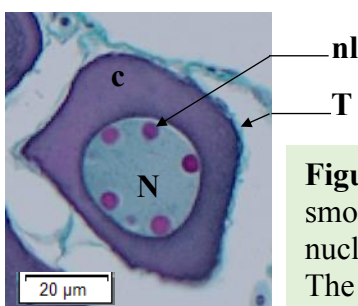


Figure 11 : A **po2**, with a spherical and smooth nucleus (**N**) filled with multiple nucleoli (**nl**) along its nuclear envelope. The theca (**T**) encases the cytoplasm (**c**)

Lipid droplet oocyte (ldo)

Before reaching the cortical alveoli (cao) stage, the follicle will grow in size and accumulate lipid droplets (ld) in its cytoplasm (c). These lipid droplets first appear along the outer periphery of the cytoplasm. They will then gather around the nucleus (N). The nucleus is smooth, round and contains multiple nucleoli (nl) against its nuclear membrane. Staining follicles Alcian blue shows that the vesicles in the cytoplasm are unstained : they do not contain acidic polysaccharides and probably consist in lipid droplets

Identification : A lipid droplet oocyte (ldo) is characterized by a **smooth and round nucleus** with **multiple nucleoli along its nuclear membrane**. **White lipid droplets** are present in the **cytoplasm**.

Average size

ldo : $89.10\mu\text{m}$ ($\pm 10.81\mu\text{m}$)

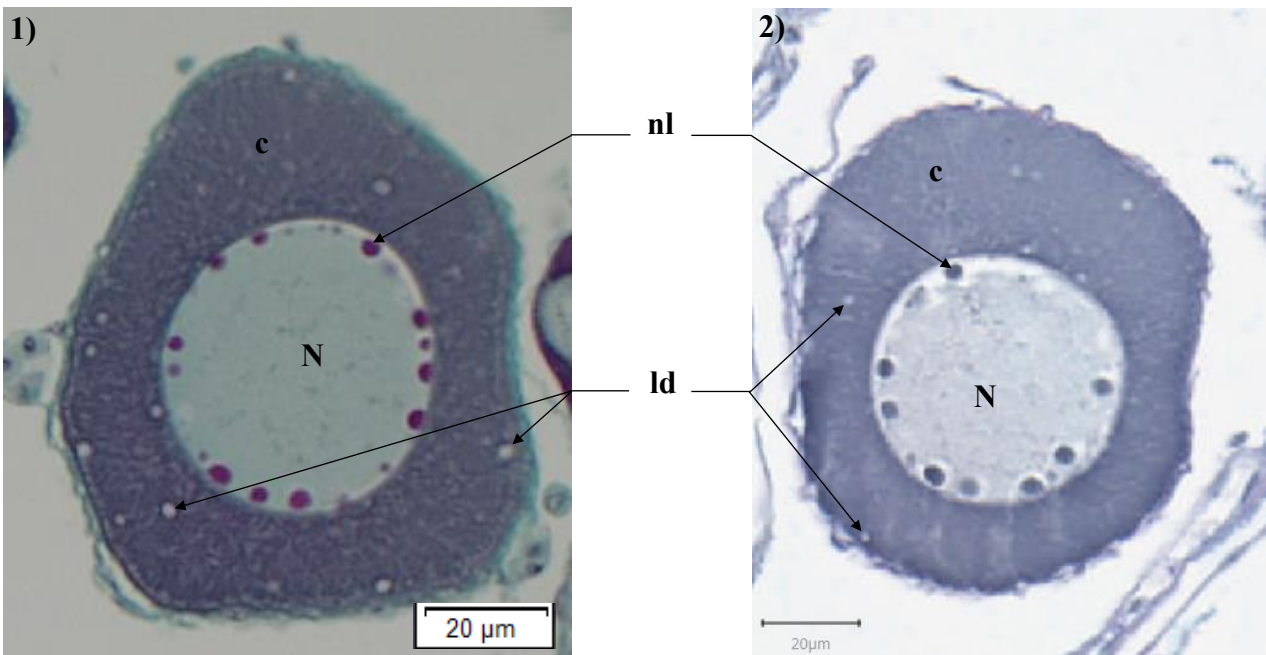


Figure 12 : A lipid droplet oocyte **1)** trichrome stained and **2)** Alcian blue stained. Lipid droplet oocytes (**ldo**) with lipid droplets (**ld**) in the cytoplasm (**c**). The nucleus (**N**) is round and smooth and holds multiple nucleoli (**nl**) along its nuclear envelope

Cortical alveoli oocyte (cao)

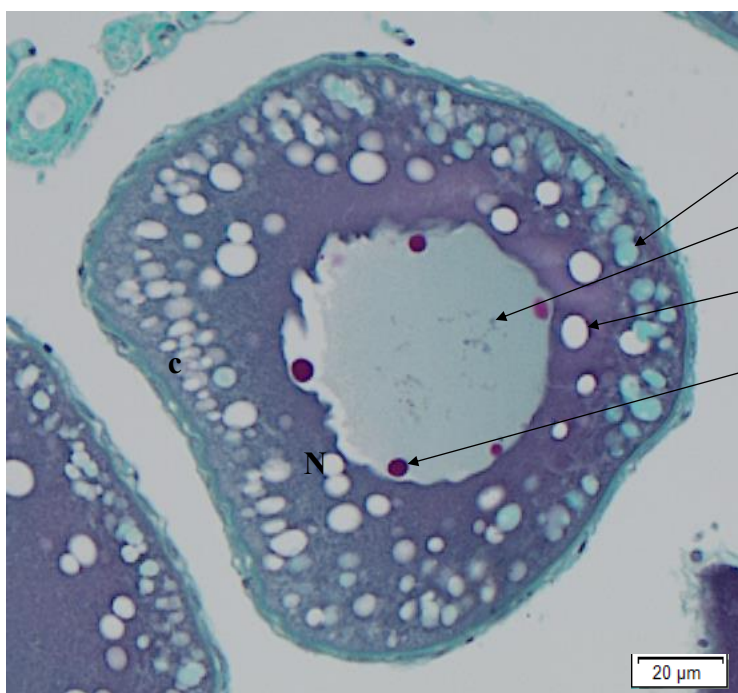
An oocyte with cortical alveoli (**cao**) is defined by a first appearance of cortical alveoli (**CA**) in the cytoplasm (**c**), on the periphery of the oocyte, under the somatic cells layer. The nucleus (**N**) is in the center of the cytoplasmic mass, with a smooth nuclear envelope and multiple nucleoli (**nl**) against it.

As the **cao** matures, the **CA** and lipid droplets (**ld**) will grow in size and take more place inside the cytoplasm, with the **CA** against the outer periphery in the cytoplasm while the **ld** are centered around the nucleus. At this point, the nucleus is scalloped and filled with multiple nucleoli against the nuclear envelope.

The somatic cell layer (**som**) will start to grow and the *zona radiata* (**zr**) will start to form. Sometimes, it is possible to see lampbrush chromosomes (**chr**) inside the nucleus, typically found in immature diplotene oocytes.

The **CA** will take a lot of space inside the cytoplasm and can be mistaken with lipid droplets (Anderson, 1968 ; Tyler et Sumpter, 1996). The **CA** will appear in the outer periphery of the outer cytoplasm. The Alcian blue coloration, as well as the trichrome stain, allows us to differentiate them from lipid droplets. With the trichrome stain, the **CA** will take a mint color, while they will take a purple color with the Alcian blue stain (*cf Figure 14*), revealing the presence of acidic polysaccharides.

Identification : An oocyte with cortical alveoli is primarily defined by the **presence of cortical alveoli in the cytoplasm**, with a first appearance on the outer periphery of the cytoplasm. The **nucleus in the center of the follicle contains multiple nucleoli** along its nuclear envelope, and the **nuclear envelope will become scalloped as the cell approaches the vitellogenic stage**. It is possible to see condensed chromosomes (small irregular dark-gray lines inside the nucleus).



Average size

cao : 161.90μm (±40.21μm)

zr : 1.17μm (±0.29μm)

Figure 13 : Cortical alveoli oocyte (**cao**) with a smooth nucleus (**N**) holding multiple nucleoli (**nl**) and lampbrush chromosomes (**chr**). Cortical alveoli (**CA**) and lipid droplets (**ld**) build-up in the cytoplasm (**c**)

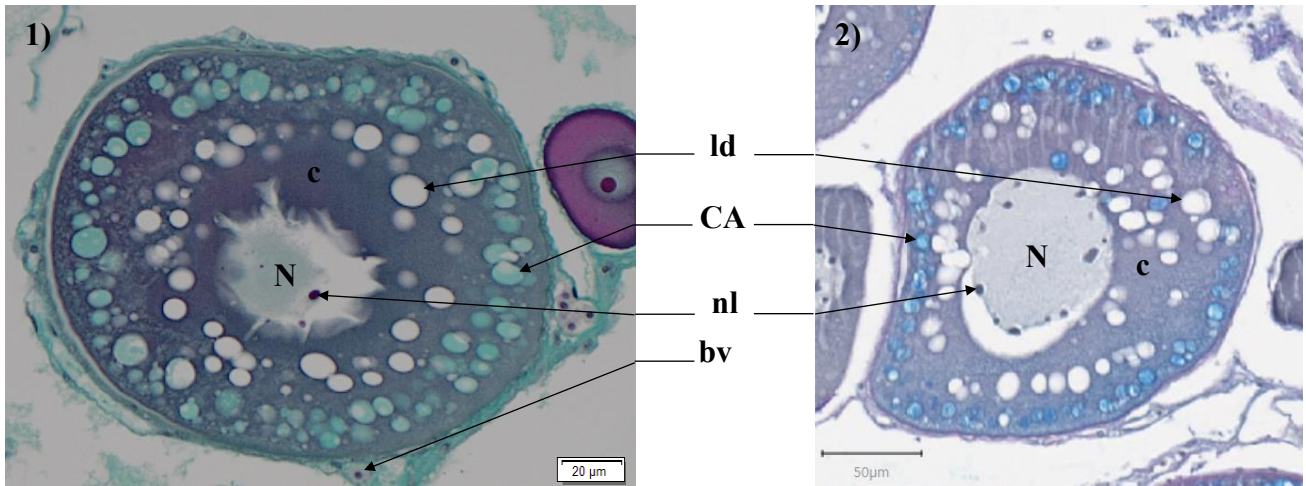


Figure 14 : Cortical alveoli (CA) will come out mint colored with a 1) Gabe trichrome stain, and dark blue with a 2) Alcian blue stain. Here, the cortical alveoli oocytes (cao) have a scalloped nucleus (N) holding multiple nucleoli (nl). Cortical alveoli (CA) build-up in the cytoplasm (c) near the outer periphery of the follicle while lipid droplets (ld) gather around the N. Presence of blood vessels (bv)

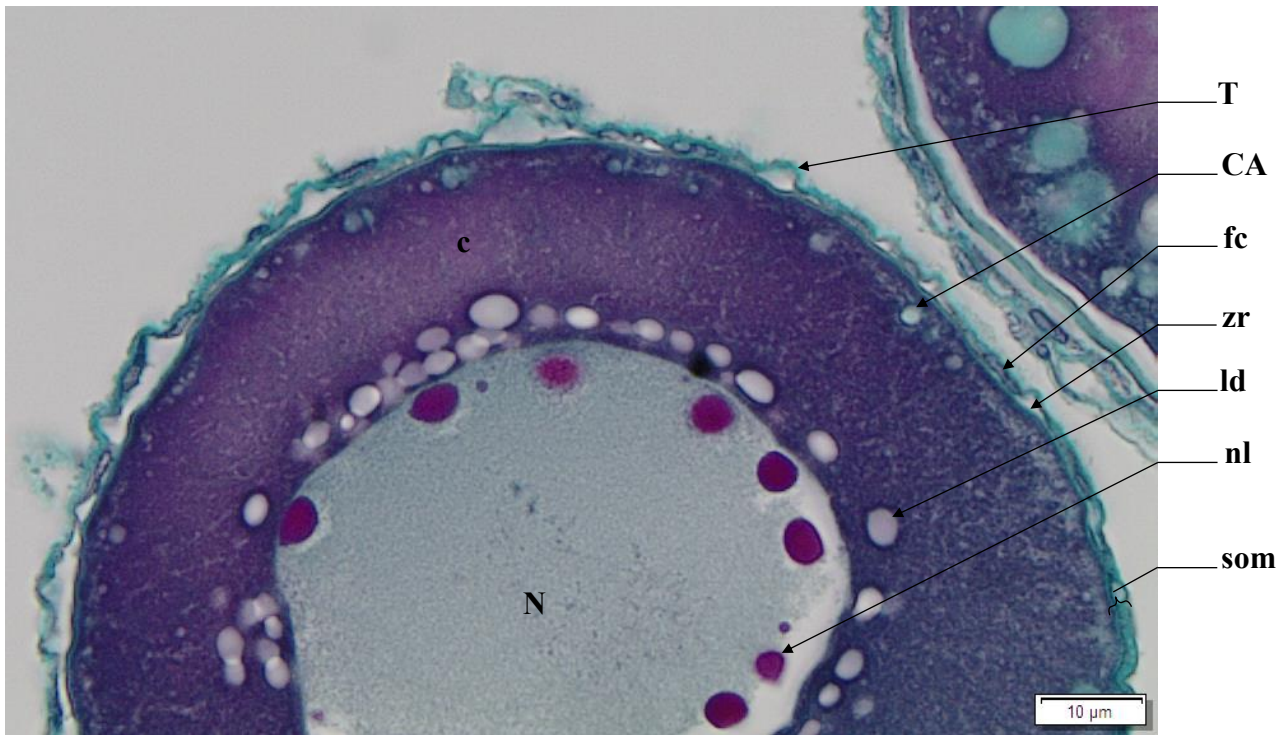


Figure 15 : Cell wall of an oocyte with cortical alveoli (cao) appearing. The nucleus (N) is starting to scallop and contains multiple nucleoli (nl) along its nuclear envelope. Lipid droplets (ld) build-up around the N, in the cytoplasm (c). Cortical alveoli (CA) start to form on the periphery of the cytoplasm, under the somatic cell layer (som) that is beginning to grow, with presence of a green zona radiata (zr) and follicular cells (fc) under the theca (T)



Oocyte in early vitellogenesis (vtg1)

An oocyte at the beginning of the vitellogenic stage (**vtg1**) is defined by the presence of vitellus droplets (**vd**), pink eosinophilic droplets, that form in the periphery of the cytoplasm (**c**), under the somatic cell layer. The *zona radiata* (**zr**) will start developing between the cytoplasm and the follicular cells (**fc**) + theca (**T**). The *zona radiata* (**zr**) is thin and green (not acidophilus). The nucleus (**N**) is still centered in the follicle, with multiple nucleoli (**nl**) along the scalloped nuclear envelope.

As the cell matures, the vitellus droplets (**vd**), lipid droplets (**ld**) and cortical alveoli (**CA**) will grow in size in the cytoplasm (**c**).

Identification : This oocyte in early vitellogenesis is recognizable by the appearance of a **pink vitellus droplets in the outer periphery of the cytoplasm**. At the **first appearance of a vitellus droplet**, the oocyte is considered to be in the **vtg1** stage. The **nucleus is scalloped and centered inside the follicle**, containing multiple the nucleoli. **Vitellus droplets will run along the edge of the inner cell wall, along the *zona radiata* (zr)**. The *zona radiata* (**zr**) is **small and green**, as it starts to grow under the Theca (**T**). Even if the nucleus is not visible, if vitellus droplets are visible, this follicle should be placed in the **vtg1** category.

Average size

vtg1 : 238.36 μ m (\pm 36.50 μ m)

zr : 1.89 μ m (0.37 \pm μ m)

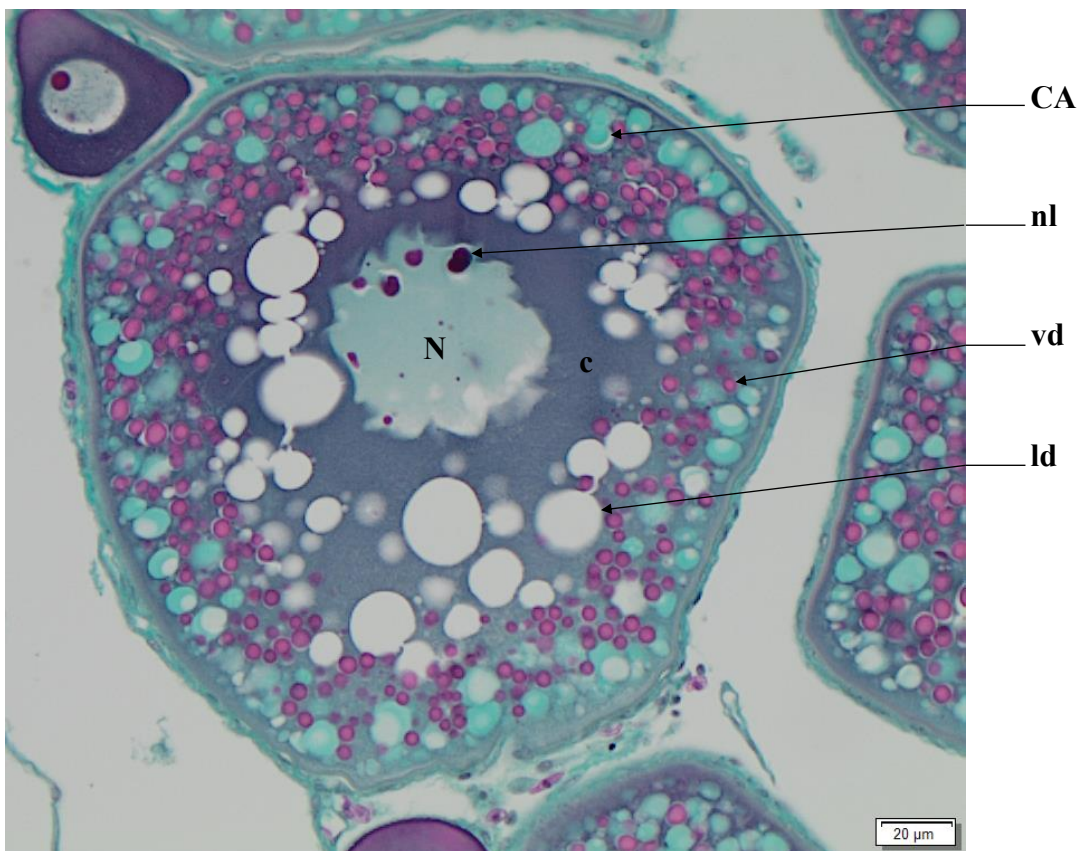


Figure 16 : A stage **vtg1** oocyte, with a scalloped nucleus (**N**) envelope containing multiple nucleoli (**nl**). Vitellus droplets (**vd**) will form on the outer periphery of the cytoplasm (**c**). Large cortical alveoli (**CA**) and lipid droplets (**ld**) are also present. Gabe trichrome stain

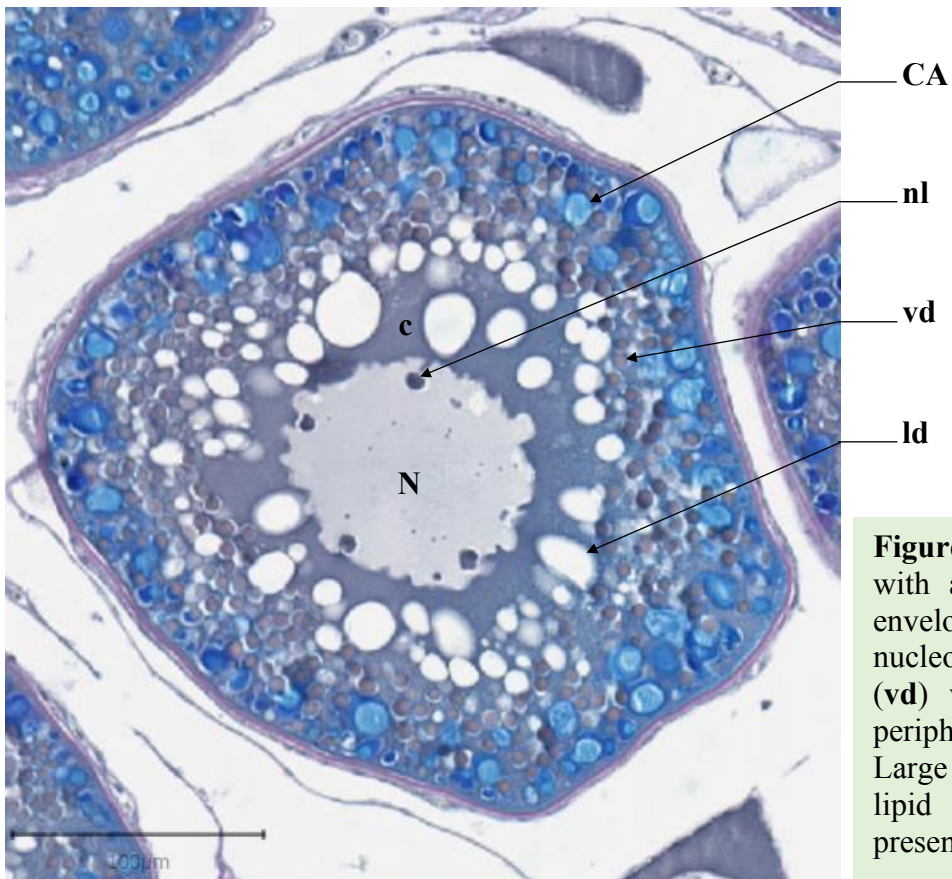


Figure 17 : A stage **vtg1** oocyte, with a scalloped nucleus (**N**) envelope containing multiple nucleoli (**nl**). Vitellus droplets (**vd**) will form on the outer periphery of the cytoplasm (**c**). Large cortical alveoli (**CA**) and lipid droplets (**ld**) are also present. Alcian blue stained

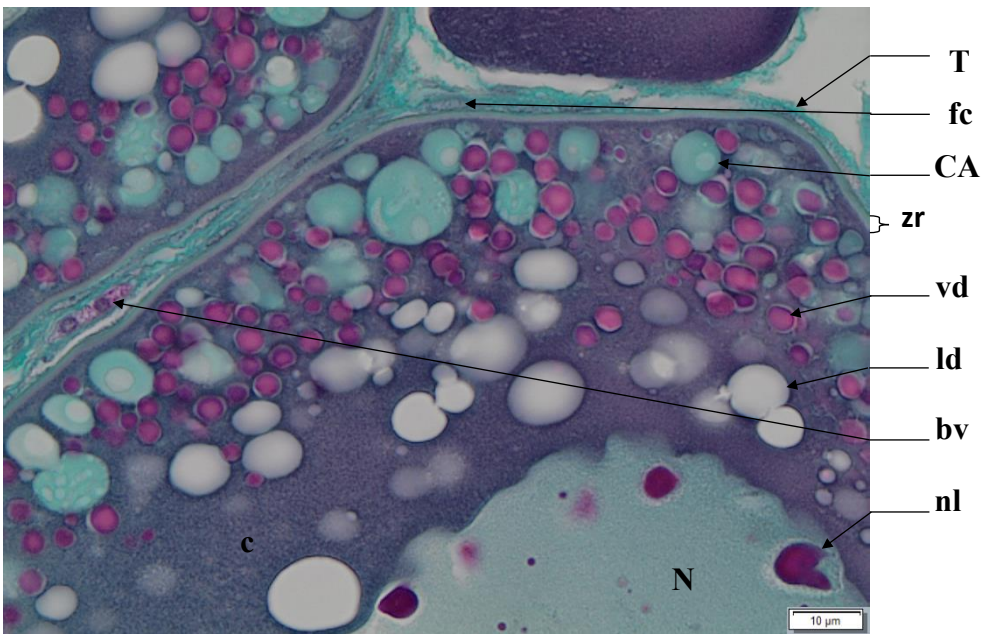


Figure 18 : Cell wall of a **vtg1** oocyte with a scalloped nucleus (**N**) envelope containing multiple nucleoli (**nl**). Vitellus droplets (**vd**) form on the outer periphery of the cytoplasm (**c**), amongst the cortical alveoli (**CA**). Presence of lipid droplets (**ld**) in the **c**. Follicular cells (**fc**) are present in the theca (**T**), with the *zona radiata* (**zr**) under these cell layers. Presence of blood vessels (**bv**) near the **T**



Oocyte in vitellogenesis stage 2 (vtg2)

During the **vtg2** stage, the *zona radiata* (**zr**) thickens and becomes striated as it takes on a pink tinge. The vitellus droplets (**vd**) will take up the entire space inside the follicle as they start to fuse together and grow in size. The lipid droplets (**ld**) fuse together into larger masses. The nucleus (**N**) is still scalloped and contains multiple nucleoli (**nl**).

Identification : A **vtg2** oocyte is defined by a **pink, thick and striated zr**, as well as **small to medium sized vitellus droplets (vd) that take up the entire space inside the follicle**. Lipid droplets (**ld**) have fused into bigger masses. It is preferable, but not mandatory for the nucleus to be visible.

Average size

vtg2 : 436.20 μ m (\pm 66.51 μ m)

zr : 4.96 μ m (\pm 1.34 μ m)

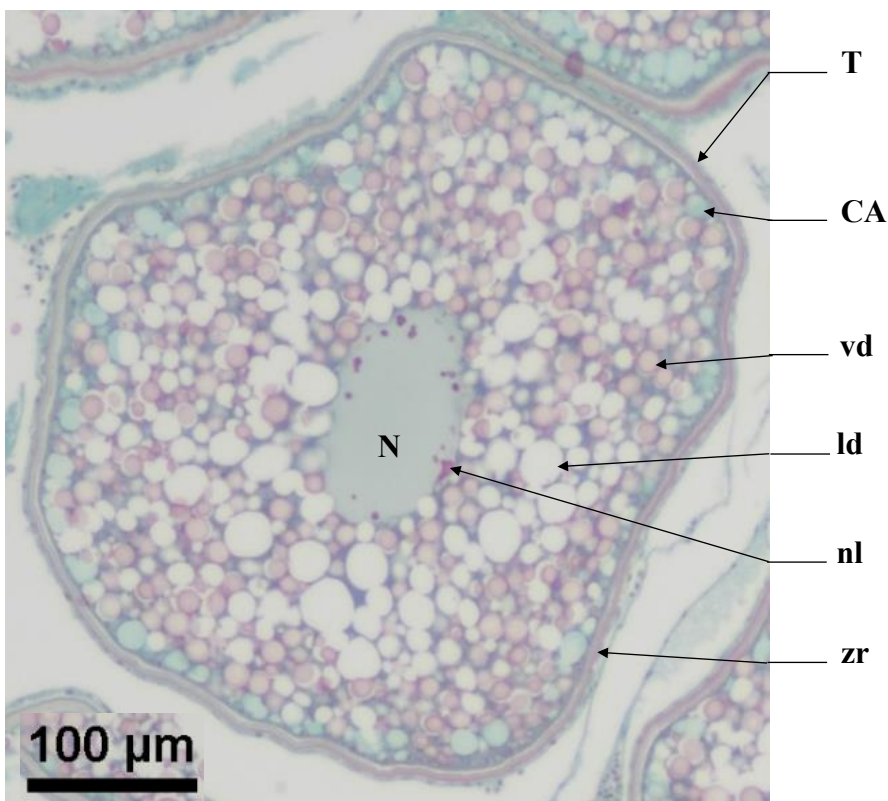


Figure 19 : Stage **vtg2** oocyte in its theca (**T**), with a scalloped nucleus (**N**) containing multiple nucleoli (**nl**). The *zona radiata* (**zr**) is pink. Medium sized vitellus droplets (**vd**) take up the entire space inside the follicle. Large lipid droplets (**ld**) and cortical alveoli (**CA**) are also present

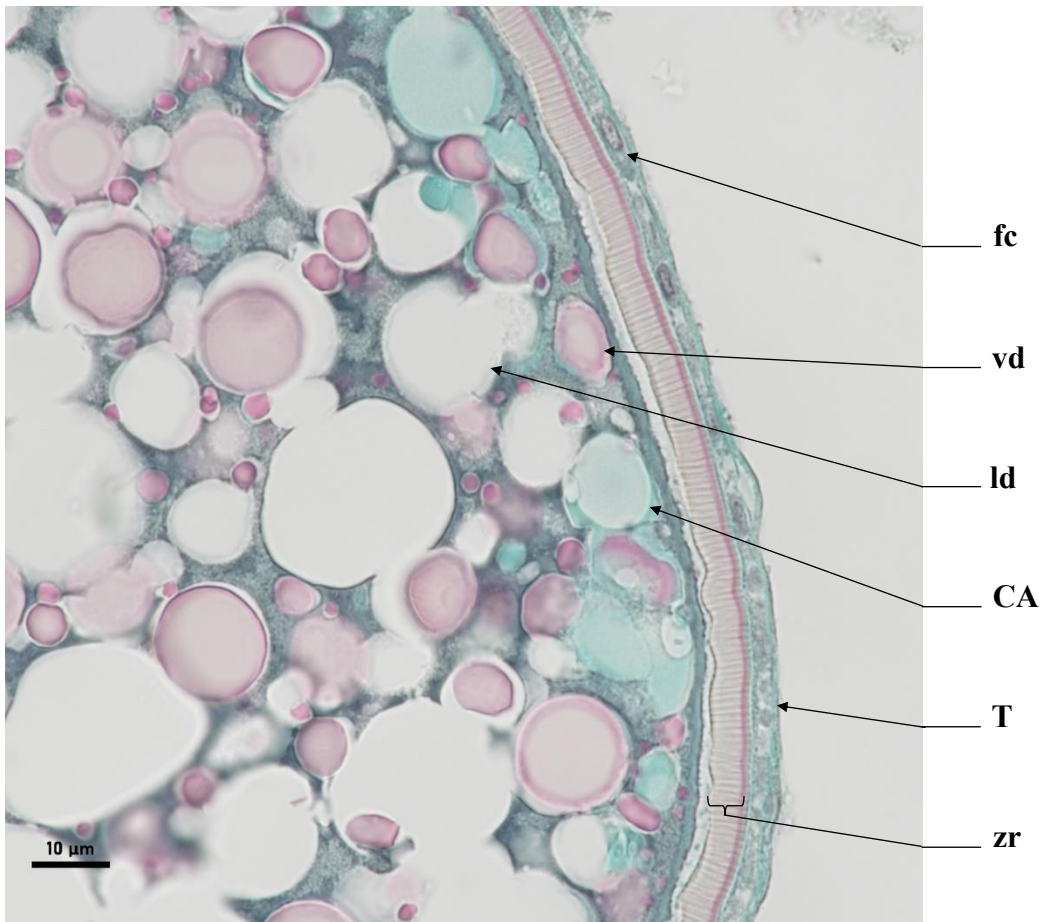


Figure 20 : Cell wall of an oocyte in vitellogenesis stage 2 (**vtg2**). The *zona radiata* (**zr**) is pink and striated, under the theca (**T**) and follicular cells (**fc**). Cortical alveoli (**CA**) grow in size, as well as the lipid droplets (**ld**) and vitellus droplets (**vd**) that take up the entire space within the follicle

Oocyte in hydration (oih)

During the **oih** stage, the nucleus (N) will migrate towards the oocyte's periphery. The lipidic droplets (**ld**) grow in size and are present throughout the entire follicle. Large cortical alveoli (**CA**) are found under the pink and striated *zona radiata* (**zr**). Vitellus droplets (**vd**) will fuse into a homogeneous mass, the basiphilic vitellus (**vi**) taking a dark green-blue tint with the trichrome stain.

Identification : The **vd** fuse into an dark blue-green homogeneous mass, with pink vitellus droplets still present. The *zona radiata* is at its thickest, pink and striated. The nucleus can be seen, but its visibility is not mandatory for the identification of this stage.

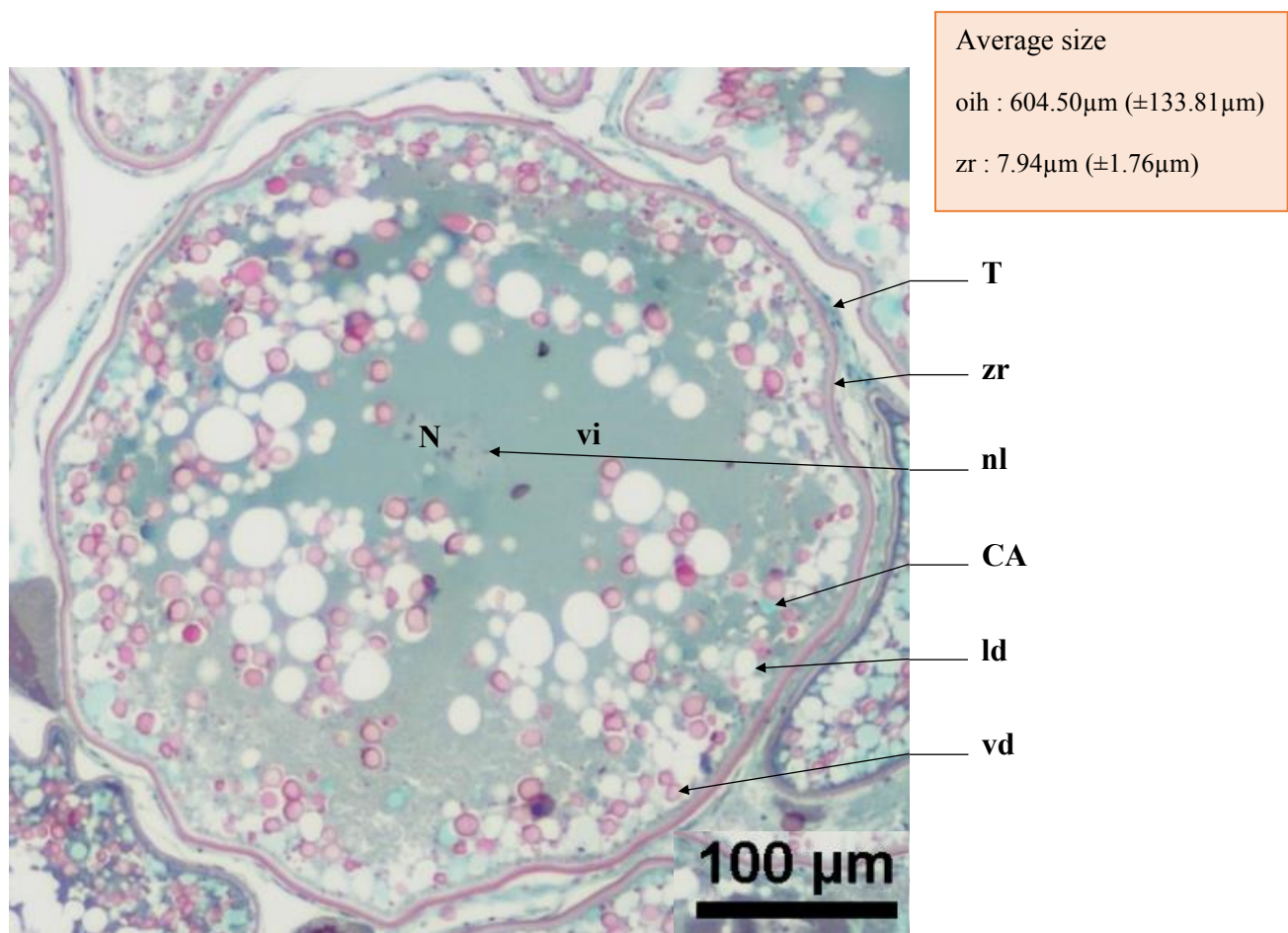
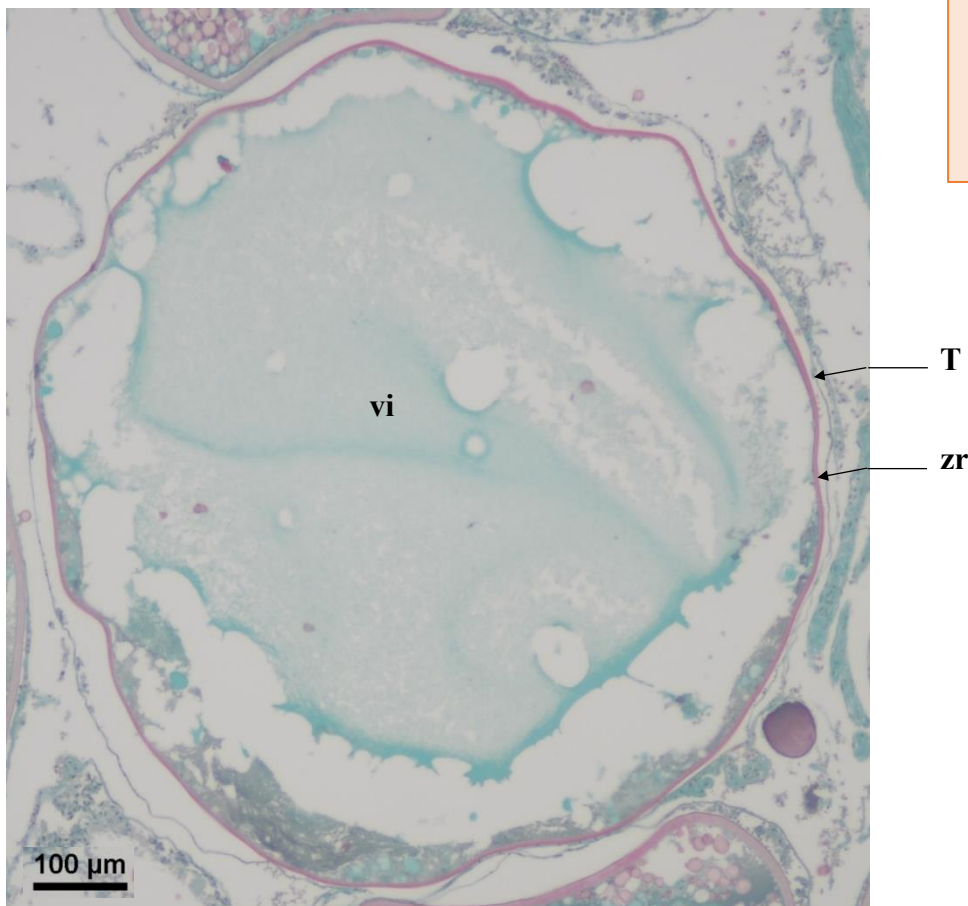


Figure 21 : Oocyte in hydration (**oih**). Cortical alveoli (**CA**) can be seen under the *zona radiata* (**zr**) that is at its thickest, pink and striated under the theca (**T**). Vitellus droplets (**vd**) fuse into a homogeneous vitellus (**vi**). Lipid droplets (**ld**) are present and the nucleus (**N**) contains multiple nucleoli (**nl**)

Hydrated oocyte (ho)

A hydrated oocyte (**ho**) is defined by a blue homogenous vitellus (**vi**) and a pink and striated *zona radiata* (**zr**).

Identification : Biggest germ cell type found in the ovary. The dehydration process during the slide mounting can lead to deformed oocytes, with a theca (**T**) that may be detached from the *zona radiata* (**zr**). Whether this oocyte has been discharged from its follicle in the lamella or not, this cell type will be categorized as **oh**. The **zr** is **pink, thick and striated**, and the oocyte is filled entirely with **homogeneous vitellus (turquoise blue color)**.



Average size

ho : 822.38μm (±62.92μm)

zr : 5.00μm (±0.82μm)

Figure 22 : Hydrated oocyte (**oh**) that has not been discharged, still encased within its theca (**T**), with a homogeneous vitellus (**vi**) and a pink and striated *zona radiata* (**zr**)

Post-Ovulatory Follicle (POF)

A Post-Ovulatory Follicle (**POF**) may show signs of lysis, with the presence of macrophage cells (**mc**) inside their cavity. A **POF** indicates that a hydrated oocyte (**oh**) has been discharged into the lumen. A **POF** is composed of all the somatic tissues of the follicle (theca (**T**) and follicular cells (**fc**) left behind after the mature oocyte (**oh**) has been discharged into the lumen. Their green dye is identical to that of connective tissue (**ct**). **POF** vary in size and shape and are essentially empty sockets that have receded onto themselves.

Identification : A **POF** is a sack of somatic tissue that may be identified by the presence of macrophage cells (**mc**) inside its cavity. Macrophage cells are very small, gray tinged, and are often found clustered together. A **POF** will vary greatly in size and shape and can easily be mistaken with connective tissue (**ct**).

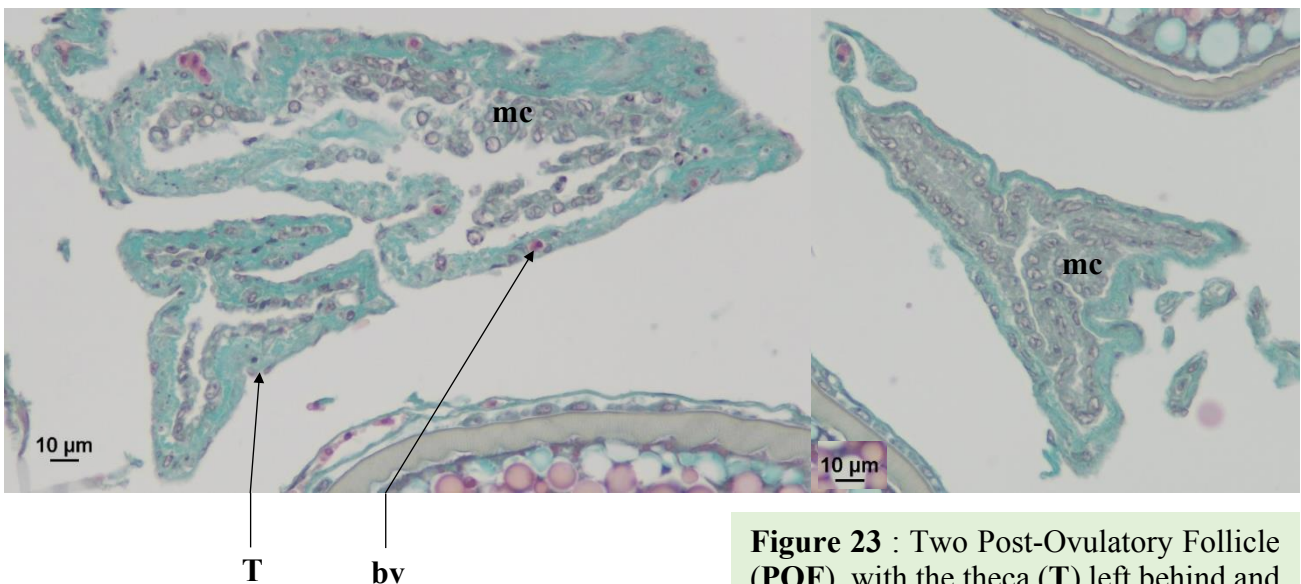


Figure 23 : Two Post-Ovulatory Follicle (**POF**), with the theca (**T**) left behind and blood vessels (**bv**). Macrophage cells (**mc**) are present in the **POF**'s cavity

Atresia (aoA & aoB) and Lysis (L)

Torres-Martinez *et al.* (2017) define atresia as the degeneration, reabsorption, or even ablation, of ovarian follicles. In general, the first sign of atresia is the degeneration of the germinal vesicle of the oocyte, followed by the fragmentation of the *zona radiata* (**zr**) that will take an irregular appearance. This will lead to an hypertrophy of the follicular cells. There can be cell differentiations of the follicular cells (**fc**) into phagocytes and/or macrophages.

In this study, we will define two types of atresia. Oocytes in early atresia (**aoA**) and oocytes in late atresia (**aoB**). **aoA** are all germinal cells in lysis, from the oogonium (**og**) stage until the **undischarged** hydrated oocyte (**oh**) stage. They will always be encased in somatic cells (follicular cells (**fc**) and/or theca (**T**)). **aoB** are all hydrated oocytes in lysis that have been **discharged** and are thus not encased in somatic cells anymore. Since an **aoB** is a cellular structure in lysis in the middle of the **lumen**, their shapes will often be warped, scattered and surrounded by lysis (**L**).

Identification : An **aoA** is a **follicle in lysis**. This means that the **oocyte is still encased inside a theca, within the ovarian lamella**.

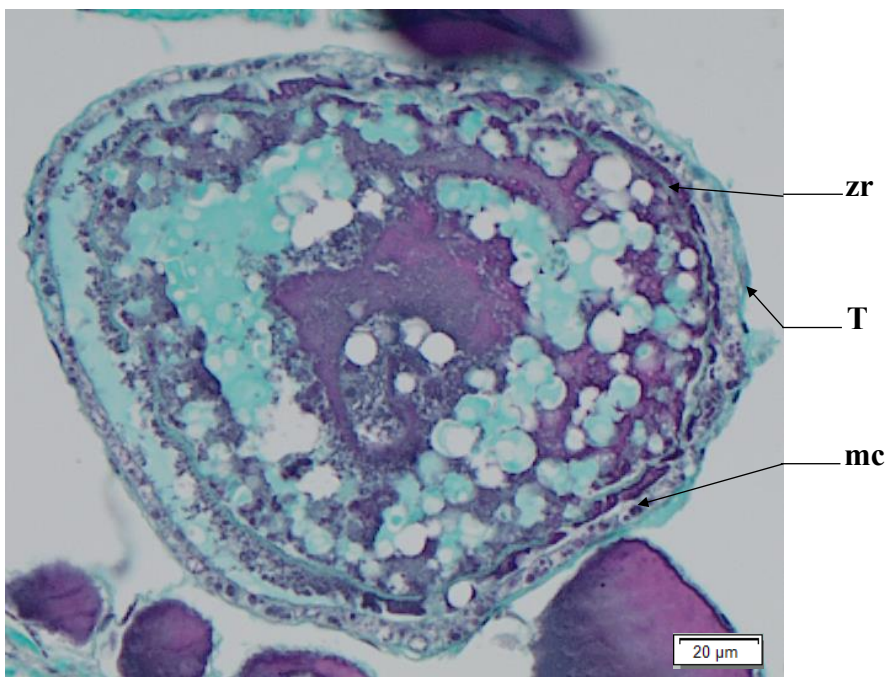


Figure 24 : Oocyte in early atresia (**aoA**). The oocyte has not been discharged into the **lumen**, and the follicle is still encased by its theca (**T**). the *zona radiata* (**zr**) is distorted and macrophage cells (**mc**) can be seen between the **zr** and **T**

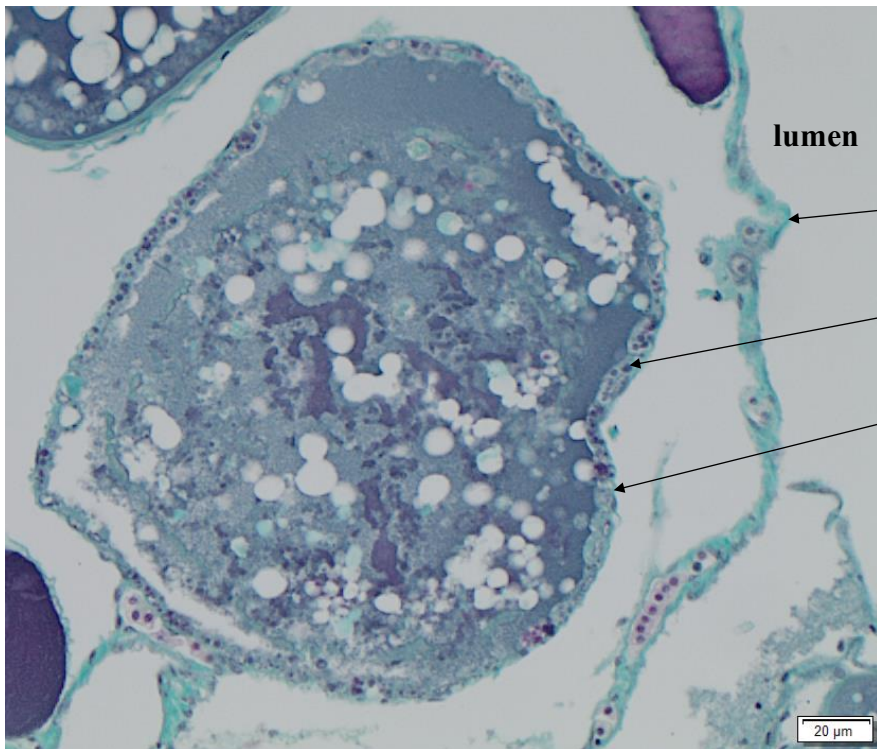


Figure 25 : Presence of macrophages (mc) under the theca (T) of an oaA still inside the connective tissue (ct) of the ovarian lamella

Identification : An oaB is a discharged follicle in lysis. This means that the oocyte is in the lumen without a theca and is undergoing lysis. The mature follicle may show fragmentation of its zona radiata (zr) that will take an irregular appearance. Possible presence of macrophage cells lysis.

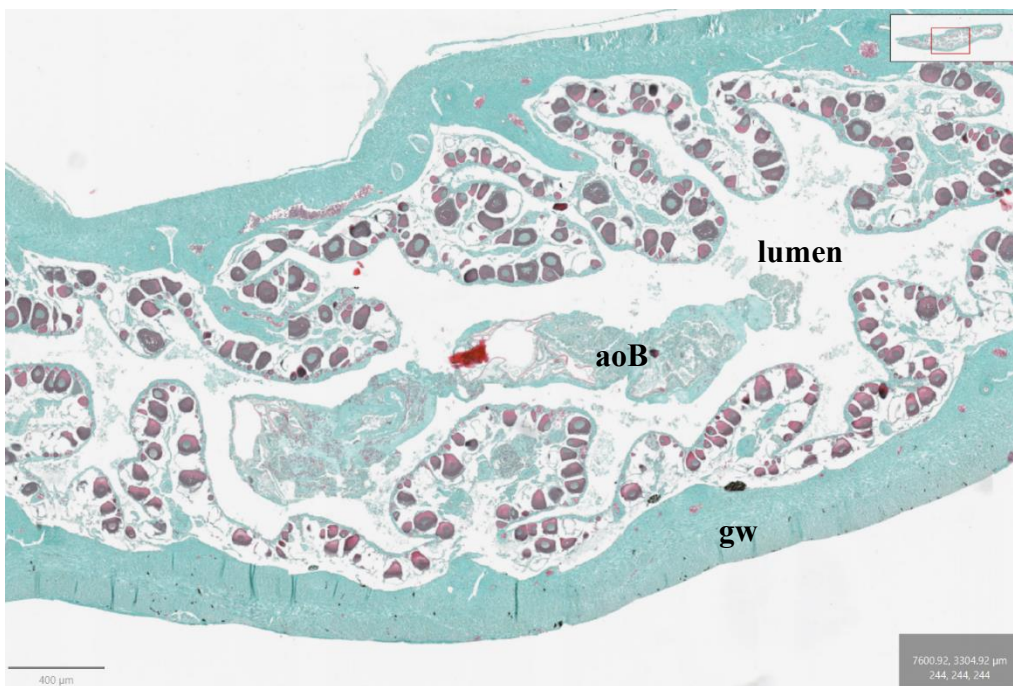


Figure 26 : aoB is a hydrated oocyte in lysis, no longer encased in a theca and is in the lumen of the ovary

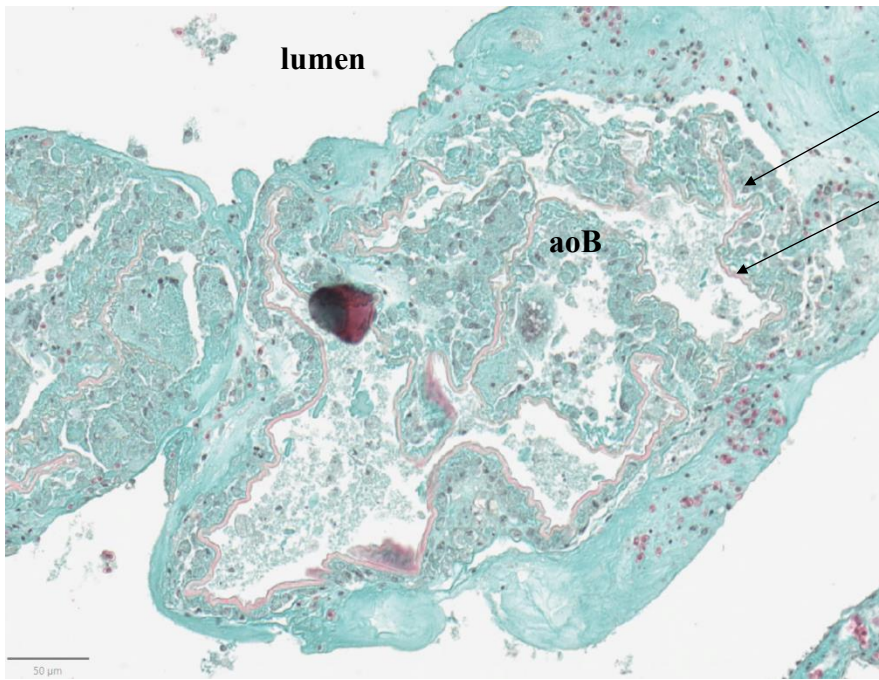


Figure 26 : aoB is a hydrated oocyte in lysis surrounded by macrophage cells (**mc**) and is in the **lumen** of the ovary. No longer encased in a theca, the **zr** is still present

Identification : Lysis can be difficult to identify, especially with the presence of atresia. They can be found **anywhere inside the gonad, at any maturity phase**. This **cluster of cells in lysis** can contain macrophages, are of **different shapes and sizes**, and do **not possess a theca and/or zona radiata**

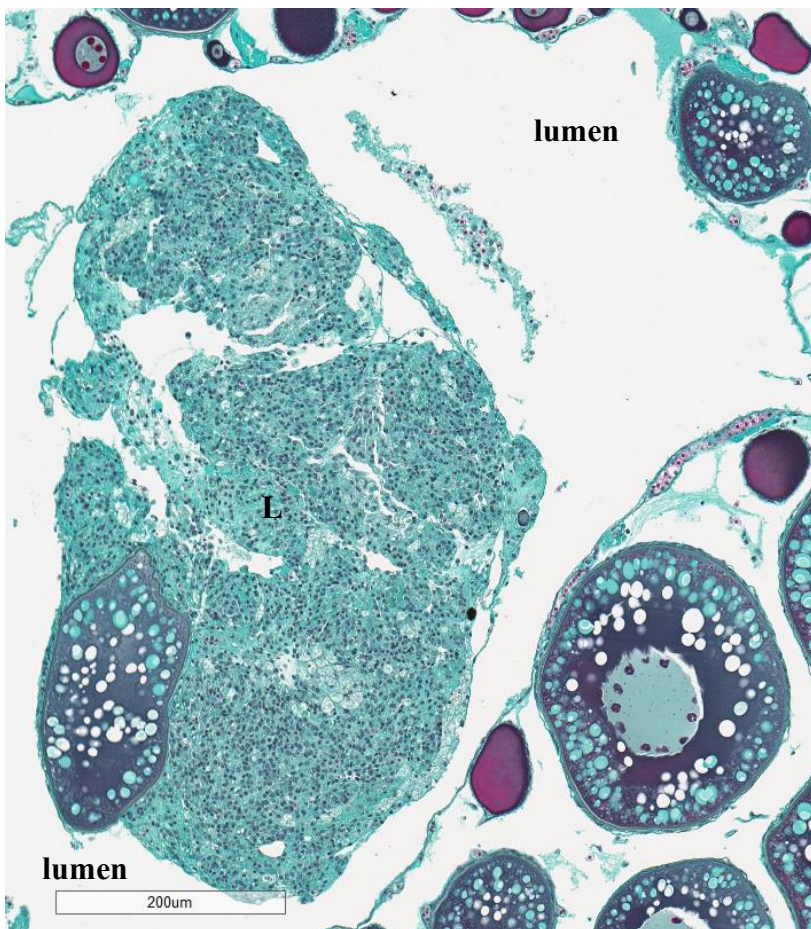


Figure 27 : Lysis (L) in the **lumen**

Connective tissue (ct) & Gonadal wall (gw)

The connective tissue (**ct**) links all of the ovarian structures together to form the ovarian lamellas. Follicles can be found inside the ovarian lamellas, encased in **ct**.

Connective tissue (**ct**) is made of green-colored cells, just like the cells that make up the gonad wall (**gw**). Gonad wall cells are muscular tissue while **ct** is not. Be wary not to mix the both up! Even if a sampling point falls on a very small piece of **ct** in the middle of a wide expanse of intercellular space (**Is**), this sampling point will be classified under **ct**.

The gonad wall (**gw**) will have the same green tint as the **ct**. Muscle bundles and blood vessels (**bv**) can be found in the **gw**. If a sampling point falls on muscular tissue within the **gw**, then the sampling point will be put into the **gw** category. On the other hand, if a sampling point within the **gw** falls on a blood vessel (**bv**), then this structure will be classified under **bv**.

The boundary of the **gw** starts from the outer most cell layer of the gonad and ends at the inner most cell layer of the gonad wall (**gw**), just before entering into the ovarian lamellas. If the **gw** has been stretched, ripped or spread, but the sampling point lands between the inner and outer most cell layers before the ovarian lamellas, then the sampling point will be classified under the **gw** category. Do not hesitate to unzoom in order to obtain a more general view of where the sampling point is in the gonad. This will allow the reader a better view of where the **gw** ends and the **ct** starts.

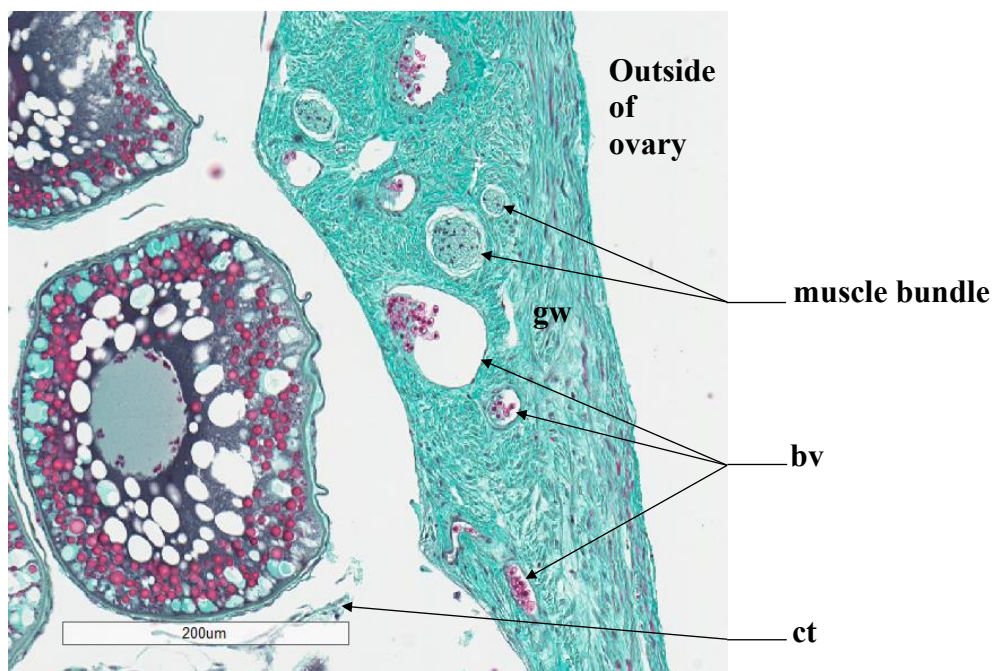


Figure 28 : Cross section of a megrim ovary with its gonad wall (**gw**). The ovarian lamellas are held together by connective tissue (**ct**), delimiting the **lumen** and the outside of the ovary. Blood vessels (**bv**) and **muscle bundles** can be seen

Blood vessel (bv)

Blood vessels (**bv**) are numerous and of variable diameter, with a size that can vary from that of a single cell to over 100µm.

Found within the theca (**T**), inside germinal epithelium or the gonad wall (**gw**), blood vessels (**bv**) are identifiable by the presence of blood cells (small red cells with a darker nucleus). If a sampling point falls in the « white zone » inside a cavity containing blood cells, this sampling point will be classified under the **bv** category.

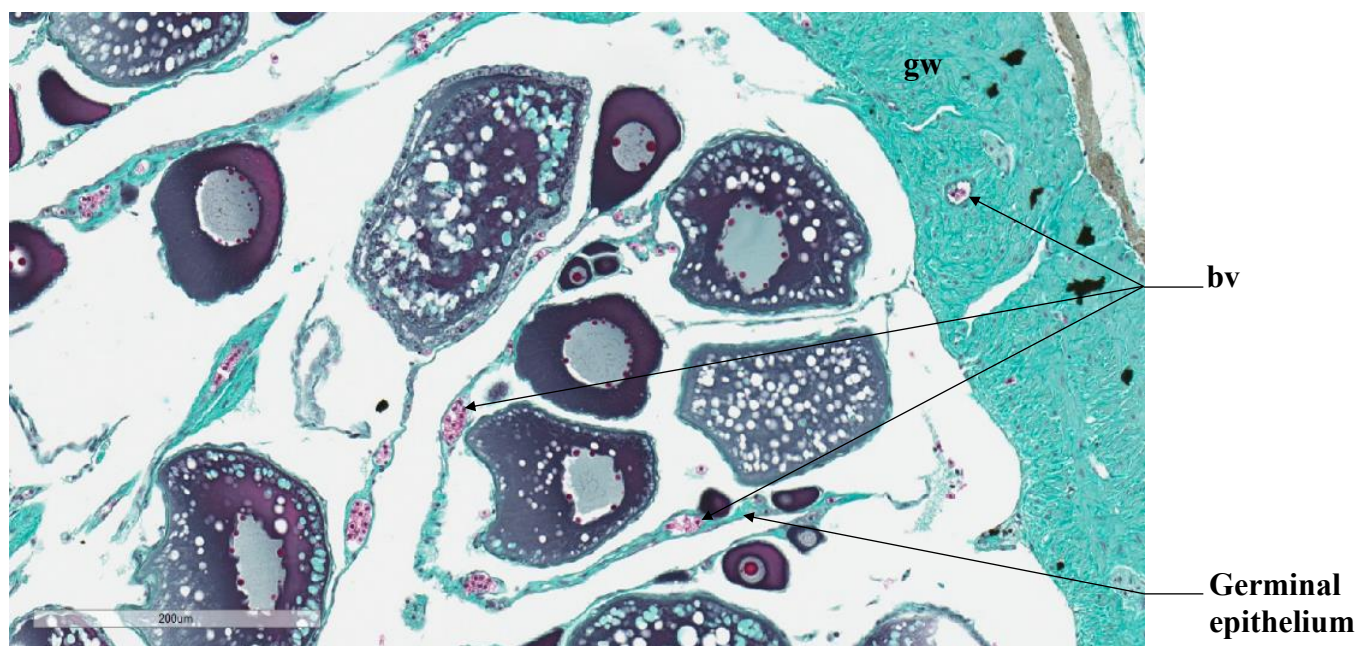


Figure 29 : Presence of blood vessels (**bv**) in the **germinal epithelium**, as well as in the gonadal wall (**gw**).

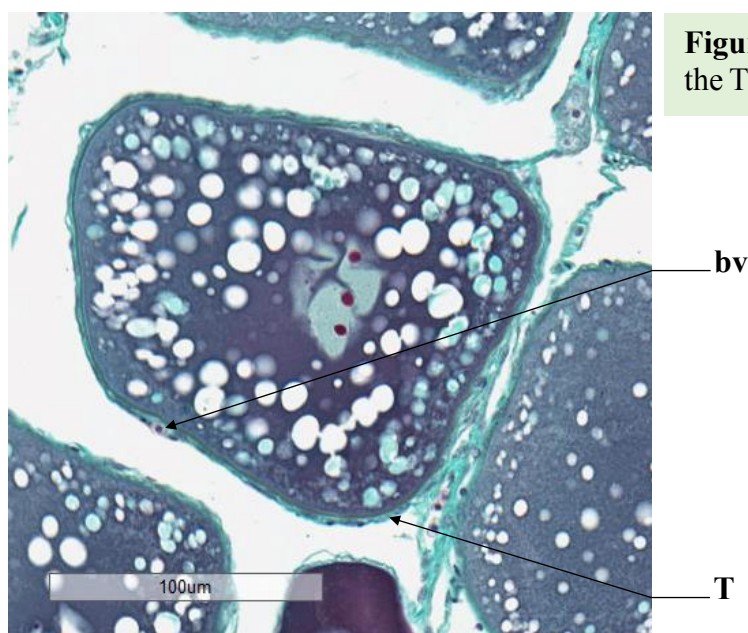


Figure 30 : Presence of a blood vessel (**bv**) in the Theca (**T**) of an cortical alveoli oocyte (**cao**)

Bibliography

Anderson, E., 1969. Oocyte-follicle Cell Differentiation in Two Species of Amphineurans (Mollusca), *Mopalia mucosa* and *Chaetopleura apiculata*. J. Morphol. 129, 89-126.

Anderson, E., 1968. Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in the Pipefish, *Syngnathus fuscus*, and the Killifish, *Fundulus heteroclitus*. J. Morphol. 125, 23-60.

Aragón, L., Aranda, G., Santos, A., Medina, A., 2010. Quantification of ovarian follicles in bluefin tuna *Thunnus thynnus* by two stereological methods. J. Fish Biol. 77, 719-730.

Brown-Peterson, N.J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B.J., Lowerre-Barbieri, S.K., 2011. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. Mar. Coast. Fish. 3, 52-70.

Domínguez-Castanedo, O., Uribe, M.C., Rosales-Torres, A.M., 2016. Morphological development of the structures related to annualism in the ovarian follicle of the killifish *Millerichthys robustus* (Costa,1995) (Teleostei: Cyprinodontiformes). J. Morphol. 277, 1219-1230.

Gabe, M., 1968. Techniques Histologiques, 2ème ed. Masson et C., Paris.

ICES, 2008. Report of the Workshop on Maturity Ogive Estimation for Stock Assessment (WKMOG), 3-6 June 2008, Lisbon, Portugal. ICES CM2008/ACOM:33. 72 pp.

ICES, 2010. Report of the ICES/HELCOM Workshop on Flatfish in the Baltic Sea (WKFLABA), 8-11 November 2010, Öregrund, Sweden. ICES CM 2010/ACOM:68. 85pp.

ICES, 2014. Report of the Workshop for maturity staging chairs (WKMATCH), 11-15 June 2012, Split, Croatia. ICES CM 2012/ACOM:58. 57 pp.

ICES, 2018. Report of the Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF), 30 April - 4 May 2018, ICES Headquarters, Copenhagen, Denmark. ICES CM/EOSG: 38. 75 pp.

ICES, 2019. Working Group on Biological Parameters (WGBIOP), 7-10 October 2019, Lisbon, Portugal. ICES Scientific Reports. 1:85. 93 pp.

Lowerre-Barbieri, S.K., Brown-Peterson, N.J., Murua, H., Tomkiewicz, J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., 2011. Emerging Issues and Methodological Advances in Fisheries Reproductive Biology. Mar. Coast. Fish. 3, 32-51

Robson, S.M., 2004. Age, growth, reproductive biology and population dynamics of the common megrim *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792) from off the west coast of Ireland. Unpublished thesis (Doctor of Philosophy in Fisheries Biology), Galway-Mayo Institute of Technology.

Sauger, C., Quinquis, J., Dubroca, L., Parrad, S., Kellner, K., Heude-Berthelin, C., 2019. Sample collection protocol for the extraction of female gonads in the megrim (*Lepidorhombus spp.*) for maturity staging through histology. IFREMER, <https://doi.org/10.13155/70724>

Sauger, C., Dubroca, L., Villain-Naud, N., Kellner, K., Heude-Berthelin, C., Elie, N., 2020. Protocol for the determination of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the megrim, *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792). IFREMER

Torres-Martínez, A., Hernández-Franyutti, A., Uribe, M.C., Contreras-Sánchez, W.M., 2017. Ovarian structure and oogenesis of the extremophile viviparous teleost *Poecilia mexicana* (Poeciliidae) from an active sulfur spring cave in Southern Mexico. *J. Morphol.*, Wiley Periodicals 278, 1667-1681.

Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish Biol. Fish.*, Chapman & Hall 6, 287-318.



Publication 7

Lexique ovogenèse de *Lepidorhombus boscii*

Citation : Heude-Berthelin, C., Kellner, K., Sauger, C. (2023) «Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the four spot-megrim, *Lepidorhombus boscii* (Walbaum, 1792)». DOI : <https://doi.org/10.13155/74844>

Résumé : Lexique décrivant les différentes cellules de la lignée germinale qui peuvent être retrouvées dans les ovaires de la cardine à quatre taches (*Lepidorhombus boscii*). Seuls les ovogonies (**og**), les ovocytes primaires (**po1** et **po2**), les ovocytes à alvéoles corticales (**cao**) et les ovocytes en début de vitéllogénèse (**vtg**) ont pu être décrits lors de ce travail. Ce document est le référentiel pour l'identification des cellules de la lignée germinale lors des lectures stéréologiques des lames ovariennes de *Lepidorhombus boscii*. Lexique en anglais disponible en accès libre sur **Archimer**.

Contribution : Création, conception et rédaction du document avec prise des photos et mesures des cellules. Mises à jour et publication des différentes versions.

Lexicon of histological structures found in the ovaries
and during the oogenesis of the four-spot megrim,
Lepidorhombus boscii (Risso, 1810)



HEUDE-BERTHELIN Clothilde
KELLNER Kristell
SAUGER Carine

April 2023

Cover photo: Picture of a female four-spot megrim (*Lepidorhombus boscii*). Personal collection. C. Sauger©

Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the four-spot megrim, *Lepidorhombus boscii* (Risso, 1810)

The digital version of this document is available on the Archimer Web site.

The digital version of the reading protocol that accompanies this document is available on the Archimer Web site.

Version	Date	Comments
1.0	March 2020	Conception of the document
1.1	April 2020	First review
1.2	June 2020	Alcian blue review
2.0	April 2023	Minor corrections + Summary sheets

Summary

Abbreviations.....	1
Introduction.....	2
Overall ovarian organization.....	5
Decision Tree.....	7
Follicle Summary Sheet.....	8
Oogonium (og).....	9
Primary oocyte stage 1 (po1).....	10
Primary oocyte stage 2 (po2).....	10
Cortical alveoli oocytes (cao).....	12
Oocyte in early vitellogenesis (vtg1).....	14
Oocyte in vitellogenesis stage 2 (vtg2).....	16
Oocyte in vitellogenesis stage 3 (vtg3).....	17
Oocyte in hydration (oih).....	18
Hydrated oocyte (ho).....	19
Post-Ovulatory Follicle (POF).....	20
Atresia (aoA & aoB) and Lysis (L).....	21
Connective tissue (ct) & Gonadal wall (gw).....	24
Blood vessel (bv).....	25
Bibliography.....	26

Abbreviations

aoA : undischarged atretic oocyte
aoB : discharged atretic oocyte
bv : blood vessel
CA : cortical alveoli
cao : cortical alveoli oocyte
chr : condensed chromosome
chrom : chromatin
ct : connective tissue
E : unnatural emptiness (from the section's cut)
fc : follicular cell
gw : gonadal wall
ho : hydrated oocyte
ic : inner cytoplasm
Is : Intercellular space
L : lysis
ld : lipid droplet
mc : macrophage cell
N : nucleus
NC : Nucleo-Cytoplasmic
nl : nucleolus
oc : outer cytoplasm
og : oogonium
oih : oocyte in hydration
po1 : primary oocyte stage 1
po2 : primary oocyte stage 2
POF : Post-Ovulatory Follicle
SI : sexually immature
SM : sexually mature
som : somatic cell
T : theca
U : undetermined structure
vd : vitellus droplet
vi : vitellus
vtg1 : oocyte in stage 1 of vitellogenesis
vtg2 : oocyte in stage 2 of vitellogenesis
vtg3 : oocyte in stage 3 of vitellogenesis
zr : *zona radiata*



Introduction

During this study, the terminology used was that of Brown-Peterson *et al.* (2011), following the criteria set by the working groups of the International Council for the Exploration of the Sea (ICES) that described the different maturity phases for European stock species (ICES 2008, 2010, 2012, 2018, 2019).

For the description of the female germinal cells that will become gametes, the terms **oogonia** (before meiosis) or **oocyte** (meiosis has begun) will be used. An oocyte is characterized by an **ooplasm** encased in an **olemma** (plasmic membrane) (Tyler and Sumpter, 1996). A **zona radiata** will also be present once the cell becomes dependent on follicle-stimulating hormone (FSH).

The term **follicle** will be used to designate an oocyte encased in somatic cells: **follicular cells** and **theca cells** (Tyler and Sumpter, 1996).

For the description of geminal cells development, the term **stage** will be used to designate the different gametogenesis stages (Brown-Peterson *et al.*, 2011) :

- Oogonia
- Primary growth oocytes
- Secondary growth oocytes
- Oocyte maturation
- Ovulation stage

The sexual maturity cycle (*Figure 1*) is split into two **states**. The Sexually Immature (**SI**) state and the Sexually Mature (**SM**) state. The terminology **phase** will be used for the gonadal development. The reproduction cycle of fish is divided into seven **phases** (Brown-Peterson *et al.*, 2011; ICES, 2012 ; 2018).

- Immature
- Developing
- Spawning
- Regressing
- Regenerating
- Omitted spawning
- Abnormal

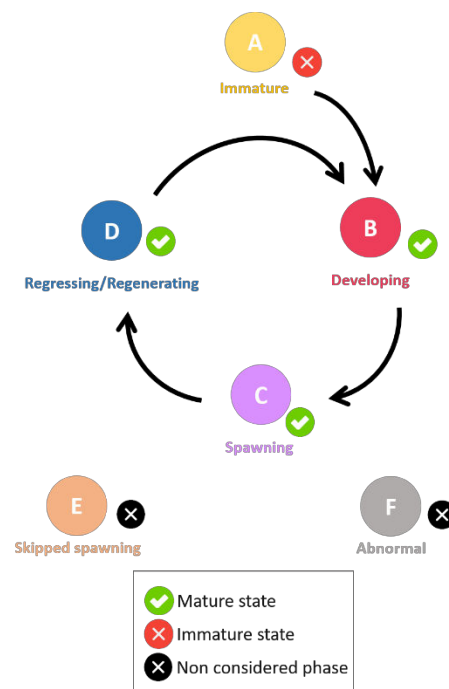


Figure 1 : Different phases found in the teleost maturation cycle, from the ICES (2018). The phases being: Immature (A), Developing (B), Spawning (C), Regressing/Regenerating (D), Skipped spawning (E) and Abnormal (F)

Sub-divisions/Sub-phases (Ba, Bb, Ca, Cb, Da, Db) should be used for specific particularities, meaning that their use is optional and must be evaluated for each species (ICES, 2012).

Table 1 : Macroscopic and microscopic descriptions of the phases in the reproductive cycle of female fish, from Brown-Peterson *et al.* (2011). Timing within each phase is species dependent. Some criteria listed for phases may vary depending on species, reproductive strategy, or water temperature. Subphases that apply to all fishes are listed; additional subphases can be defined by individual researchers. With CA = cortical alveoli, GVBD = germinal vesicle breakdown, GVM = germinal vesicle migration, OM = oocyte maturation, PG = primary growth, POF = post-ovulatory follicle complex, Vtg1 = primary vitellogenic, Vtg2 = secondary vitellogenic and Vtg3 = tertiary vitellogenic

Phase	Previous terminology	Macroscopic and histological features
Immature (never spawned)	Immature, virgin	Small ovaries, often clear, blood vessels indistinct. Only oogonia and PG oocytes present. No atresia or muscle bundles. Thin ovarian wall and little space between oocytes.
Developing (ovaries beginning to develop, but not ready to spawn)	Maturing, early developing, early maturation, mid-maturation, ripening, previtellogenic	Enlarging ovaries, blood vessels becoming more distinct. PG, CA, Vtg1, and Vtg2 oocytes present. No evidence of POFs or Vtg3 oocytes. Some atresia can be present. <i>Early developing subphase</i> : PG and CA oocytes only.
Spawning capable (fish are developmentally and physiologically able to spawn in this cycle)	Mature, late developing, late maturation, late ripening, total maturation, gravid, vitellogenic, ripe, partially spent, fully developed, prespawning, running ripe, final OM, spawning, gravid, ovulated	Large ovaries, blood vessels prominent. Individual oocytes visible macroscopically. Vtg3 oocytes present or POFs present in batch spawners. Atresia of vitellogenic and/or hydrated oocytes may be present. Early stages of OM can be present. <i>Actively spawning subphase</i> : oocytes undergoing late GVM, GVBD, hydration, or ovulation.
Regressing (cessation of spawning)	Spent, regression, postspawning, recovering	Flaccid ovaries, blood vessels prominent. Atresia (any stage) and POFs present. Some CA and/or vitellogenic (Vtg1, Vtg2) oocytes present.
Regenerating (sexually mature, reproductively inactive)	Resting, regressed, recovering, inactive	Small ovaries, blood vessels reduced but present. Only oogonia and PG oocytes present. Muscle bundles, enlarged blood vessels, thick ovarian wall and/or gamma/delta atresia or old, degenerating POFs may be present.

For the histological slides, fresh ovaries were placed in a Davidson solution before their inclusion in paraffin. 3 µm thick sections were cut using a microtome (HM330) and were either trichrome stained with a Prenant-Gabe (Gabe, 1968) solution or Alcian blue stained.

The histological pictures found in this lexicon were taken with a Nikon Eclipse 80i microscope using the NIS-Elements D (v. 5.02.03) software. Mean cell diameters and mean *zona radiata* widths were taken with an Olympus AX70 microscope using the Olympus CellSens© software, on a minimum of 20 oocytes found throughout multiple slides.

As seen in Table 1, different **phases** are correlated with the presence or absence of specific cell types. Following the terminologies and definitions of Brown-Peterson *et al.* (2011) and the ICES (2012; 2018). For the four-spot megrim (*Lepidorhombus boscii*), the different cell types described in this work will be shown in bold (**og**, **po1**, **po2**, **ldo**, **cao**, **vtg1**, **vtg2**, **oih**, **ho**, **POF**) while their matching *Figures* will be indicated in italic.

- Oogonium stage :
 - oogonium (**og**) (*Figure 6*)
- Primary growth oocytes :
 - Primary stage 1 oocyte (**po1**) (*Figures 7 to 9*)
 - Primary stage 2 oocyte (**po2**) (*Figures 10 & 11*)
- Secondary growth oocytes :
 - cortical alveoli oocytes with lipid droplets (**cao**) (*Figures 12 & 13*)
 - vitellogenic oocytes
 - subphase vtg1 : **vtg1** (*Figures 14 to 16*)
 - subphase vtg2 : **vtg2** (*NA*)
- Oocyte maturation :
 - nucleus migration :
 - germinal vesicle breakdown : oocyte enters metaphase I of meiosis
 - vitellus coalescence : oocyte in hydration (**oih**) (*NA*)
 - hydration : hydrated oocytes (**ho**) (*NA*)
- Ovulation stage : discharge of the hydrated oocytes into the ovary's lumen, leaving behind a post-ovulatory follicle (**POF**) (*NA*)

Determination key for the germinal cells of female *Lepidorhombus boscii*

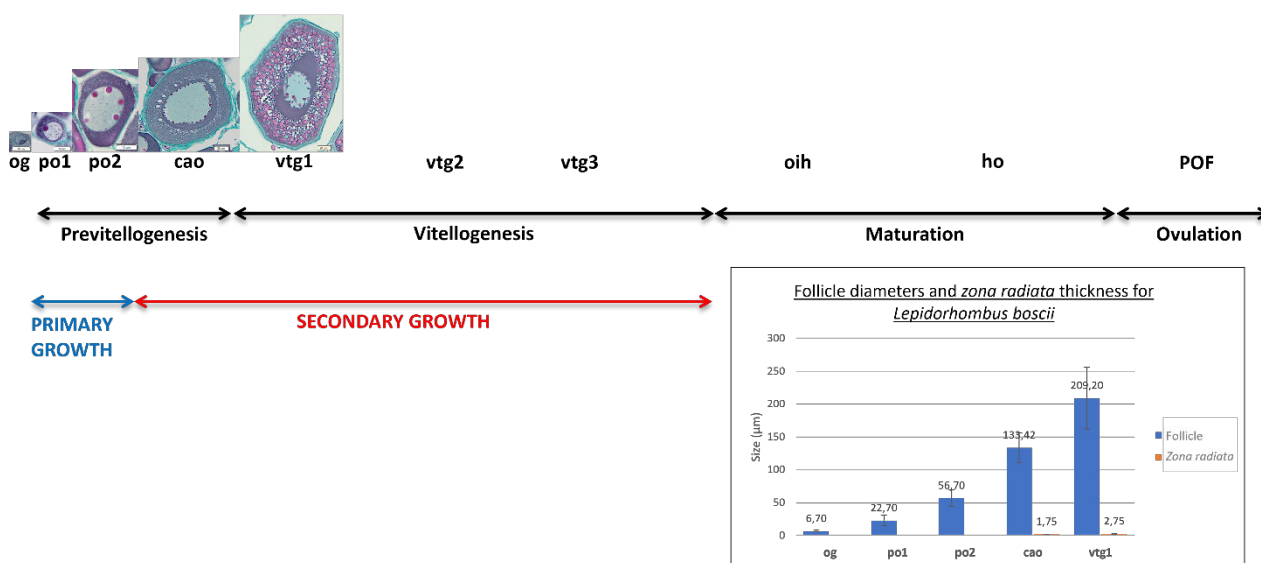


Figure 2 : Determination key of the different female germinal cells that can be found in the ovaries of *Lepidorhombus boscii* at different oogenesis stages. With average oogonium and oocyte diameters (µm ± standard deviation), and *zona radiata* widths (µm ± standard deviation)

Overall ovarian organization

The four-spot megrim is a **total spawner** species, meaning that the females will release all of their oocytes as a unique event during the breeding season.



Figure 3 : Dissected four-spot megrim, *Lepidorhombus boscii*, with the dorsal ovary uncovered

dorsal ovary

Criteria like the gonad wall (**gw**) thickness, connective tissue (**ct**) quantity, gonad vascularization (**bv**) or the surface area of the **lumen**, will depend on the maturity phase the fish is in. The histological cross sections will visually be quite different, with oocytes at various stages of gametogenesis.

Each gonad is organized concentrically (*Figure 4* and *Figure 5*), with the ovarian lamellas delimited by the germinal epithelium. The germinal cells (oogonia and oocytes) are found within these ovarian lamellas, inside follicles, at different stages of ovogenesis. The connective tissue (**ct**) will hold the germinal cells together, and the gonad wall (**gw**) can vary in thickness. Finally, the **lumen** is the naturally empty space found between the germinal epithelium lamellas inside the ovary.

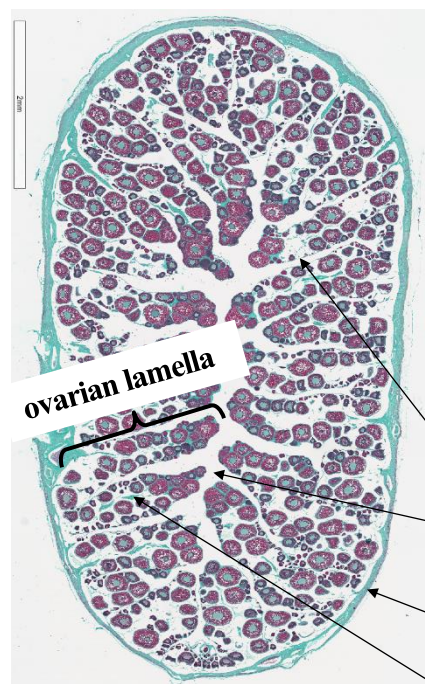


Figure 4 : Overall organization of a cross section of a four-spot megrim ovary, with the gonad wall (**gw**), the **lumen**, and a folded **germinal epithelium**, that makes the **ovarian lamella**, filled with oocytes held together by connective tissue (**ct**)

germinal epithelium

lumen

gw

ct

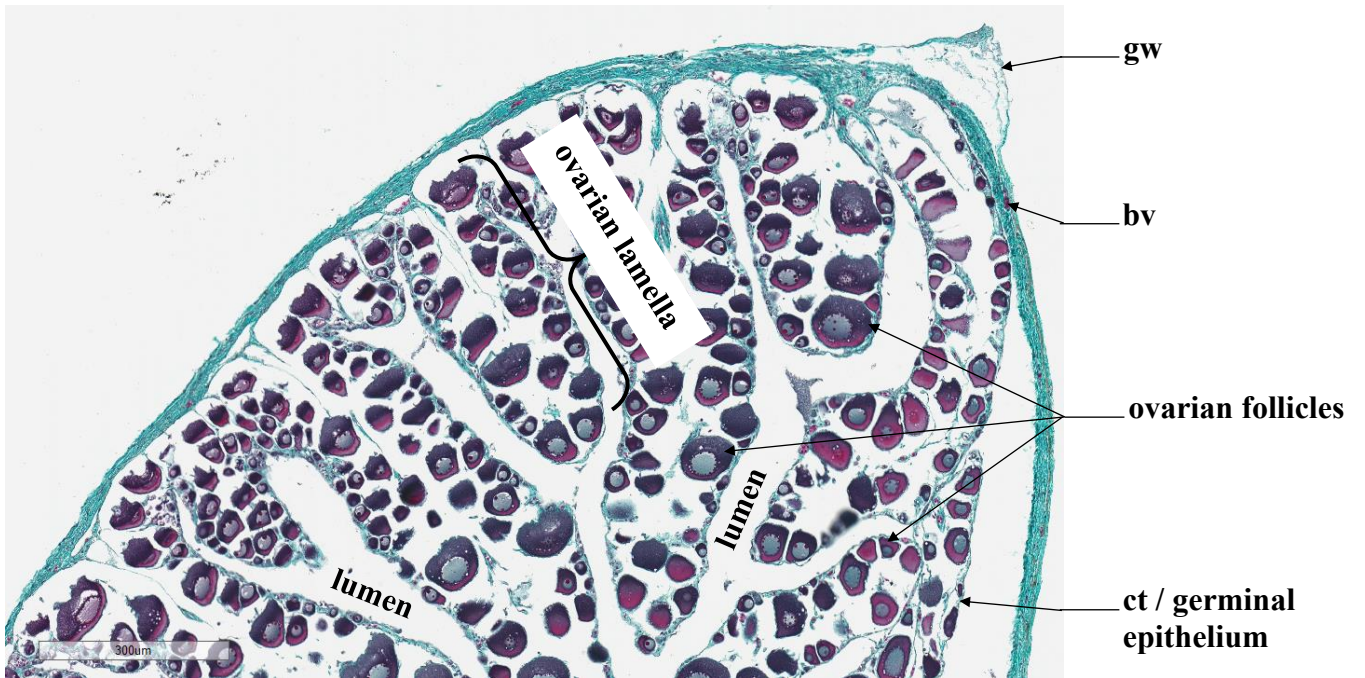
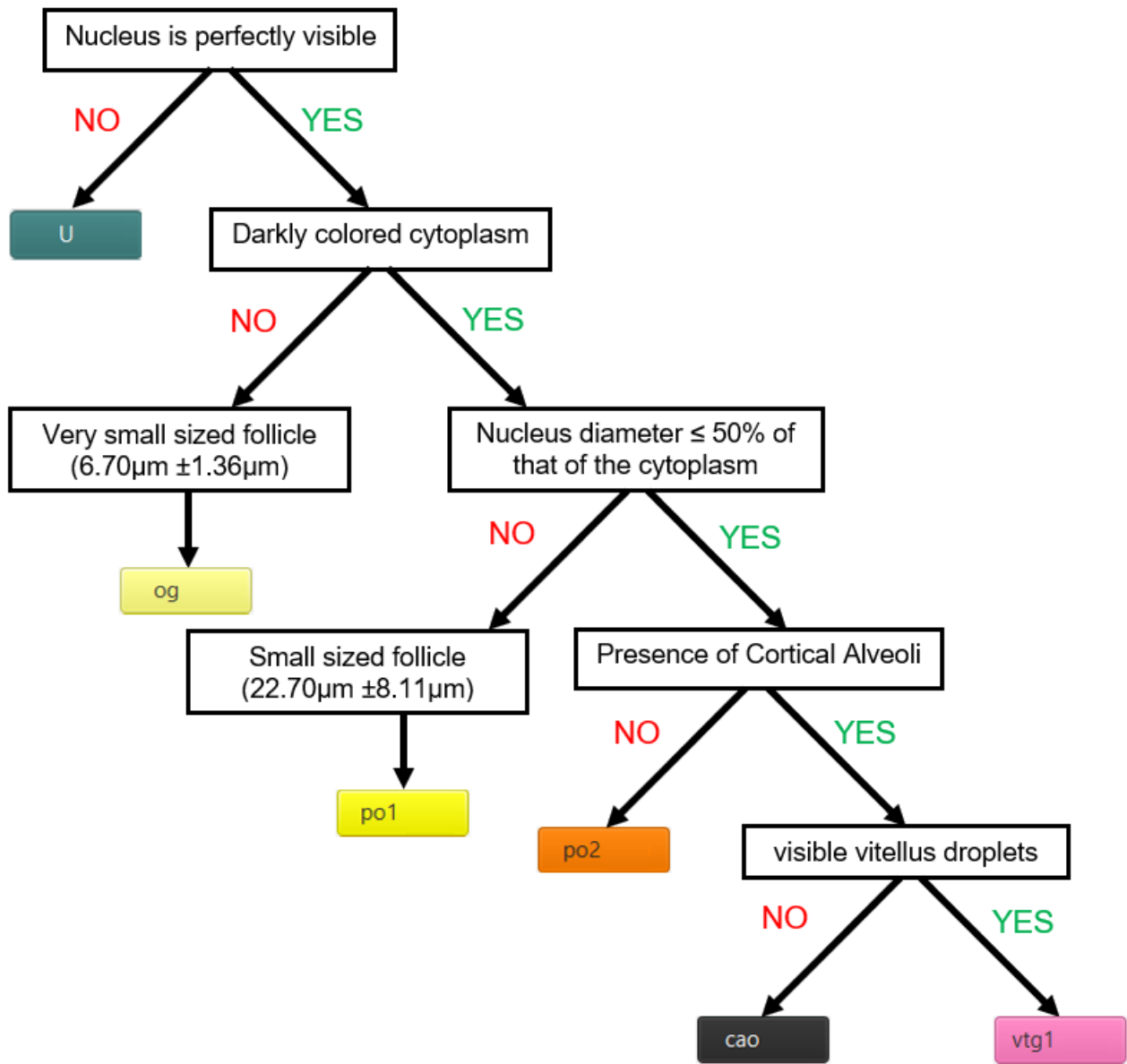


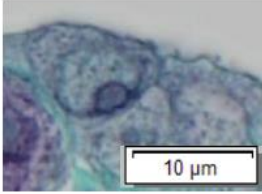
Figure 5 : Partial view of a four-spot megrim ovary cross section, with the gonad wall (gw), blood vessels (bv), the **lumen**, and oocytes in **follicles** held together by connective tissue (ct), organized inside **ovarian lamellas**

Decision Tree



Follicle Summary Sheet

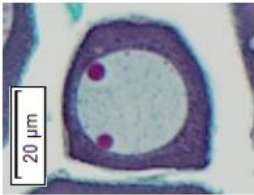
og



6.70µm (±1.36µm)

Light gray nucleus taking most of the space, barely visible light-colored cytoplasm with chromatin. Single nucleolus may be present

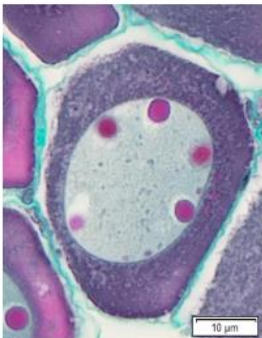
po1



22.70µm (±8.11µm)

Nucleus diameter >50% of the cytoplasm's. Nucleus is visible, smooth and round, one or two nucleoli can be present. Dark colored cytoplasm

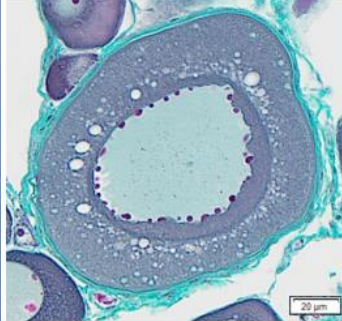
po2



56.70µm (±12.37µm)

Nucleus is visible, smooth and round. Many nucleoli can be present. Lipid droplets may be present. Dark colored cytoplasm

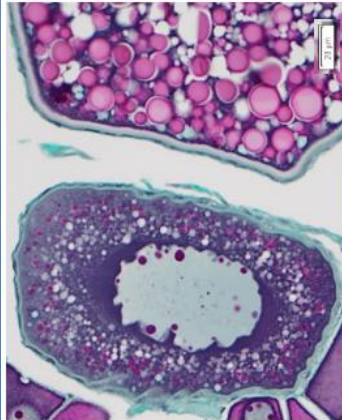
cao



133.42µm (±22.45µm)

Cortical alveoli near the outer periphery, green *zona radiata* (1.75µm±0.27µm), scalloped nucleus with multiple nucleoli, growing white lipid droplets in the cytoplasm

vtg1



209.20µm (±47.16µm)

First appearance of small pink vitellus droplets amongst the cortical alveoli, under the thin greenish *zona radiata* (2.75µm±0.69µm). Scalloped nucleus with multiple nucleoli. Enlarging lipid droplets and vitellus droplets around the nucleus.



Oogonium (og)

An oogonium (**og**) has a pale nucleus (**N**), due to low chromosome condensation, and a high nucleo-cytoplasmic (NC) ratio (very little cytoplasm). Chromatin clusters can be seen near the edges of the nucleus. Inside this nucleus, a single large nucleolus can generally be found. The cytoplasm (**c**) is light-colored (*Figure 6*). Oogonia stem from germinal cells through gonial mitosis. They can be found alone or in a germinal niche within the germinal epithelium, accompanied by somatic cells (**som**).

Identification : It is uncommon to fall on this very small sized cell. The **nucleus is light-gray and fully apparent** while the **cytoplasm is barely visible and very light-colored**. A **single** light-colored and smooth **nucleolus** can be present. The diameter of the nucleus of an oogonium is greater than the surface area of the cytoplasm (>50 %).

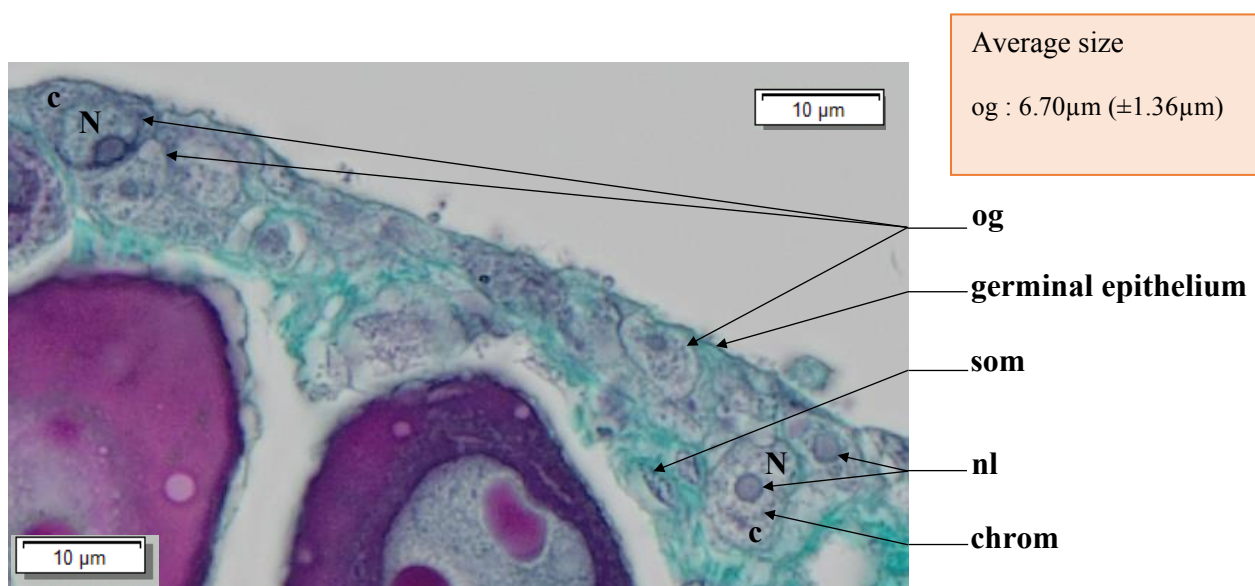


Figure 6 : Oogonia (**og**) and their apparent, decondensed, nucleus (**N**) with a single large nucleolus (**nl**) and clusters of chromatin (**chrom**). Light-colored cytoplasm (**c**). Presence of somatic cells (**som**)

Primary oocyte stage 1 (po1)

A primary oocyte stage 1 (**po1**) has a darker cytoplasm (**c**) compared to an oogonium (**og**), with a smaller NC ratio. The diameter of the cytoplasm is inferior or equal to 50 % of the nucleus' diameter. The nucleus (**N**) is spherical, smooth, with the possibility of a nucleolus to be present. As the cell grows in size, 2 or 3 nucleoli can be present, colored magenta from the trichrome stain.

Identification : This cell type is slightly bigger than an oogonium, but is still relatively small in size compared to the other cellular structures found inside the ovary. Falling on this follicle in stereology is still uncommon. The **nucleus must be fully visible, smooth**, and the **cytoplasm is darkly-colored**. The nucleus diameter of a **po1** is inferior or equal to 50 % of the cytoplasm's diameter, and can contain up to 4 nucleolus. If there is a hesitation between a **po1** and a **po2**, the cell size can be taken into consideration.

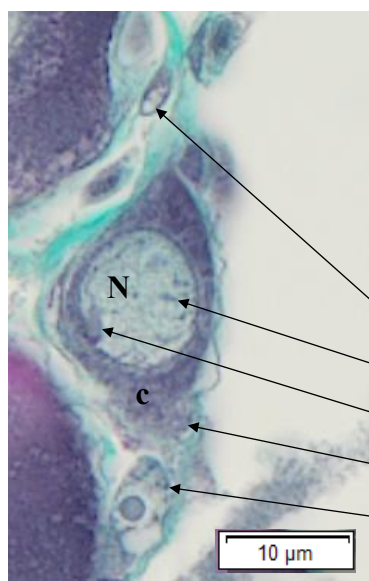


Figure 7 : Primary oocyte stage 1 (**po1**) with a spherical and smooth nucleus (**N**) and a single nucleolus (**nl**). The cytoplasm (**c**) is darker compared to that of an oogonium (**og**). Somatic cells (**som**) can be seen

Average size
po1 : 22.70µm (±8.11µm)

som
chrom
nl
po1
og

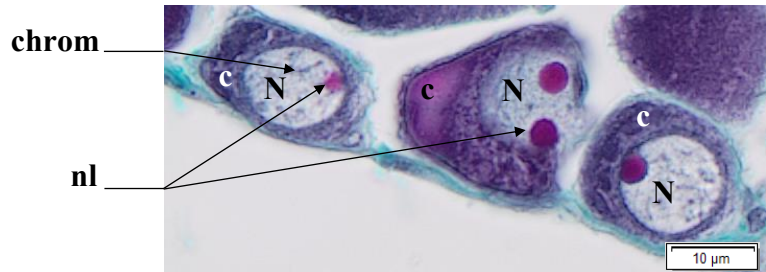


Figure 8 : Three premature stage 1 oocytes (**po1**) with spherical and smooth nucleus (**N**) containing 1 or 2 nucleoli (**nl**) and condensed chromosomes (**chrom**). The cytoplasm (**c**) is darker compared to that of an oogonium (**og**)

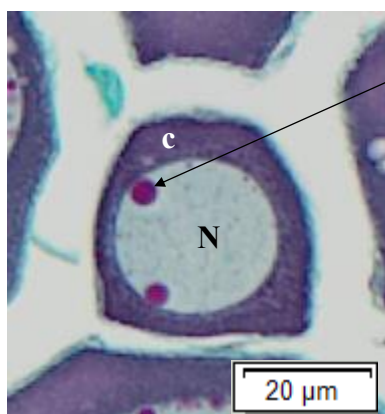


Figure 9 : Primary oocyte stage 1 (**po1**) with a spherical and smooth nucleus (**N**) with two nucleoli (**nl**) and a colored cytoplasm (**c**)



Primary oocyte stage 2 (po2)

Inside the cytoplasm (c) of a primary oocyte stage 2 (po2), lipid droplets (ld) (cf Figure 11) may be seen. It is also possible to see lampbrush chromosomes inside the nucleus, typically found in immature diplotene oocytes.

Identification : This ovarian follicle varies in size, between the po1 and cao stage. This cell has a **single cytoplasm**, with a **spherical and smooth nucleus** that shows **multiple nucleoli against the nuclear envelope**. Lipid droplets may be seen inside the cytoplasm.

Average size
po2 : 56.70µm (±12.37µm)

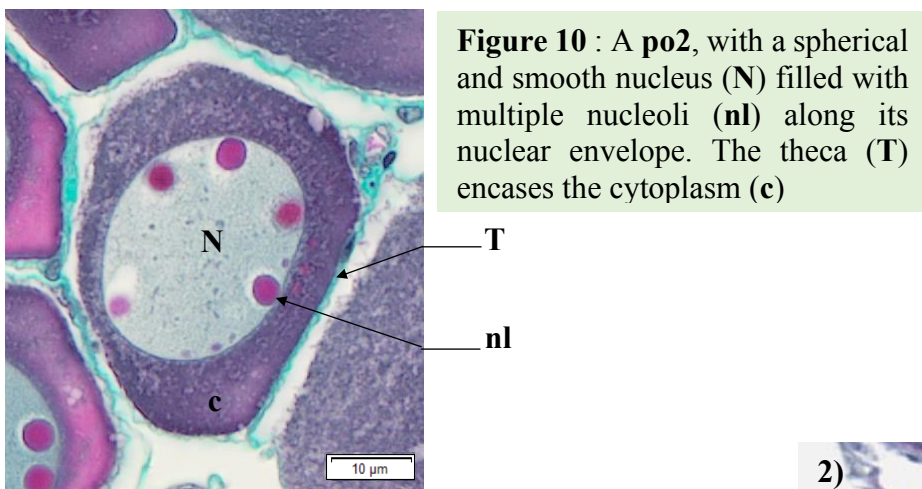


Figure 10 : A po2, with a spherical and smooth nucleus (N) filled with multiple nucleoli (nl) along its nuclear envelope. The theca (T) encases the cytoplasm (c)

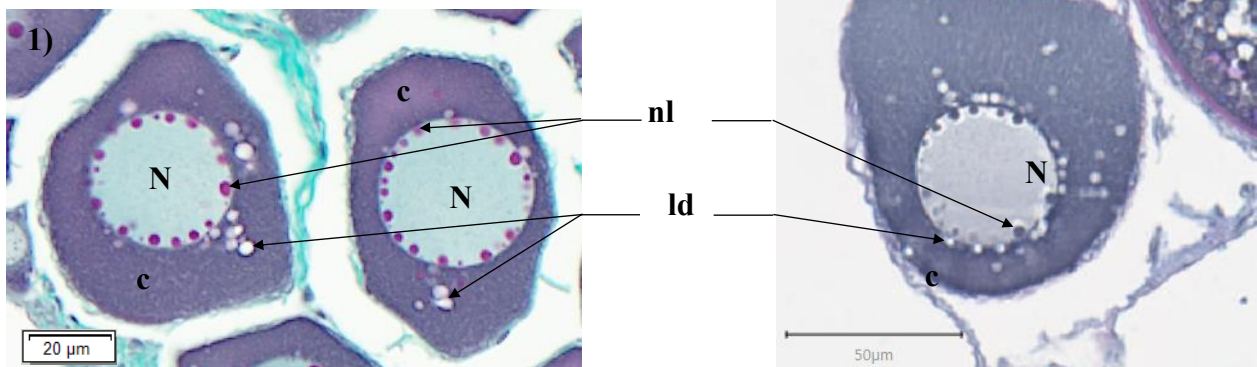


Figure 11 : Three po2, with a spherical and smooth nucleus (N) filled with multiple nucleoli (nl) along the inside of its nuclear envelope. Lipid droplets (ld) can be seen inside the cytoplasm (c). **1)** Trichrome stained ; **2)** Alcian blue stained po2 showing that the vesicles in the cytoplasm are unstained : do not contain acidic polysaccharides and probably consist in lipid droplets



Cortical alveoli oocytes (cao)

An oocyte with cortical alveoli (**cao**) is defined by : (1) a cytoplasm (**c**) divided in two areas : internal cytoplasm (**ic**) and external cytoplasm (**ec**) ; (2) cortical alveoli (**CA**) present in the external cytoplasm, that first appear under the follicular cell layer; (3) a nucleus (**N**) in the center of the cytoplasmic mass, with a slightly scalloped nuclear envelope and multiple nucleoli (**nl**) against the nuclear envelope. Sometimes, it is possible to see lampbrush chromosomes inside the nucleus, typically found in immature diplotene oocytes. Finally, the *zona radiata* (**zr**) will start developing between the cytoplasm and the follicular cells (**fc**) + theca (**T**). Lipid droplets (**ld**) are still present in the **ec**, and will grow in size as they are gathered against the **ic**.

The **CA** will appear in the outer periphery of the outer cytoplasm. The Alcian blue coloration, as well as the trichrome stain, allows us to differentiate them from lipid droplets. With the trichrome stain, the **CA** will take a mint color, while they will take a purple color with the Alcian blue stain (*cf* *Figure 12*), revealing the presence of acidic polysaccharides.

Identification : An oocyte with cortical alveoli is primarily defined by a **two-zoned cytoplasm** with the **presence of cortical alveoli in the external cytoplasm**. The **nucleus in the center of the follicle contains multiple nucleoli** along its scalloped nuclear envelope, and the **nuclear envelope will become scalloped as the cell approaches the vitellogenic stage**. It is possible to see condensed chromosomes (small irregular dark-gray lines inside the nucleus), as lipid droplets grow in size. Finally, around the oocyte, **the zona radiata will start to form**.

Average size
cao : 133.42 μ m (\pm 22.45 μ m)
zr : 1.75 μ m (\pm 0.27 μ m)

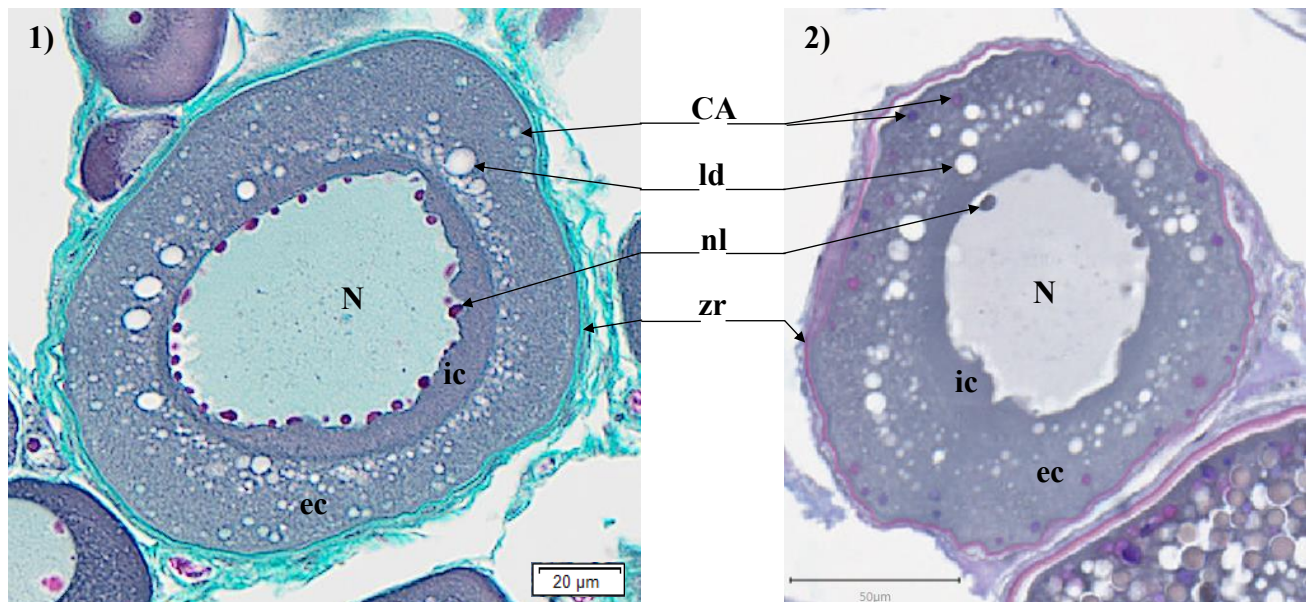


Figure 12 : Cortical alveoli oocyte (**cao**) with a scalloped nucleus (**N**) holding multiple nucleoli (**nl**). Cortical alveoli (**CA**) build-up inside the external cytoplasm (**ec**), against the *zona radiata* (**zr**). Lipid droplets (**ld**) can be seen on the inner periphery of the **ec**. **1)** Trichrome stained ; **2)** Alcian blue stained

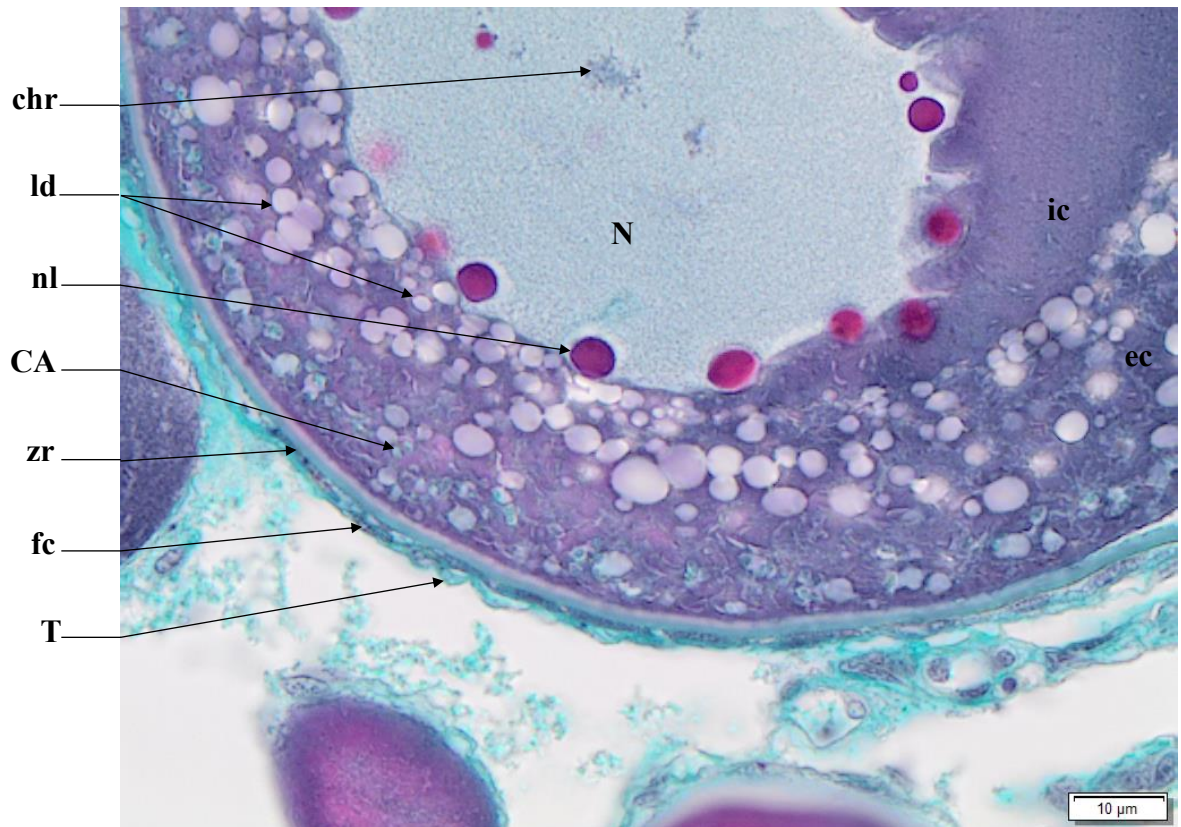


Figure 13 : Cell wall of an oocyte with cortical alveoli (**cao**). The nucleus (**N**) is scalloped, contains multiple nucleoli (**nl**) and condensed chromosomes (**chr**) can be seen. Lipid droplets (**ld**) build-up in the external cytoplasm (**ec**), against the internal cytoplasm (**ic**), while cortical alveoli (**CA**) form in the outer periphery of the **ec**. Beginning of the *zona radiata* (**zr**) growth, presence of follicular cells (**fc**) under the theca (**T**)

Oocyte in early vitellogenesis (vtg1)

An oocyte at the beginning of the vitellogenic stage (**vtg1**) is defined by the presence of vitellus droplets (**vd**), pink eosinophilic droplets, that first appear on the edge of the external cytoplasm (**ec**), under the *zona radiata* (**zr**). The nucleus (**N**) is still centered in the follicle, with multiple nucleoli (**nl**) along the scalloped nuclear envelope. The *zona radiata* (**zr**) is thin and green (not acidophilus).

As the cell matures, the vitellus droplets (**vd**), cortical alveoli (**CA**) and lipid droplets (**ld**) will grow in size and the internal cytoplasm (**ic**) will be pushed back towards the nucleus (**N**) (cf *Figure 16*).

Identification : This oocyte in early vitellogenesis is recognizable by the appearance of a **peripheral ring of pink vitellus droplets in the external cytoplasm**. At the **first appearance of a vitellus droplet**, the oocyte is considered to be in the **vtg1** stage. The **nucleus is still scalloped and centered inside the follicle** and the **vitellus droplets will run along the edge of the cell wall (under the *zona radiata*)**. Even if the nucleus is not visible, if the vitellus droplets are visible, this follicle should be placed in the **vtg1** category.

Average size

vtg1 : 209.20µm (±47.16µm)

zr : 2.75µm (±0.69µm)

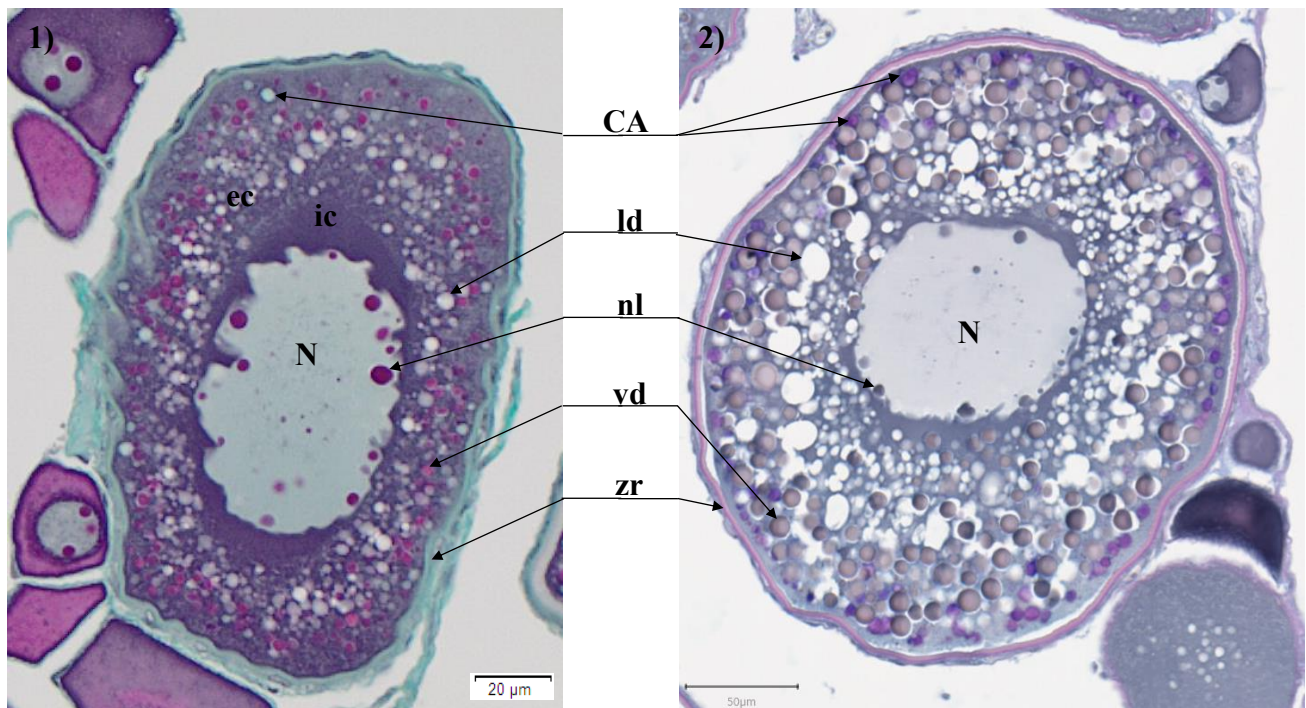


Figure 14 : Stage **vtg1** oocytes, with a scalloped nucleus (**N**) envelope containing multiple nucleoli (**nl**). Vitellus droplets (**vd**) will form on the edge of the external cytoplasm (**ec**). Cortical alveoli (**CA**) are amongst the **vd**, while the lipid droplets (**ld**) take up most of the space in the **ec**. The *zona radiata* (**zr**) is developing. **1**) Trichrome stained ; **2**) Alcian blue stained

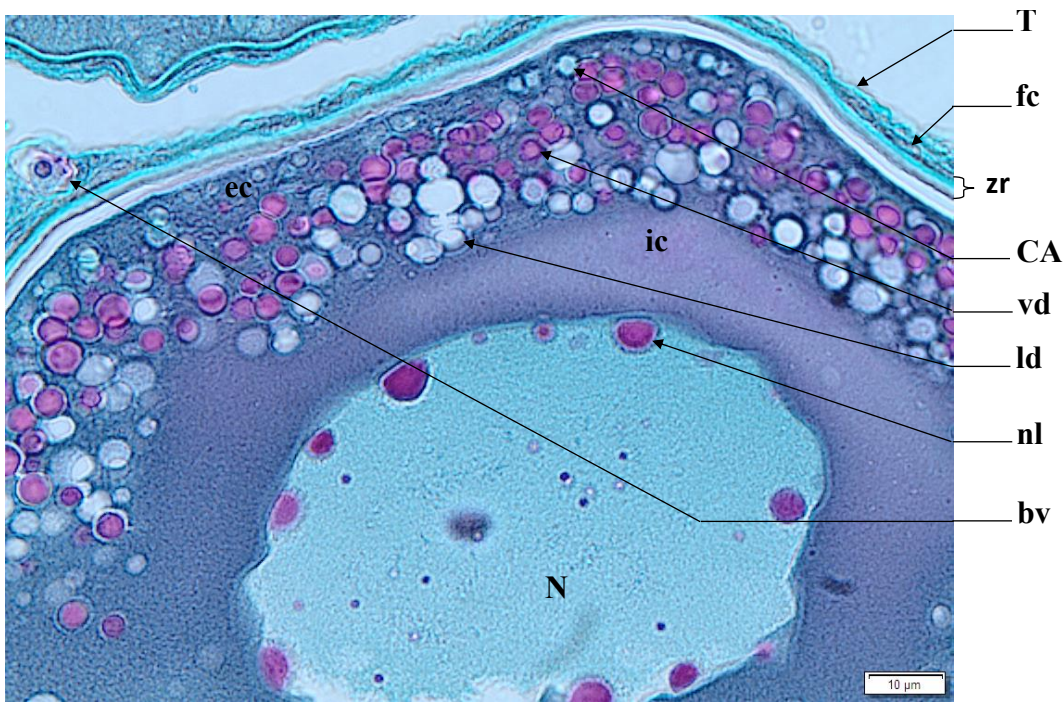


Figure 15 : Cell wall of a *vtg1* oocyte with a slightly scalloped nucleus (N) envelope containing multiple nucleoli (nl). Vitellus droplets (vd) will form on the edge of the external cytoplasm (ec), amongst the cortical alveoli (CA) and lipid droplets (ld). Follicular cells (fc) are present in the theca (T), with the *zona radiata* (zr) under these cell layers. The internal cytoplasm (ic) is still present, and blood vessels (bv) near the T can be seen

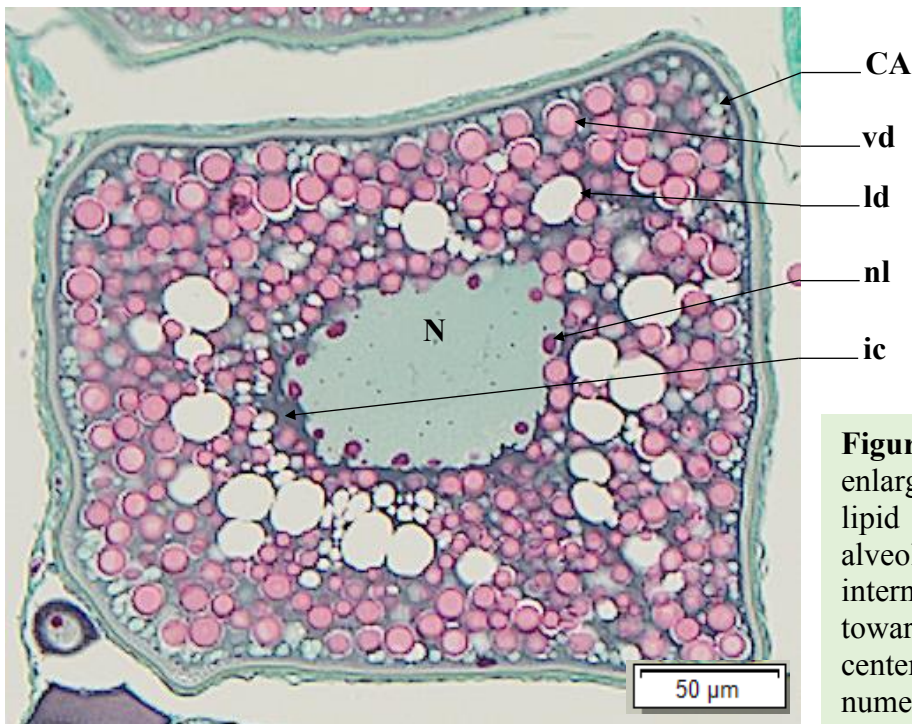


Figure 16 : A *vtg1* oocyte with enlarged vitellus droplets (vd), lipid droplets (ld), and cortical alveoli (CA) that have pushed the internal cytoplasm (ic) back towards the nucleus (N). The N is centered, scalloped and contains numerous nucleoli (nl)

Oocyte in vitellogenesis stage 2 (vtg2)

During the **vtg2** stage, ...

Identification :

Average size

vtg2 : μm ($\pm\mu\text{m}$)

zr : μm ($\pm\mu\text{m}$)

N/A



Oocyte in vitellogenesis stage 3 (vtg3)

An ovarian follicle enters stage 3 of vitellogenesis (vtg3) when ...

Identification :

Average size

vtg3 : μm ($\pm\mu\text{m}$)

zr : μm ($\pm\mu\text{m}$)

N/A

Oocyte in hydration (oih)

The ...

Identification :

Average size

oih : μm ($\pm\mu\text{m}$)

zr : μm ($\pm\mu\text{m}$)

N/A

Hydrated oocyte (ho)

A hydrated oocyte (**ho**) is defined by ...

Identification :

Average size

ho : μm ($\pm\mu\text{m}$)

zr : μm ($\pm\mu\text{m}$)

N/A

Post-Ovulatory Follicle (POF)

A Post-Ovulatory Follicle (POF) ...

Identification :

N/A

Atresia (aoA & aoB) and Lysis (L)

Torres-Martinez *et al.* (2017) define atresia as the degeneration, reabsorption, or even ablation, of ovarian follicles. In general, the first sign of atresia is the degeneration of the germinal vesicle of the oocyte, followed by the fragmentation of the *zona radiata* (**zr**) that will take an irregular appearance. This will lead to an hypertrophy of the follicular cells. There can be cell differentiations of the follicular cells (**fc**) into phagocytes and/or macrophages.

In this study, we will define two types of atresia. Oocytes in early atresia (**aoA**) and oocytes in late atresia (**aoB**). **aoA** are all germinal cells in lysis, from the oogonium (**og**) stage until the **undischarged** hydrated oocyte (**oh**) stage. They will always be encased in somatic cells (follicular cells (**fc**) and/or theca (**T**)). **aoB** are all hydrated oocytes in lysis that have been **discharged**, and are thus not encased in somatic cells anymore. Since an **aoB** is a cellular structure in lysis in the middle of the **lumen**, their shapes will often be warped, scattered and surrounded by lysis (**L**).

Identification : An **aoA** is a **follicle in lysis**. This means that the **oocyte is still encased inside a theca, within the ovarian lamella**.

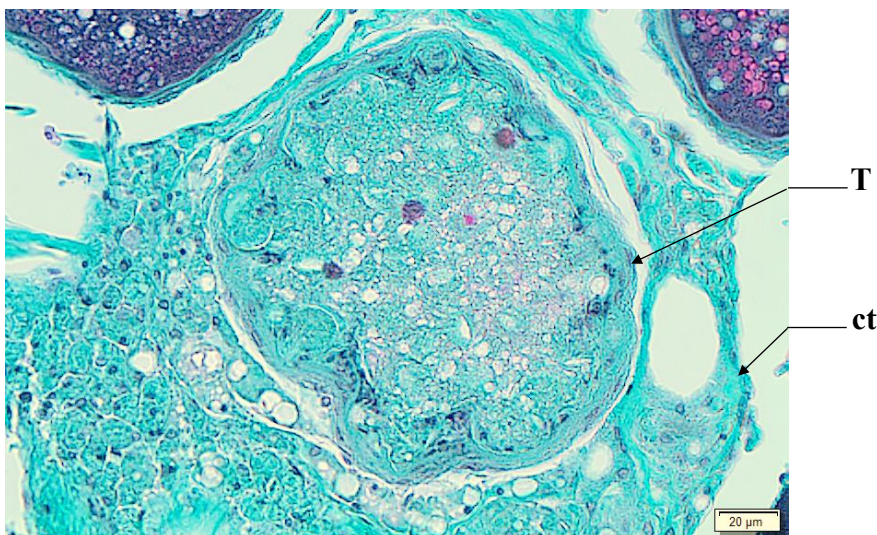


Figure 17 : Oocyte in early atresia (**aoA**). The oocyte has not been discharged into the **lumen**, and the follicle is still within the connective tissue (**ct**) of the ovarian lamella, encased by its theca (**T**)



Figure 18 : Zoom on macrophages (**mc**) between the **zr** and the theca (**T**) of an **oaA**

Identification : An **oaB** is an **oocyte in lysis**.

N/A

Identification : Lysis can be difficult to identify, especially with the presence of atresia. They can be found **anywhere inside the gonad, at any maturity phase**. This **cluster of cells in lysis** can contain macrophages, are of **different shapes and sizes**, and do **not possess a theca and/or zona radiata**

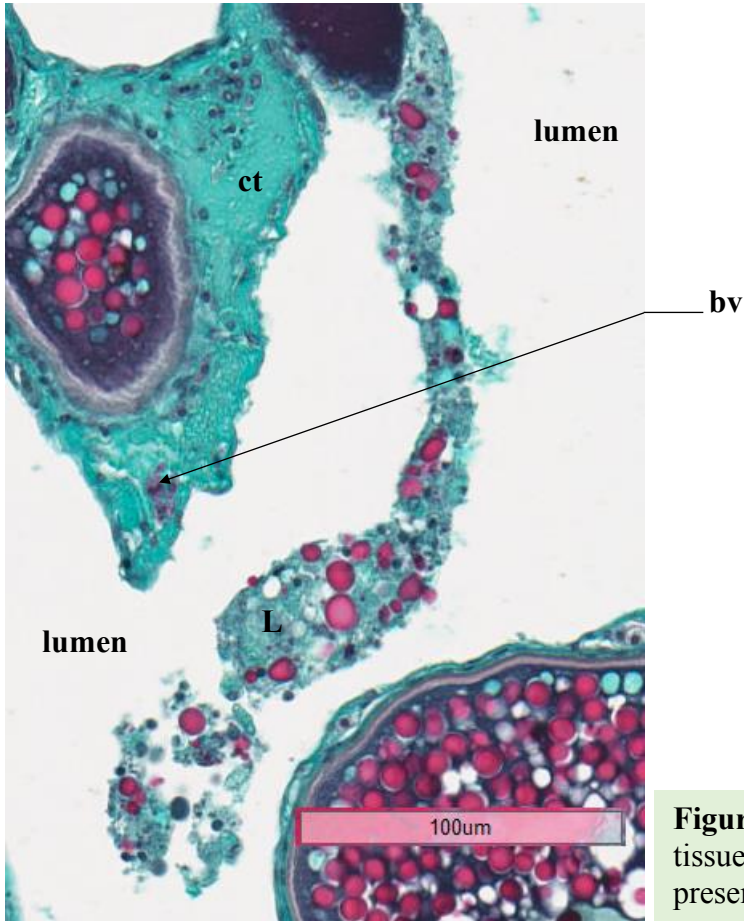


Figure 19 : Lysis (L) in the **lumen**. Connective tissue (ct) and blood vessels (bv) are also present

Connective tissue (ct) & Gonadal wall (gw)

The connective tissue (**ct**) links all of the ovarian structures together to form the ovarian lamellas. Follicles can be found inside the ovarian lamellas, encased in **ct**.

Connective tissue (**ct**) is made of green-colored cells, just like the cells that make up the gonad wall (**gw**). Gonad wall cells are muscular tissue while **ct** is not. Be wary not to mix the both up! Even if a sampling point falls on a very small piece of **ct** in the middle of a wide expanse of intercellular space (**Is**), this sampling point will be classified under **ct**.

The gonad wall (**gw**) will have the same green tint as the **ct**. Muscle bundles and blood vessels (**bv**) can be found in the **gw**. If a sampling point falls on muscular tissue within the **gw**, then the sampling point will be put into the **gw** category. On the other hand, if a sampling point within the **gw** falls on a blood vessel (**bv**), then this structure will be classified under **bv**.

The boundary of the **gw** starts from the outer most cell layer of the gonad and ends at the inner most cell layer of the gonad wall (**gw**), just before entering into the ovarian lamellas. If the **gw** has been stretched, ripped or spread, but the sampling point lands between the inner and outer most cell layers before the ovarian lamellas, then the sampling point will be classified under the **gw** category. Do not hesitate to unzoom in order to obtain a more general view of where the sampling point is in the gonad. This will allow the reader a better view of where the **gw** ends and the **ct** starts.

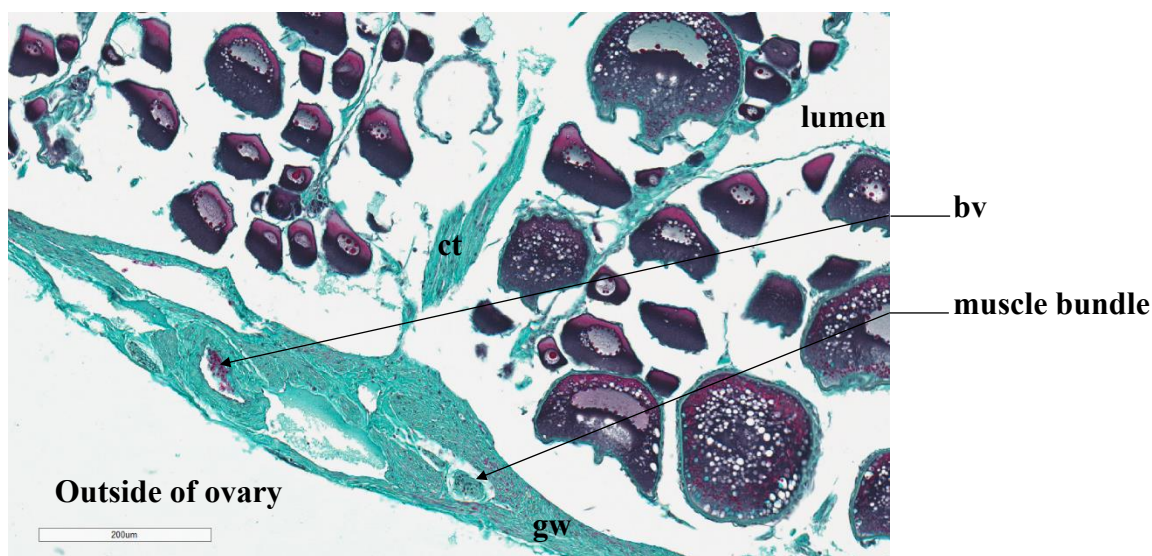


Figure 20 : Cross section of a four-spot megrim ovary with its gonad wall (**gw**). The ovarian lamellas are held together by connective tissue (**ct**), delimiting the **lumen** and the outside of the ovary. Blood vessels (**bv**) and **muscle bundles** can be seen

Blood vessel (bv)

Blood vessels (**bv**) are more or less small, with a size that can vary from that of a single, cell to over 100µm.

Found within the theca (**T**), inside connective tissue (**ct**) or the gonad wall (**gw**), blood vessels (**bv**) are identifiable by the presence of blood cells (small red cells with a darker nucleus). If a sampling point falls in the « white zone » inside a cavity containing blood cells, this sampling point will be classified under the **bv** category.

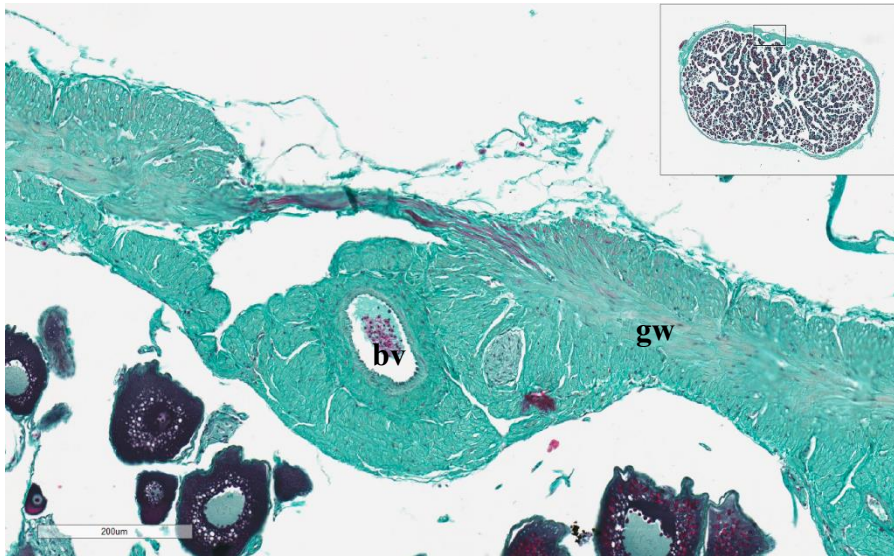


Figure 21 : Presence of blood vessels (**bv**) in the gonadal wall (**gw**)

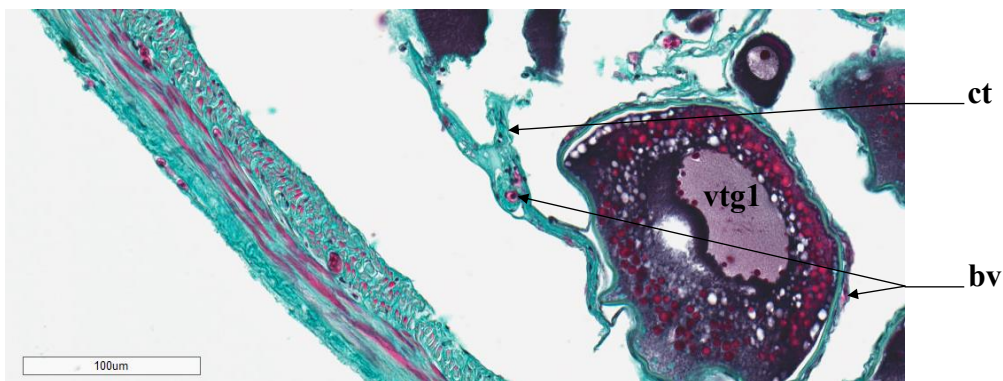


Figure 22 : Presence of a blood vessel (**bv**) in the Theca (**T**) of a **vtg1** and inside connective tissue (**ct**)

Bibliography

Anderson, E., 1969. Oocyte-follicle Cell Differentiation in Two Species of Amphineurans (Mollusca), *Mopalia mucosa* and *Chaetopleura apiculata*. J. Morphol. 129, 89-126.

Anderson, E., 1968. Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in the Pipefish, *Syngnathus fuscus*, and the Killifish, *Fundulus heteroclitus*. J. Morphol. 125, 23-60.

Aragón, L., Aranda, G., Santos, A., Medina, A., 2010. Quantification of ovarian follicles in bluefin tuna *Thunnus thynnus* by two stereological methods. J. Fish Biol. 77, 719-730.

Brown-Peterson, N.J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B.J., Lowerre-Barbieri, S.K., 2011. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. Mar. Coast. Fish. 3, 52-70.

Domínguez-Castanedo, O., Uribe, M.C., Rosales-Torres, A.M., 2016. Morphological development of the structures related to annualism in the ovarian follicle of the killifish *Millerichthys robustus* (Costa,1995) (Teleostei: Cyprinodontiformes). J. Morphol. 277, 1219-1230.

Gabe, M., 1968. Techniques Histologiques, 2ème ed. Masson et C., Paris.

ICES, 2008. Report of the Workshop on Maturity Ogive Estimation for Stock Assessment (WKMOG), 3-6 June 2008, Lisbon, Portugal. ICES CM2008/ACOM:33. 72 pp.

ICES, 2010. Report of the ICES/HELCOM Workshop on Flatfish in the Baltic Sea (WKFLABA), 8-11 November 2010, Öregrund, Sweden. ICES CM 2010/ACOM:68. 85pp.

ICES, 2014. Report of the Workshop for maturity staging chairs (WKMATCH), 11-15 June 2012, Split, Croatia. ICES CM 2012/ACOM:58. 57 pp.

ICES, 2018. Report of the Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF), 30 April - 4 May 2018, ICES Headquarters, Copenhagen, Denmark. ICES CM/EOSG: 38. 75 pp.

ICES, 2019. Working Group on Biological Parameters (WGBIOP), 7-10 October 2019, Lisbon, Portugal. ICES Scientific Reports. 1:85. 93 pp.

Lowerre-Barbieri, S.K., Brown-Peterson, N.J., Murua, H., Tomkiewicz, J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., 2011. Emerging Issues and Methodological Advances in Fisheries Reproductive Biology. Mar. Coast. Fish. 3, 32-51

Robson, S.M., 2004. Age, growth, reproductive biology and population dynamics of the common megrim *Lepidorhombus whiffiagonis* (Walbaum, 1792) from off the west coast of Ireland. Unpublished thesis (Doctor of Philosophy in Fisheries Biology), Galway-Mayo Institute of Technology.

Sauger, C., Quinquis, J., Dubroca, L., Parrad, S., Kellner, K., Heude-Berthelin, C., 2019. Sample collection protocol for the extraction of female gonads in the megrim (*Lepidorhombus spp.*) for maturity staging through histology.

Sauger, C., Dubroca, L., Villain-Naud, N., Kellner, K., Heude-Berthelin, C., Elie, N., 2020. Protocol for the determination of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the four-spot megrim, *Lepidorhombus boscii* (Risso, 1810). IFREMER

Torres-Martínez, A., Hernández-Franyutti, A., Uribe, M.C., Contreras-Sánchez, W.M., 2017. Ovarian structure and oogenesis of the extremophile viviparous teleost *Poecilia mexicana* (Poeciliidae) from an active sulfur spring cave in Southern Mexico. *J. Morphol.*, Wiley Periodicals 278, 1667-1681.

Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish Biol. Fish.*, Chapman & Hall 6, 287-318.



Publication 8

Protocole de lectures stéréologiques

Citation : Dubroca, L., Elie, N., Heude-Berthelin, C., Kellner, K., Le Meleder, A., Lepoittevin, M., Martin, V., Nivet, T., Sauger, C., Villain-Naud, N. (2023) «Stereology reading protocol when using quantitative histology for the determination of sexual maturity in fish ovaries». DOI : <https://doi.org/10.13155/75173>

Résumé : Protocole décrivant l'utilisation du logiciel QuPath et les règles à appliquer lors des lectures stéréologiques afin d'assurer la reproductibilité pour la calibration. Protocole en anglais disponible en accès libre sur **Archimer**.

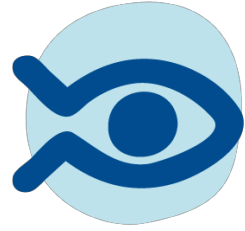
Contribution : Création, conception et rédaction du document avec prise des photos. Mises à jours et publication des différentes versions et participation à l'élaboration des règles de lectures.

Système d'Informations Halieutiques

Action Paramètres biologiques

Laurent DUBROCA¹
Nicolas ELIE³
Clothilde HEUDE-BERTHELIN²
Kristell KELLNER²
Anna LE MELEDER¹
Mélanie LEPOITTEVIN²
Valentine MARTIN¹
Timothé NIVET¹
Carine SAUGER¹
Nadège VILLAIN-NAUD²

SIH
Système
d'Informations
Halieutiques



May 2023 – V.3.4

1 : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, IFREMER, Laboratoire Ressources Halieutiques de Port-en-Bessin, 14520 Port-en-Bessin-Huppain, France.
2 : University of Caen Normandy, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) MNHN, Sorbonne Université, UCN, CNRS-7208, IRD, UA, team EMERGE, esplanade de la Paix 14032 Caen, France
3 : Normandie Univ, UNICAEN, SF 4206 ICORE, CMABIO3, 14000 Caen, France.

Stereology reading protocol when using quantitative histology for the determination of sexual maturity in fish ovaries

Stereology reading protocol when using quantitative histology for the determination of sexual maturity in fish ovaries

The digital version of this document is available on the [ARCHIMER](#) Web site.

The digital version of complementary documents describing the histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of different fish species are available on the [ARCHIMER](#) Web site.

Version	Date	Comments
1.0	July 2019	Conception of the document for the Plaice
2.0	May 2020	Conception of the document for the Megrin
2.1	June 2020	Conception of the document for the Four Spot Megrin
2.2	June 2020	Size rectifications
2.3	June 2020	Figure and Ido added with text
3.0	May 2022	Generalization of the reading protocol for all species
3.1	June 2022	Added a summary sheet
3.2	August 2022	Added Nucleo-cytoplasmic measures
3.3	March 2023	Correction of a mistake on p.13
3.4	May 2023	Added problems and solutions for QuPath scripts p. 17

Table of contents

<i>1. Context</i>	5
1.1. Terminologies and vocabulary.....	5
1.2. Processing of histological slides.....	6
<i>2. QuPath - Stereology Software</i>	8
<i>3. Reading rules summary</i>	18
<i>4. Structure identification</i>	19
4.1. Measuring cells	19
4.2. Follicle identification.....	21
4.3. Sampling cross locations.....	22
4.4. Gonadal wall (gw)	26
4.5. Connective tissue (ct)	29
4.6. Blood vessels (bv)	31
4.7. Intercellular space (Is)	33
4.8. Unnatural emptiness (E).....	36
4.9. Undetermined (U).....	38
<i>Bibliography</i>	40



1. Context

This protocol was established for the evaluation of sexual maturity for exploited stock species, using quantitative histology (stereology). This document describes the reading method used on histological slides under the cross-platform QuPath.

This document follows the work of different workshops that aimed to improve the compilation of data on sexual maturity. The WKMATCH (Workshop for MATurity staging CHairs, 2012) and the WKASMSF (Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in stageFish, 2018) defined a universal evaluation grid for sexual maturity staging of different species, including teleosteans. During the WKMATCH workshop, two main recommendations were made, underlining the need to improve and complete knowledge on sexual maturity, as well as to harmonize the practices used to determine these sexual phases.

Another workshop, the WKMATHIS (Workshop on sexual MATurity staging from HIStological tools) that took place in Caen in 2017, added new objectives : review the current knowledge on gonad histology, determine a sexual maturity scale at a cellular level, and histological studies should be made in order to improve the determination of sexual maturity on a macroscopic scale.

This protocol, drawn from these workshops and their conclusions, offers guidelines on how to read histological slides through the use of stereology. As of June 2022, this protocol is linked to the MATO (MATurité Objectif des poissons par l'histologie quantitative) project, a study restricted to female gonad and the different cellular structures found inside the ovaries for different species (*Pleuronectes platessa*, *Lepidorhombus whiffiagonis*, *Lepidorhombus boscii*, *Mullus surmuletus* and *Micromesistius poutassou*).

This protocol will present reading methods that favor an objective reading of histological slides, through stereology, and will allow less experienced readers to partake in this exercise. For a detailed description of the germinal cells, refer to the lexicon of the studied specie.

1.1. Terminologies and vocabulary

The specific histological terms, their abbreviations, the descriptions of the different types of germinal cells, as well as an accurate description of identifiable ovarian structures, may be found in the lexicons of the studied species (cf. Archimer).

For the MATO project, the terminologies used were that of Brown-Peterson *et al.* (2011), following the criteria set by the working groups of the International Council for the Exploration of the Sea (ICES) to define different maturity scales for European stock species.

For the description of female germinal cells that will become gametes, the terms **oogonia** (before meiosis) or **oocyte** (meiosis has begun) will be used. An oocyte is characterized by an **ooplasm** encased in an **oolemma** (plasmic membrane) (Tyler and Sumpter, 1996). A **zona radiata** will also be present once the cell becomes dependent on follicle-stimulating hormone (FSH).

The term **follicle** will be used to designate an oocyte encased in somatic cells: follicular cells and theca cells (Tyler and Sumpter, 1996).

For the description of gamete development, the term **stage** will be used to designate the different gametogenesis stages (Brown-Peterson *et al.*, 2011) :

- Oogonia
- Primary growth oocytes
- Secondary growth oocytes
- Oocyte maturation
- Ovulation stage

The sexual maturity cycle is split into two **states**. The Sexually Immature (**SI**) state and the Sexually Mature (**SM**) state. The terminology **phase** will be used for the gonadal development. The reproduction cycle of fish is divided into seven **phases** (Brown-Peterson *et al.*, 2011, ICES, 2012 ; 2018).

- A - Immature
- B - Developing
- C - Spawning
- Da - Regressing
- Db - Regenerating
- E - Omitted spawning
- F - Abnormal

1.2. Processing of histological slides

For a more detailed explanation on the extraction and processing of fish ovaries, refer to « A macroscopic and stereological imaging dataset of *Pleuronectes platessa* ovaries » (Sauger *et al.*, 2020) as well as gonad extraction protocols (Sauger *et al.*, 2019 & Sauger *et al.*, 2022).

The ovaries of fresh female fish were processed in a Davidson solution, embedded into a paraffin block and 3µm cross sections were made with a microtome. The samples were then stained with Gabe's trichrome (Gabe, 1968), mounted between slide and slip, and digitized using a histology slide scanner. The pictures found in this protocol are screenshots of these scanned slides in the QuPath cross-platform interface used for the stereology counting process.

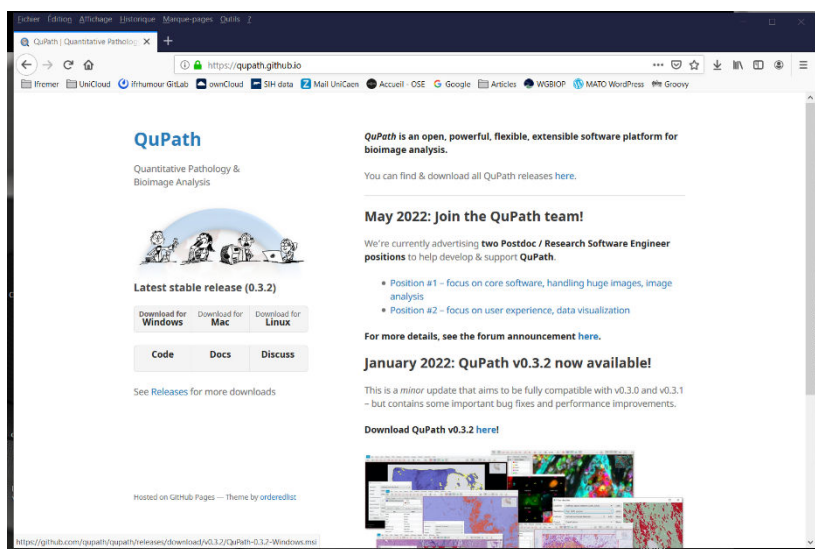


og (A)	Oogonium
po1 (Z)	Primary oocyte stage 1
po2 (E)	Primary oocyte stage 2
ldo (R)	Lipid droplet oocyte
cao (T)	Cortival alveoli oocyte
vtg1 (Y)	Vitellogenic oocyte stage 1 / Early vitellogenesis
vtg2 (U)	Vitellogenic oocyte stage 2
vtg3 (I)	Vitellogenic oocyte stage 3
oih (O)	Oocyte in hydration
ho (P)	Hydrated oocyte
POF (Q)	Post-Ovulatory Follicle
aoA (S)	Atretic oocyte alpha
aoB (D)	Atretic oocyte beta
L (F)	Lysis
gw (G)	Gonadal wall
ct (H)	Connective tissue
bv (J)	Blood vessel
Is (K)	Intercellular space
U (L)	Undetermined
E (M)	(unnatural) Emptiness

List of structures that may be found within the ovaries. The number of structures will be species dependent (QuPath interface)

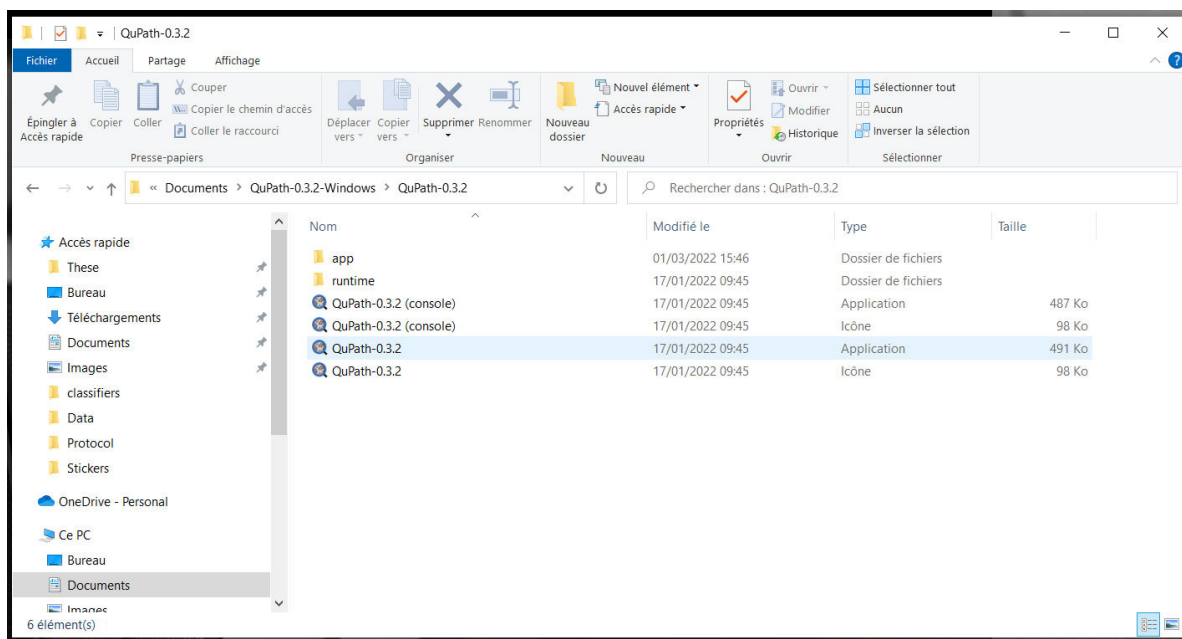
2. QuPath - Stereology Software

For the stereological readings, the software platform for bioimages analysis QuPath (Bankhead *et al.*, 2017, version 0.3.2) was used. Each histological slide was processed : the ovaries were automatically outlined (black line) and a grid of crosses (in blue) covered the sampling zone. For each of the 500 to 600 sampling points (blue crosses) a single structure was assigned (box to select inside the *Stereology: Cross Grid* window). The automatic outline of the ovary was made possible by running a script under QuPath, allowing the detection of the ovarian tissues and the implementation of the counting grid. This script, coded by Nicolas Elie (CMABIO3), allows for anyone that has a slide scanner to replicate the stereology method used in this study.



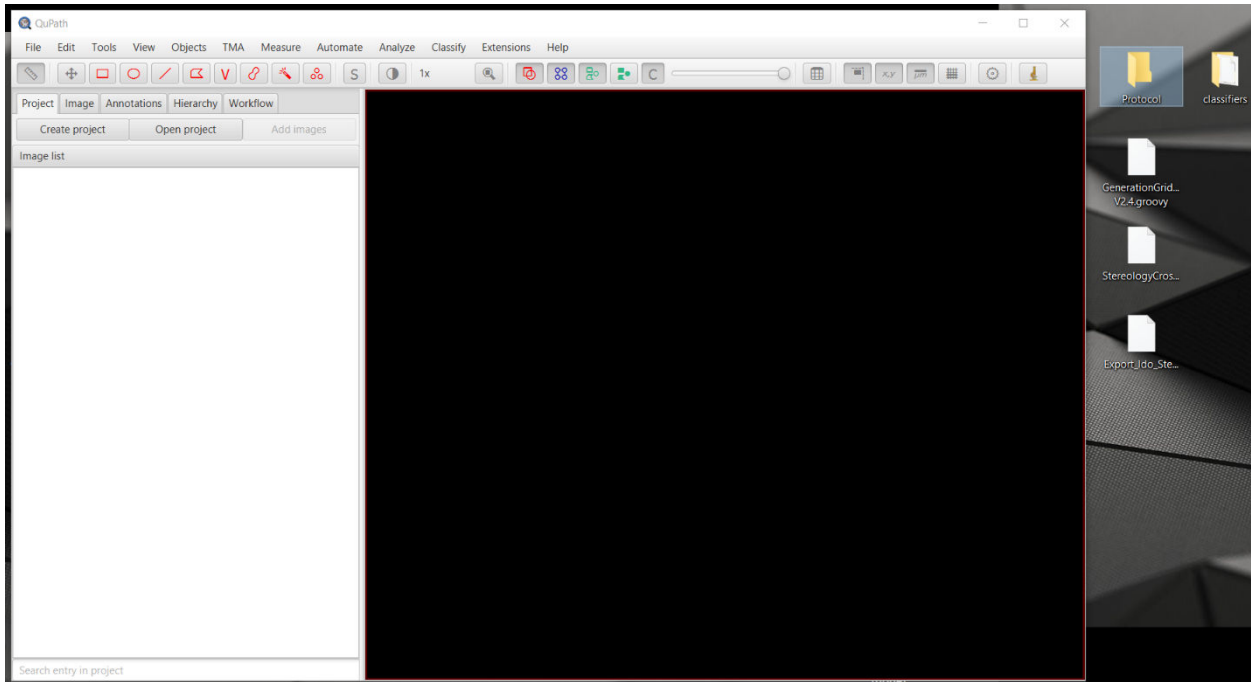
QuPath is an open source software and may be downloaded from their website : [\(https://qupath.github.io/\)](https://qupath.github.io/)

1. Launch QuPath

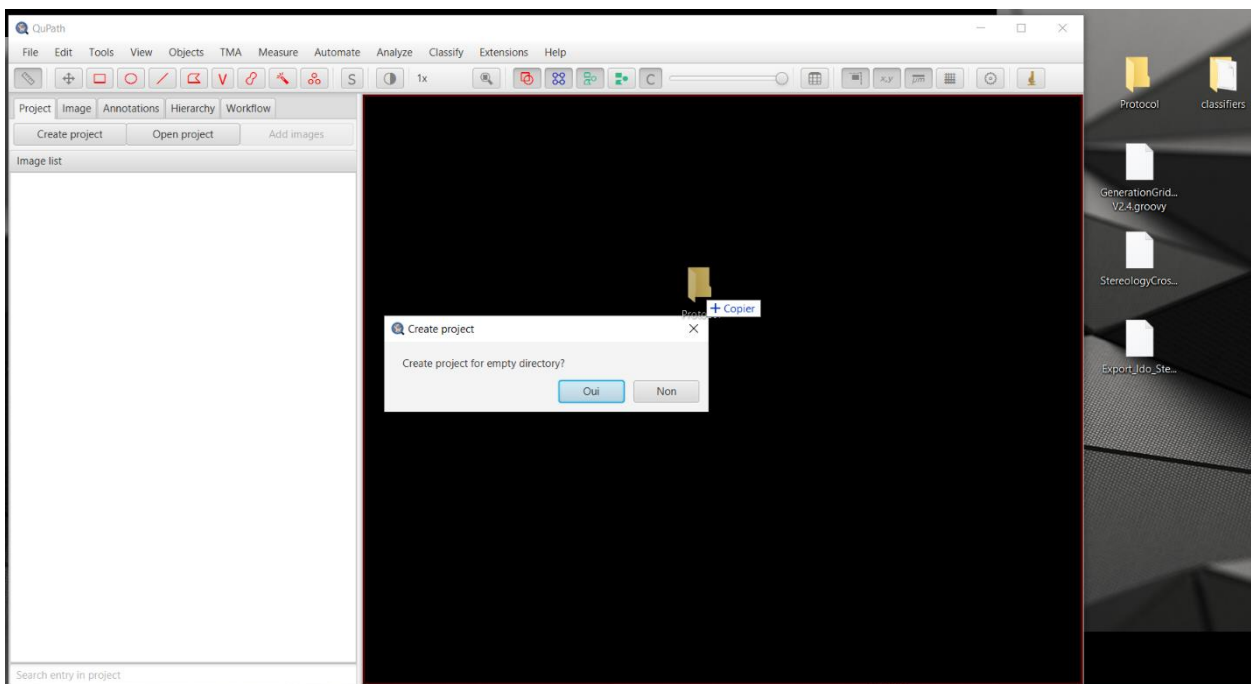


2. QuPath interface with mandatory files :

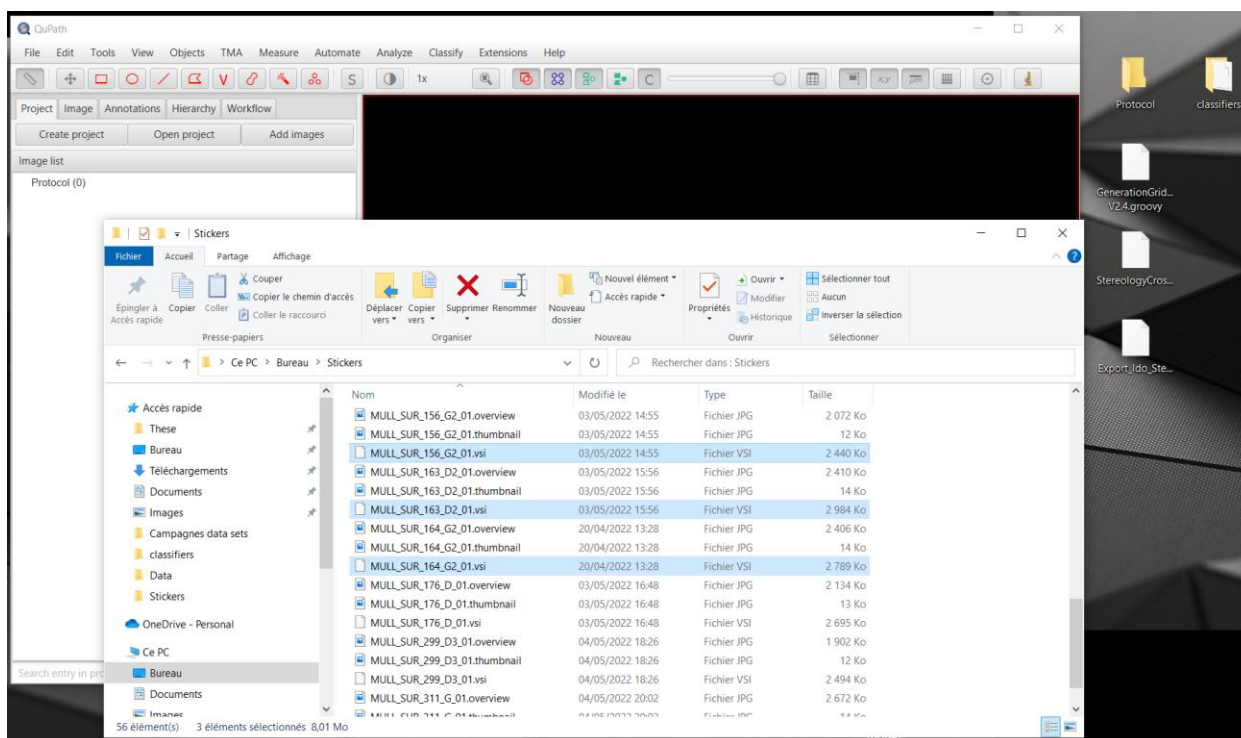
- Protocol : an empty folder for the future project
- GenerationGridCross.groovy : script that will outline the ovarian section
- StereologyCross.groovy : script to add the sampling grid
- Export_StereoToXML.groovy : script to export the reading results into an xml file



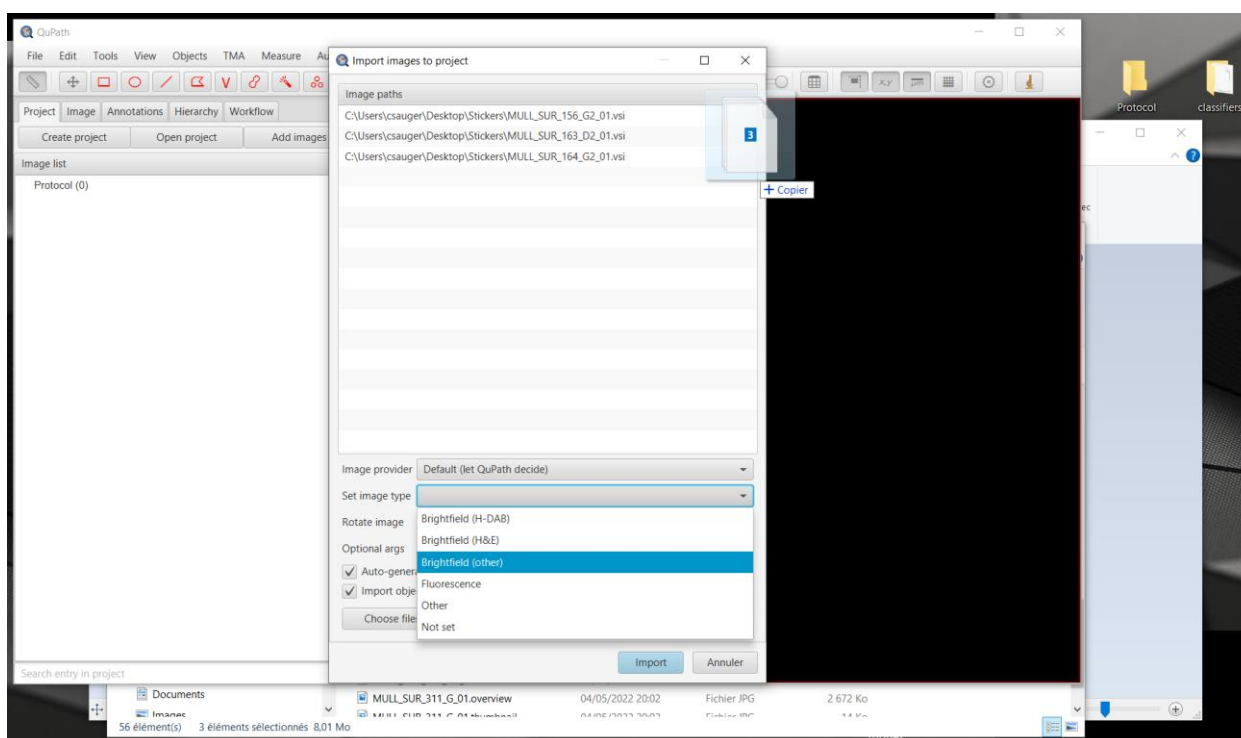
3. Click and drag the empty folder (where the future project will be stored (Protocol)) over the QuPath interface
4. Select 'Yes/Oui'



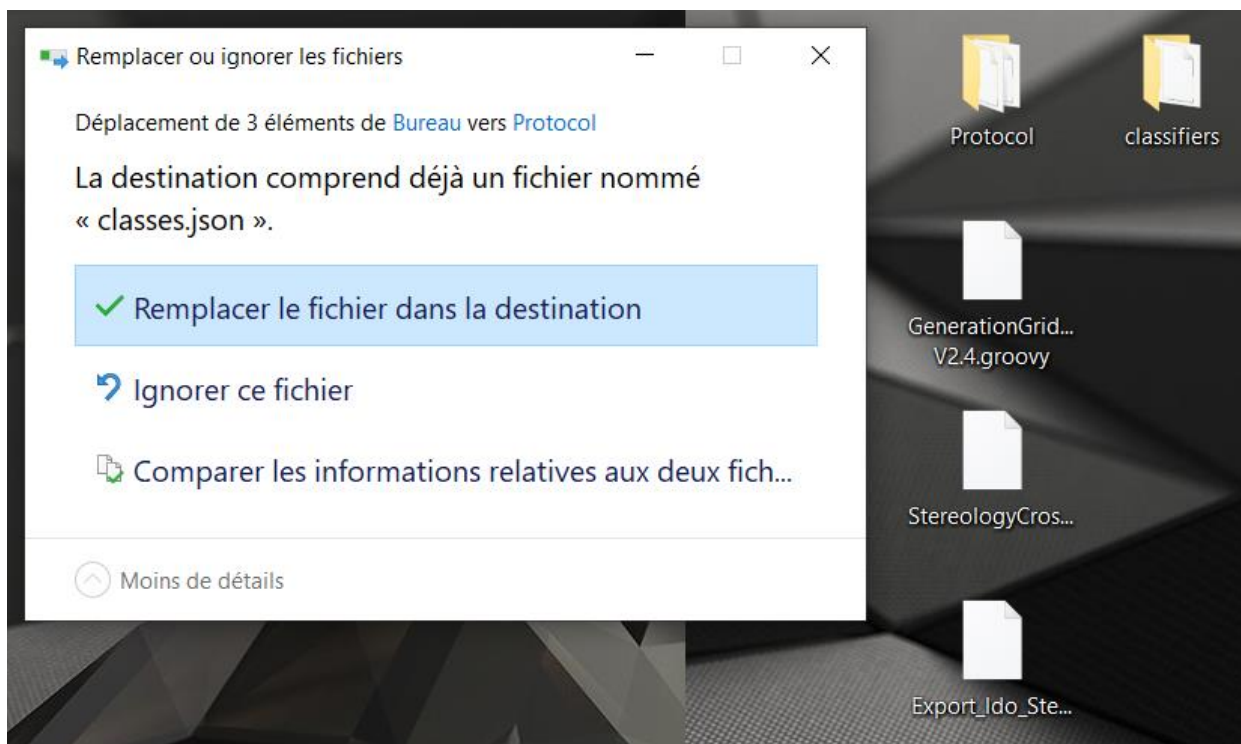
- Open the folder where the scanned slides are and select the .vsi files of the slides you want to analyze



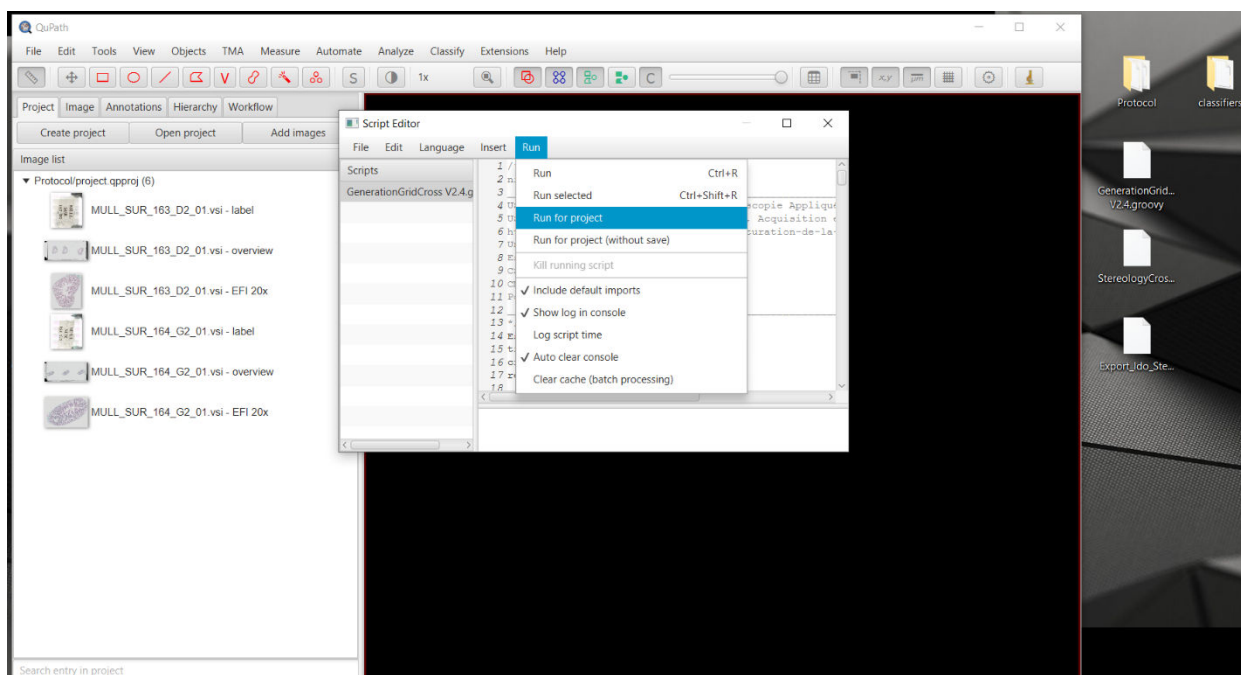
- Click and drag those files over the QuPath interface
- The 'Import images to project' window will open with the names of the .vsi files selected
- In the 'Select image type' choose 'Brightfield (other)'
- Click on 'Import'



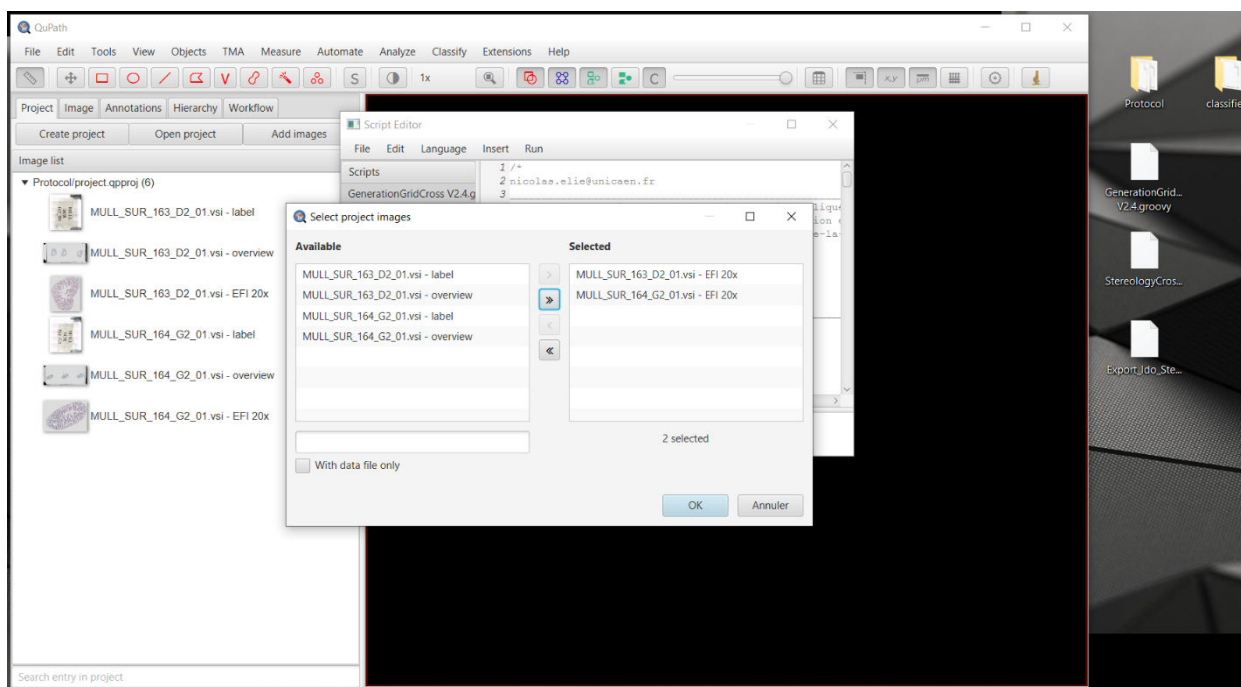
- Back to the mandatory files, replace the 'classifiers' file inside the main project folder (Protocol) with the 'classifiers' files provided with the other mandatory files



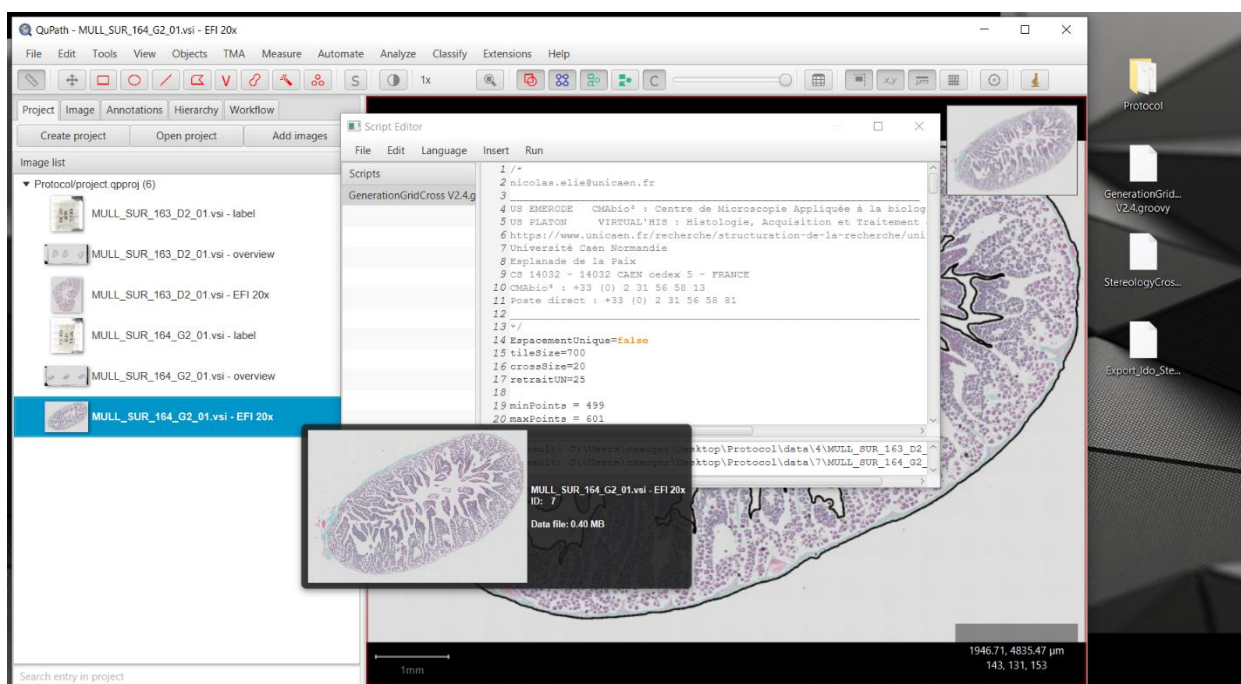
- Click and drag the GenerationGridCross.groovy script over the QuPath interface
- The 'Script Editor' window will open
- Select the 'Run' tab and click on 'Run for project'



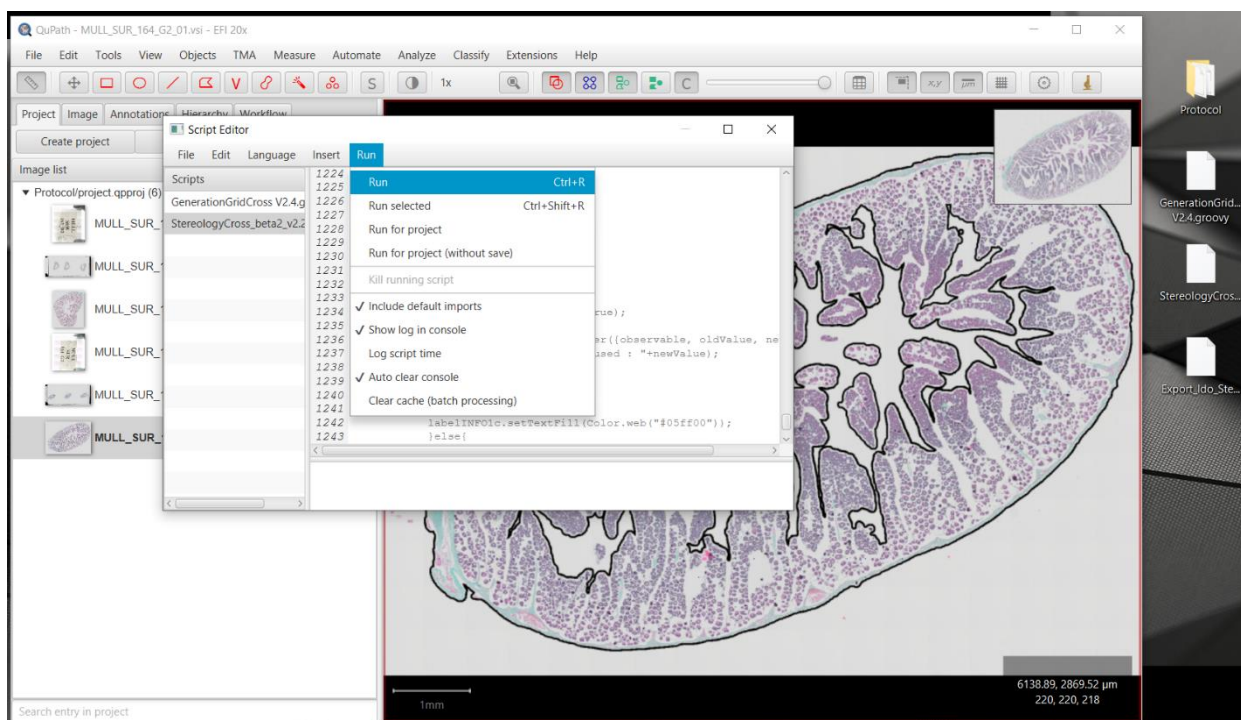
- 14. The 'Select project images' window will open
- 15. Select the EFI files
- 16. Click on 'OK'



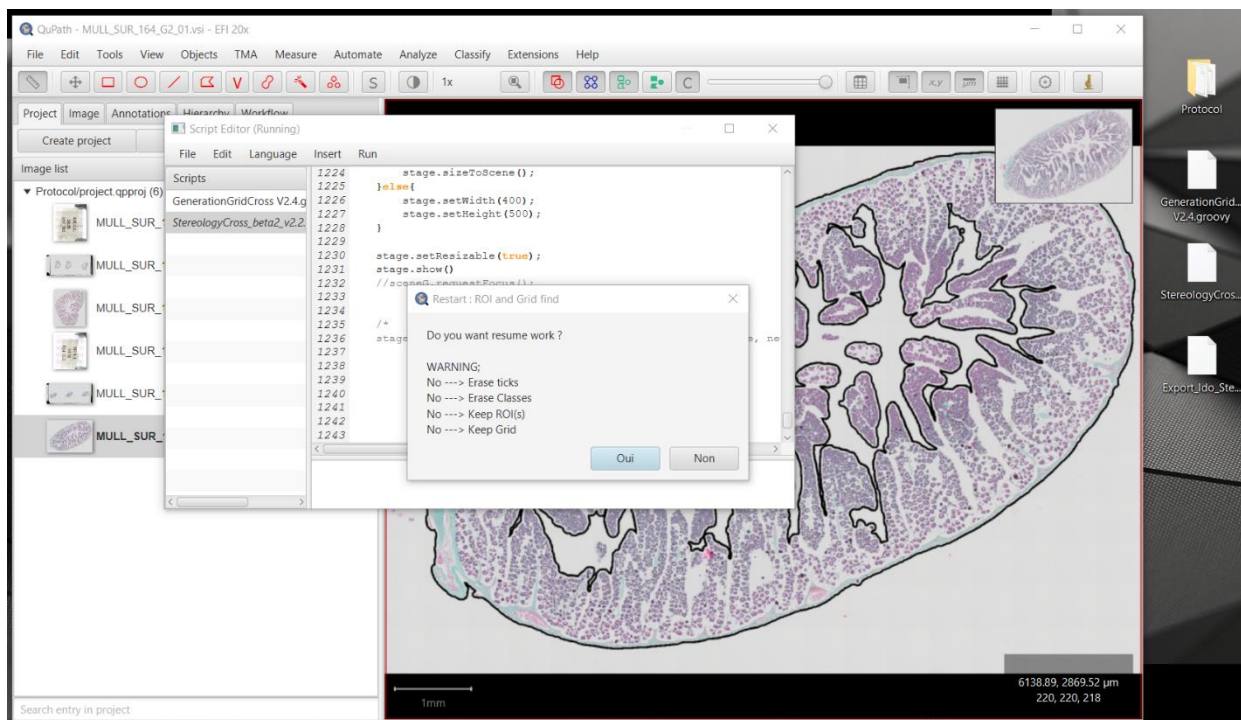
- 17. On the left window (Image list window) of the QuPath interface, double click on the scan you want to read.
- 18. The scan of the cross section should appear outlined in black. Blue crosses should have been laid out.



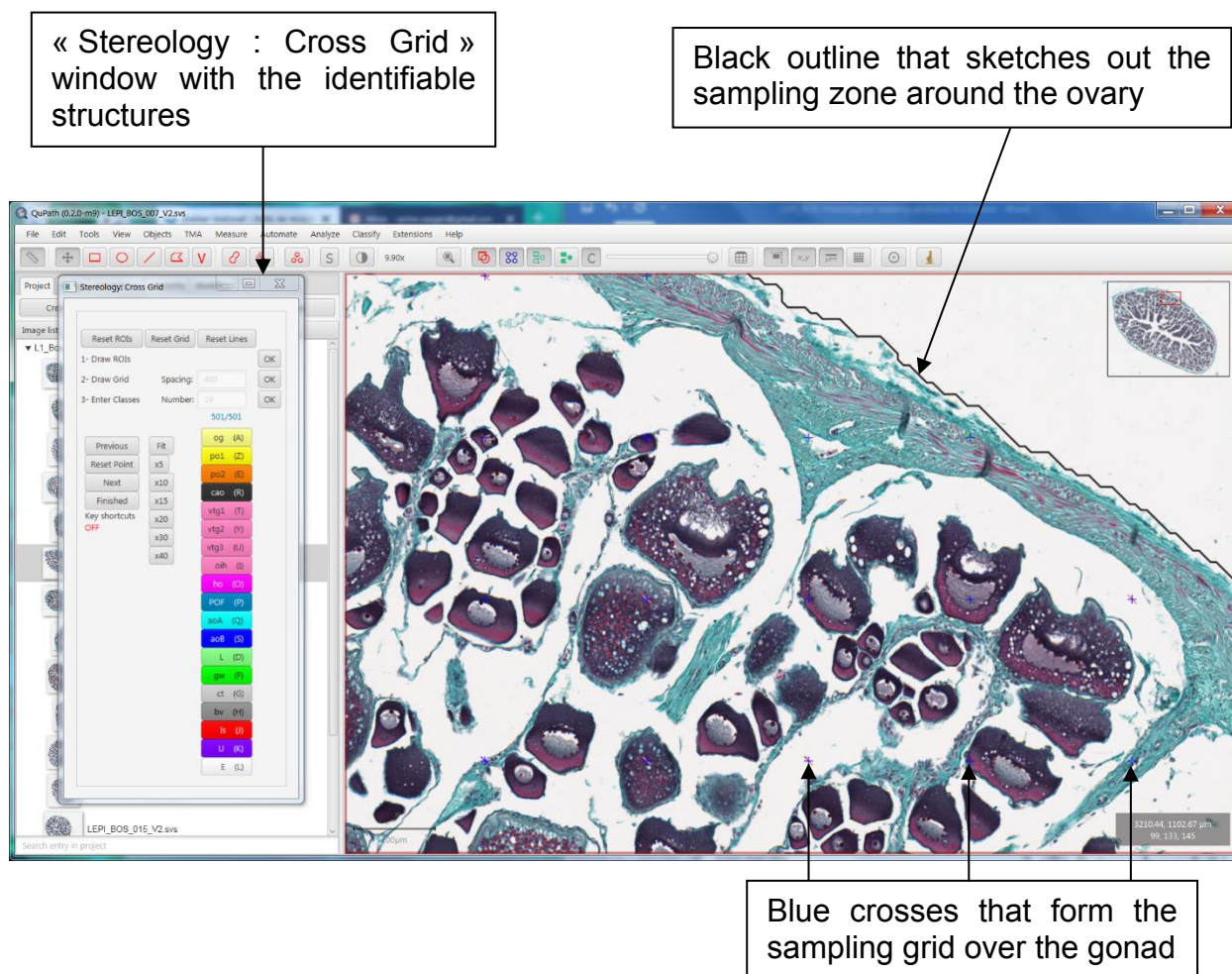
- 19. Click and drag the StereologyCross.groovy script over the QuPath interface
- 20. The new script should appear selected in the 'Script Editor' window
- 21. Select the 'Run' tab and click on 'Run'



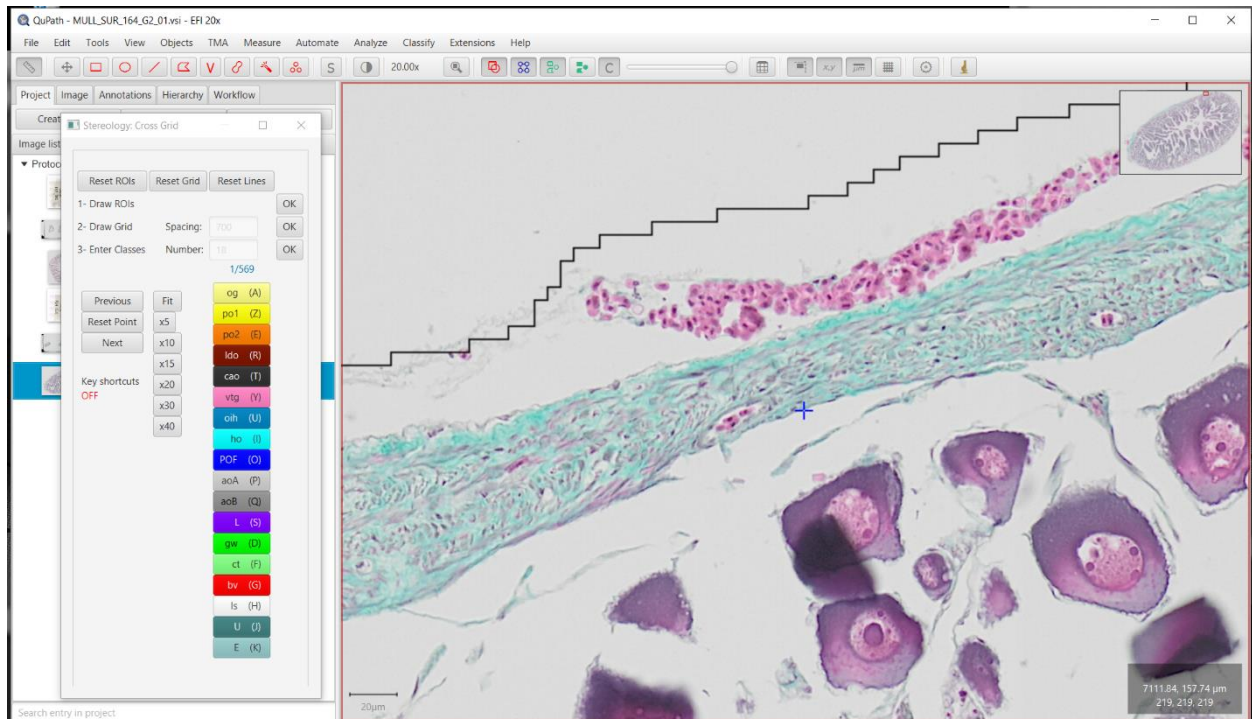
- 22. The 'Restart : ROI and Grid find' window will open
- 23. Click on 'Yes/Oui'



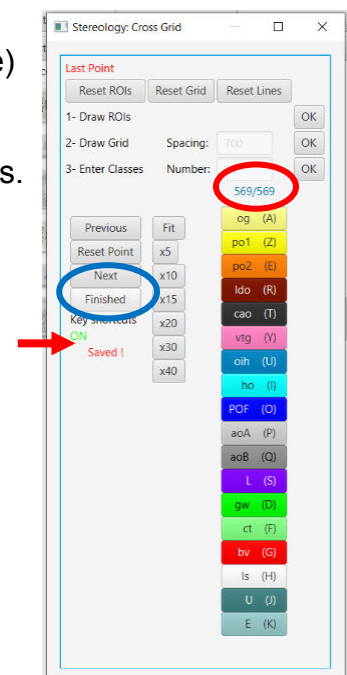
24. The 'Stereology Cross Grid' window will open and the picture interface will zoom in on the first reading cross
25. Select one cellular structure identified by the blue cross (Keyboard shortcut available)
26. Once a structure selected, the next cross will automatically become active



- 27. To go back to the previous cross, select the 'Previous' button in the 'Stereology Cross Grid' window, or use the keyboard left arrow
- 28. To go to the next cross, select the 'Next' button in the 'Stereology Cross Grid' window, or use the keyboard right arrow
- 29. When a structure is selected, a colored dash will appear over the blue cross. To remove an answer, select the 'Reset Point' button in the 'Stereology Cross Grid' window

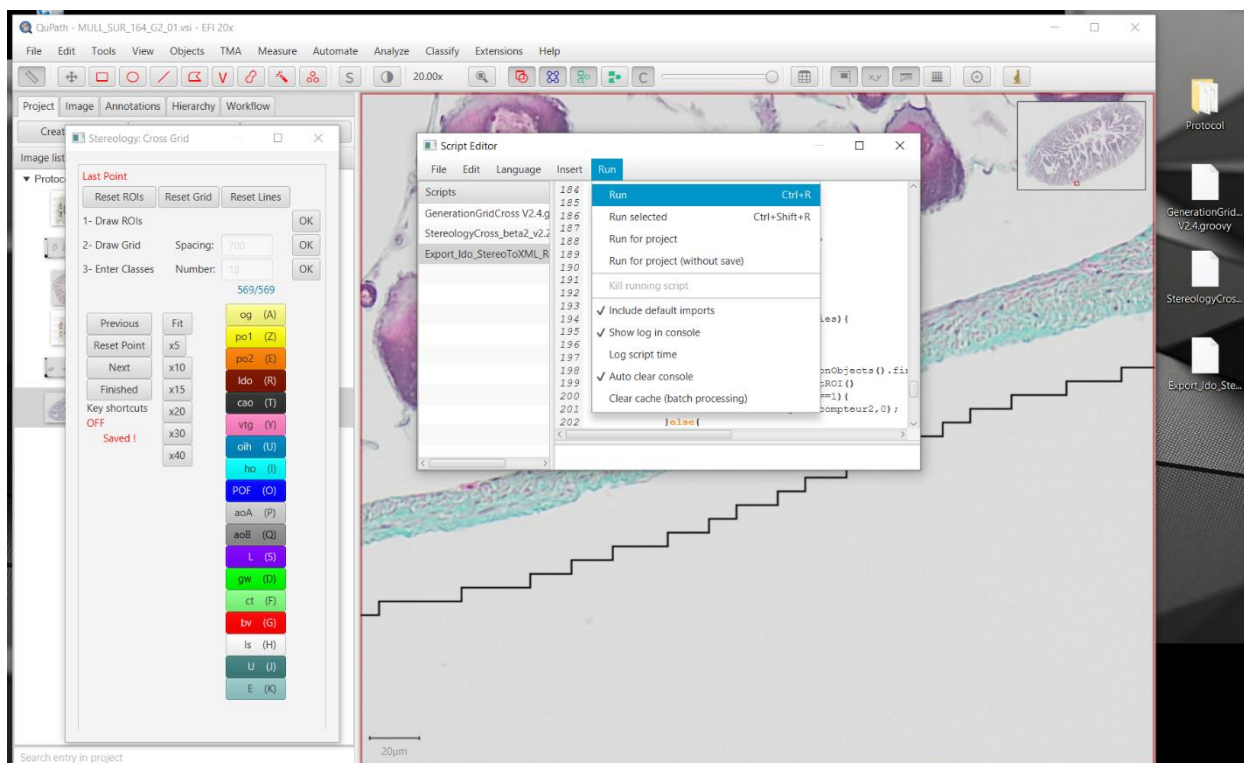


- 30. The number of crosses with an identified structure will appear in the 'Stereology Cross Grid' window (red circle)
- 31. Once all the crosses have been assigned a structure, a 'Finished' button will appear (blue circle)
- 32. Click on the 'Finished' button to save your reading results.
- 33. A 'Saved!' message should appear under (red arrow)

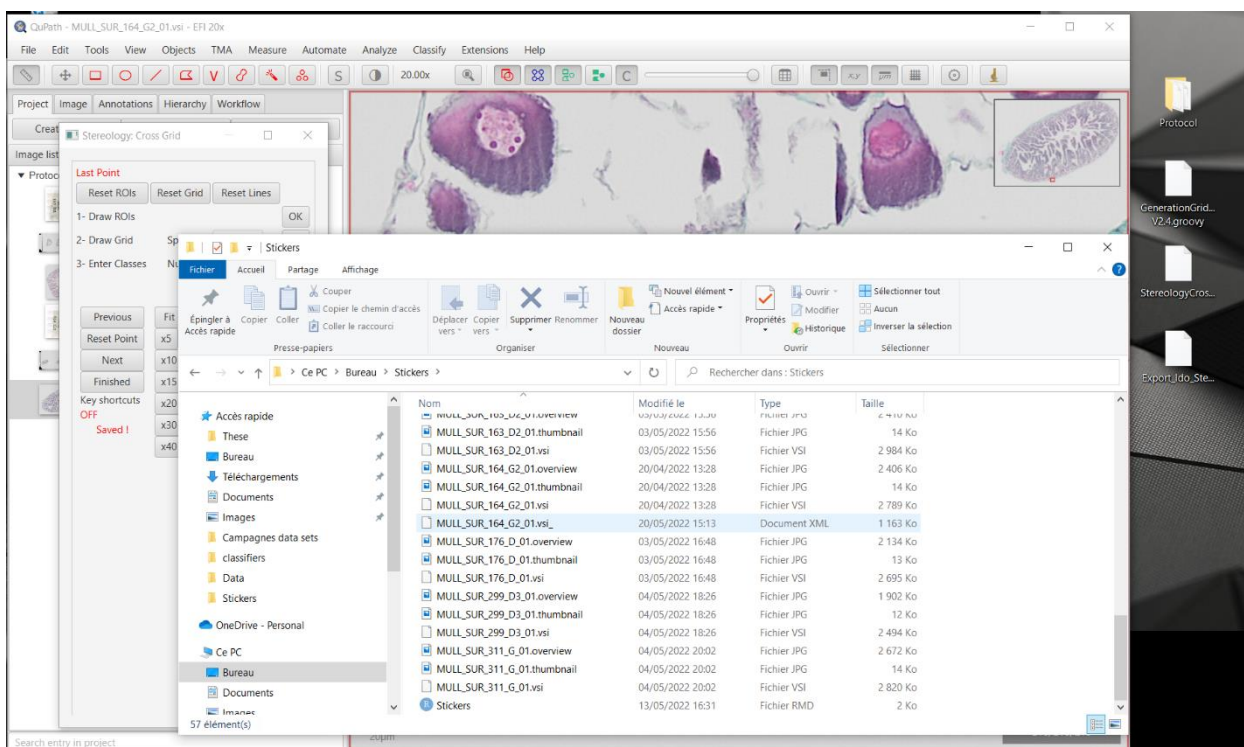


34. Extract the reading answers and their coordinates :

- Click and drag the 'Export_StereoToXML.groovy' file over the QuPath interface
- The new script should appear selected in the 'Script Editor' window
- Select the 'Run' tab and click on 'Run'



35. An .xml document with the reading answers should have appeared inside the folder with the scans slides



Possible problems:

- **Step 18 message 'Erreur' appears in the Scrip Editor console.** The generation of the grid of crosses by the GenerationGridCross.groovy script can't be done. The outlined area is too small. To counter this, in the GenerationGridCross.groovy script, lower the values of TileSize (l.15) and the retraitUN (l.17).
- **A small isolated element is outlined but you don't want to have it taken into account in your counting grid.** The GenerationGridCross.groovy script sees it as an element big enough to include it in the counting area. To remove all elements of that size and lower, create a polygon annotation to get the volume area of the element, then change the first value of createAnnotationsFromPixelClassifier (l.145) into a slightly higher value than the area volume you just annotated.
- **A small isolated element isn't outlined but you want to have it taken into account in your counting grid.** The GenerationGridCross.groovy script sees it as an element that is too small to include it in the counting area. To include all elements of that size and higher, create a polygon annotation to get the volume area of the element, then change the first value of createAnnotationsFromPixelClassifier (l.145) into a slightly lower value than the area volume you just annotated.
- **White area inside of the section isn't taken into account and you want to quantify it.** The GenerationGridCross.groovy script sees it as an area too big and devoid of elements and doesn't count it as the part of the outlined section. To take into account the large white areas in the center of a closed off section, increase the second value of createAnnotationsFromPixelClassifier (l.145).
- **The GenerationGridCross.groovy script can't outline the desired area or outlines only parts of the histological section.** The histological section you are trying to outline is most likely not closed off, with scattered elements surrounded by white areas. You will have to manually outline the area by creating a closed annotation (□ ○ ↶ ↷). Then, in the GenerationGridCross.groovy script, comment the line generating the outlined area (createAnnotationsFromPixelClassifier l.145) by adding '//' at the beginning of the line. This will add the counting grid (blue crosses) in the manually outlined area.

```

131
132 }
133
134
135 /* .....
136
137
138 .....
139 */
140
141 setImageType('BRIGHTFIELD_OTHER');
142 setColorDeconvolutionStains(['Name' : "H-DAB default", "Stain 1" : "Hematoxylin", "Values 1" :
143 resetSelection();
144 //createAnnotationsFromPixelClassifier("Tissue version 0.2.3", 1000000.0, 1000000.0)
145 //createAnnotationsFromPixelClassifier("Tissue", 30000.0, 100000000.0)
146 // application de la ROI
147 PathClassFactory.getPathClass("ROI")
148 getPathClass("ROI").setColor(getColorRGB(0, 0, 0))
149
150 for (annotation in getAnnotationObjects()) {
151     annotation.setPathClass(getPathClass("ROI"))
152     fireHierarchyUpdate()
153 }
154
155 /* .....
156
157
158 .....
159 */

```

3. Reading rules summary

Follicle identification

- **See lexicons for follicle descriptions**
- Doubt between 2 follicle types? **Check cell size**. Still in doubt? **U**
- No nucleus for **po1**, **po2**, **ldo** and **cao**? Classify under **U**
- No nucleus for **vtg**, **oih** and **ho**? **Identify the follicle**

Sample cross location

- 75%+ of the color? **Identify that structure**
- 50%-50% color? Prioritize the **colored structure**
- 50%-50 between 2 different follicles? **U**
- Cross on a theca? **Identify the follicle**
- Cross in a “white space” between a disconnected theca and its follicle? **Identify the follicle**
- Cross inside an empty but complete theca (the ‘inside’ of the cell has been ripped away)? **U**
- Cross near an incomplete theca? **Is can be used**. Still in doubt? **U**
- Less than 50% of the inside of a **vtg** or **ioh** follicle? Classify under **U**
- 2 structures overlap? **Identify the under most structure**. Still in doubt? **U**

Gonadal wall (gw)

- Cross between two layers of **GW** cells? Classify under **GW**
- Cross in the **GW** on muscle tissue? **GW**
- Cross in the **GW** on a blood cell or inside a blood vessel? Classify under **bv**
- Cross section is inside out with the **GW** in the middle? **GW for the entire zone**
- **GW** in a discolored zone? Classify under **GW**

Connective tissue (ct)

- Cross between a theca and **ct**? **Identify the follicle**
- Cross on a **ct** surrounding a **bv**? Classify under **ct**

Blood vessels (bv)

- 50%-50% on a **bv** and **ct**? Classify under **bv**
- Cross in a **bv** in the theca of a follicle? **Identify the follicle**
- Cross in the white of a blood vessel? Classify under **bv**
- Discolored blood cells? Classify under **bv**. Still in doubt? **U**

Intercellular space (is)

- “White space” between structures (outside of complete thecas or between **ct** pieces)? **Is**
- When the **GW** is broken and follicles are ‘out in the open’? Classify under **Is**
- When the **GW** is broken and follicles are ‘on the other side of the GW’? **Is**
- **GW** disconnected from the lamellas? **Is between GW and inner cellular structures**

Unnatural emptiness (E)

- **GW** is unbroken? **E between the last layer of GW cells and the sample outline**
- **GW** is broken with no follicles ‘outside’? Classify under **E**

Undetermined (U)

- Blurry structure? Classify under **U**
- Structure not found in the Lexicon? Classify under **U**
- Structures/Follicles in a discolored area? Classify under **U**
- Discolored area in the ovarian light? Classify under **U**
- **When in doubt, classify under U**

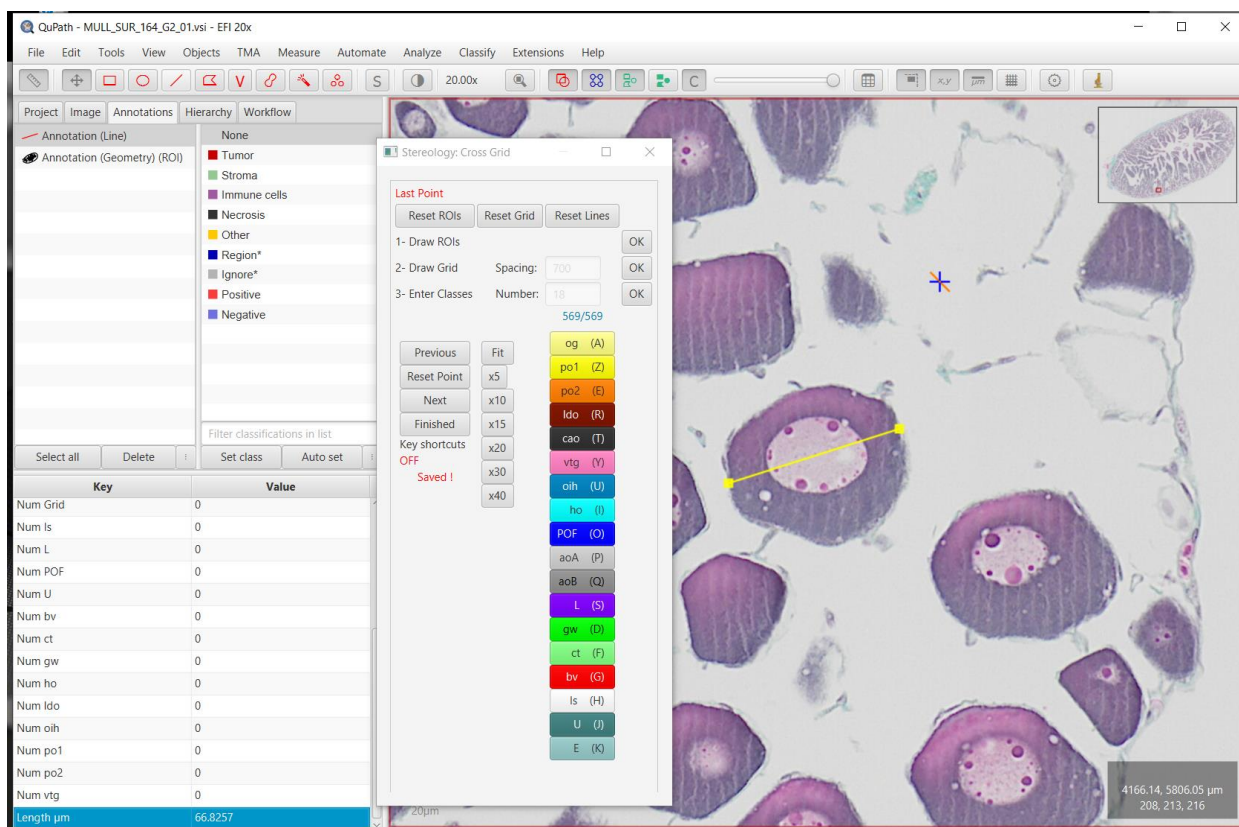


4. Structure identification

The list of the different cells and structures potentially present inside the ovaries are described within lexicons established for each individual species and may be found on the [Archimer](#) website. These lexicons allow the identification of the different cell types found throughout fish ovaries and are illustrated with pictures of « perfect looking cells ». Albeit, in a histological slide the presence of artefacts, deformed structures and poorly cut cells (no visible nucleus) are recurring problems.

4.1. Measuring cells

Other than the lexicons, in order to properly ascertain the different cell types, this software can be used to measure the structure that is to be identified. If the reader hesitates between two different cell types (like between **po1** and **po2**), it is possible to measure the oocyte in order to settle his choice.



36. Measuring a structure in QuPath :

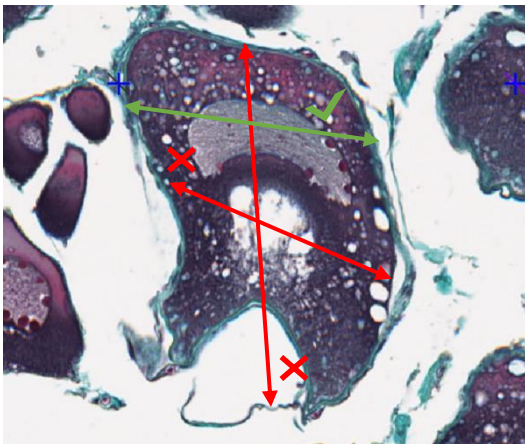
- Select the 'Line' icon (5th icon from the left in the top tool bar)
- Draw a line over the structure
- Select the 'Annotations' tab
- Scroll down to find the 'Length µm' row



The measurement of a follicle goes

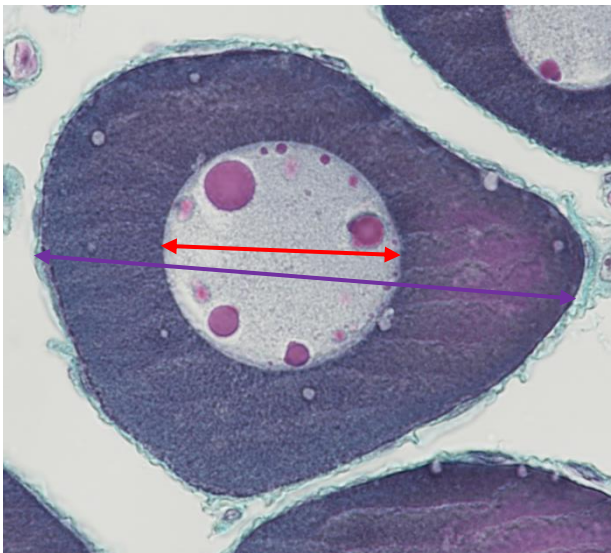
- **straight across the cell**
- from the **exterior membrane of the theca** to the other exterior membrane of **the same theca**
- while **passing over the nucleus**

If the follicle is distorted (ripped or stretched out), **do not measure in the direction of the distortion**



Measuring the cell can help with categorizing the cell type.

To measure a cell, go from the exterior cell layer of the theca to the opposite exterior cell layer of the theca, passing by the nucleus (center of the follicle). Avoid distorted, stretched or severed parts of the follicle

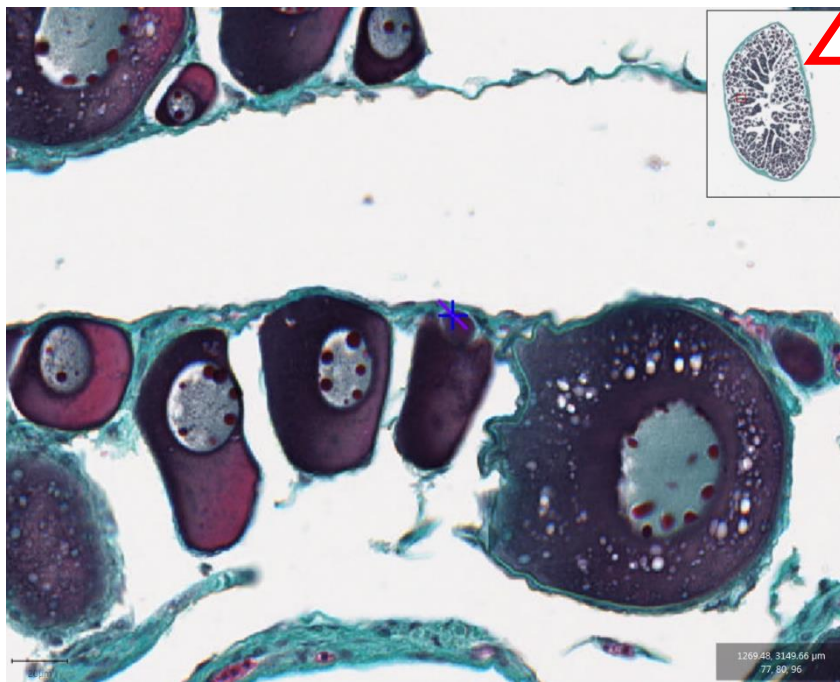


To measure the nucleo-cytoplasmic ratio, compare the diameter of the nucleus (red) with the diameter of the cytoplasm (purple).

Nucleus diameter is superior to 50% of the cytoplasm's diameter > **og** or **po1**

4.2. Follicle identification

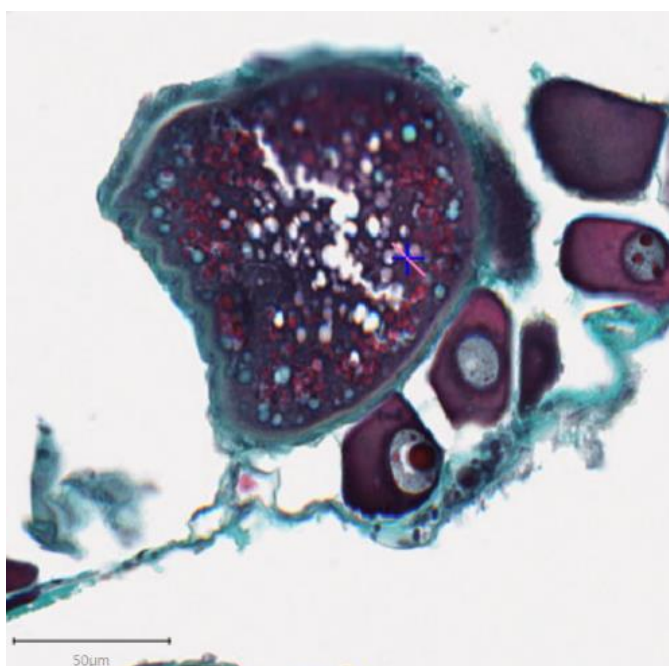
For a detailed description of the follicles and other cellular structures that may be found within the ovaries of a fish species, refer to the lexicon of the studied species. Lexicons for species studied under the **MATO** project may be found on the [Archimer](#) website.



Cross on a follicle with no visible nucleus. Put this cross in the **U** category.

Put into the **U** category the following follicles that do not have a nucleus : **po1**, **po2**, **ldo** or **cao**

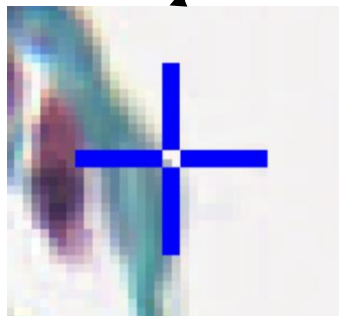
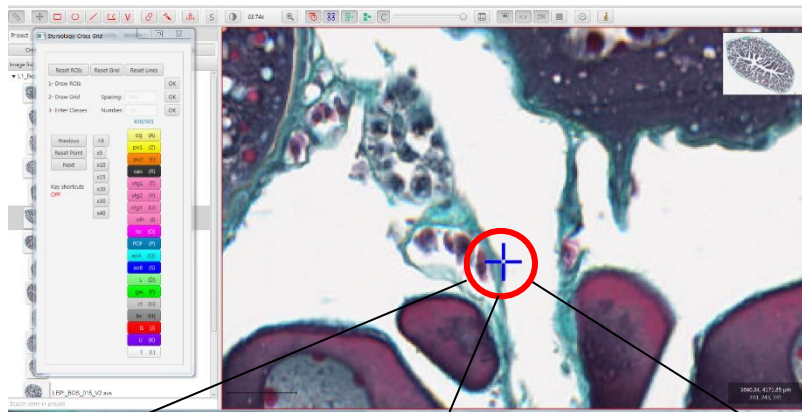
Measuring a follicle can help determine the cell type. If there is a doubt, mark the structure in the **U** category



The cross is on a follicle with no nucleus, but the green **zona pelucida** and presence of **vitellus droplets** confirms that this is a **vtg1**. Place this cross in the **vtg1** category

4.3. Sampling cross locations

The structures are identified by a blue cross (+), with a four pixel zone in its middle. These crosses are equidistant from one another, and the starting point of the grid is randomized at its creation. Each gonad has a sampling grid of 500 to 600 crosses. The center of the cross, on a 4 pixel-precise scale, is used to point out the structure that is to be identified.



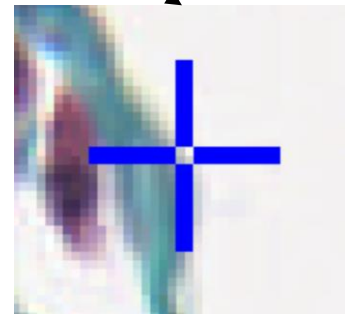
Zoom to the center of the cross.
 Colored pixels :
 75% white, 25% colored

The white structure dominates. Put the cross in the **ls** category



Zoom to the center of the cross.
 Colored pixels :
 50% white, 50% colored

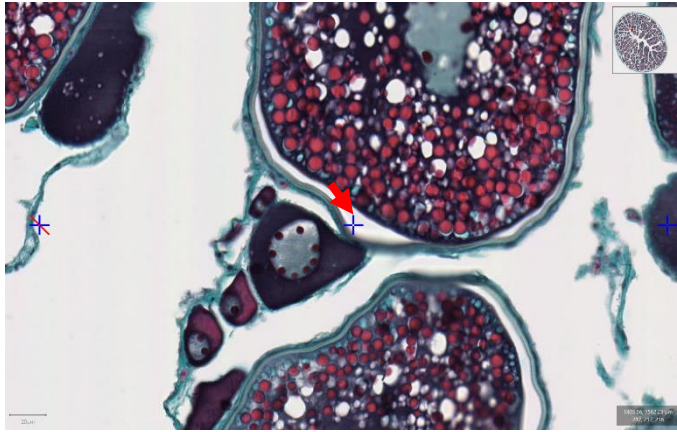
Always favor the colored structure, not the **ls**. Put the cross in the **ct** category




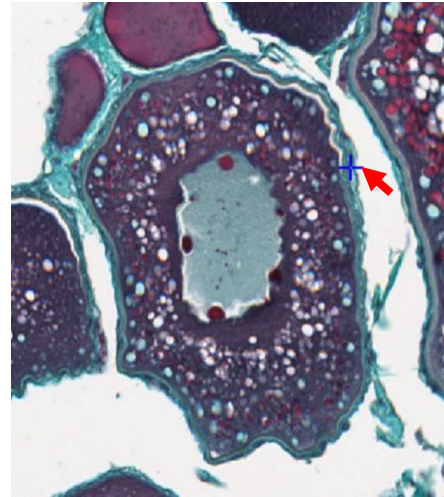
Zoom to the center of the cross.
 Colored pixels :
 25% white, 75% colored


The colored structure dominates. Put the cross in the **ct** category

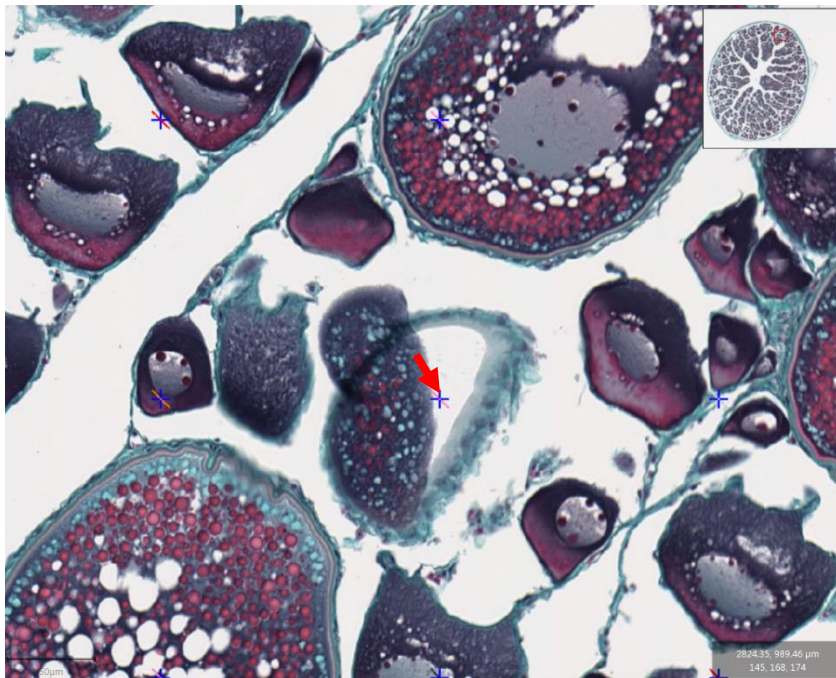
For this study, we will identify the **follicles**. This means that we will take into consideration the **oocyte** and its somatic tissue. If the center of a cross falls on the **theca** of an **oocyte**, we consider that the structure that is to be identified is the **oocyte encased inside this theca**.




Cross () in a “white space” between the **zr** and the **theca** of a **vtg1** follicle. Put this cross in the **vtg1** category

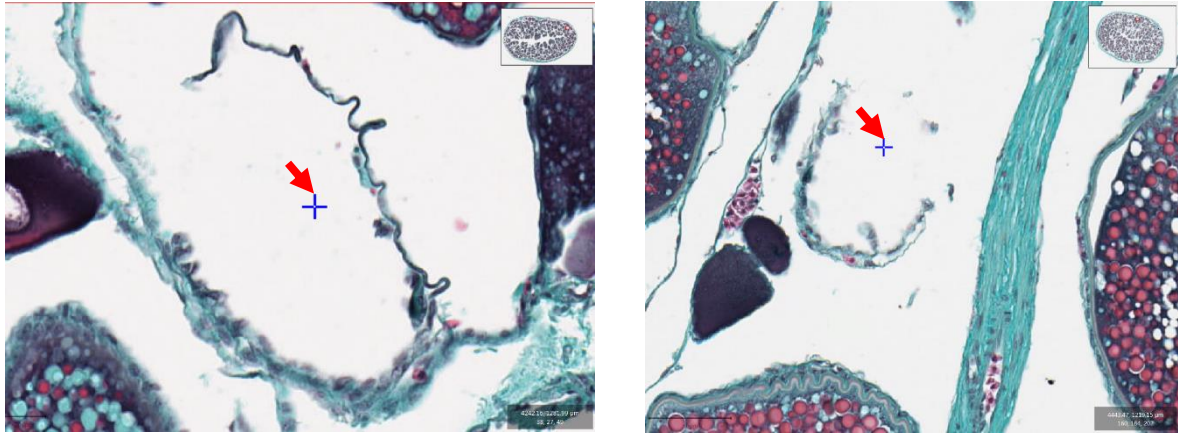


Cross () on the **theca** of a **vtg1** follicle. Put this cross in the **vtg1** category

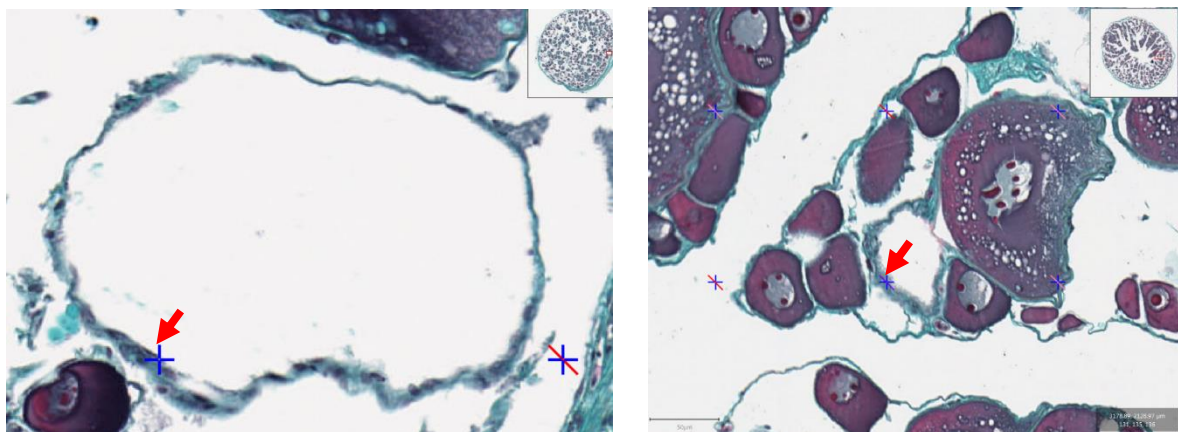


This cross () falls on “white space” left by the shift of the cellular contents of the follicle. In this case, the cellular contents are still attached to the follicular cells (**ct** + **theca**), allowing the reader to identify the follicle correctly (presence of **vitellus droplets**). Put this cross under the **vtg1** category

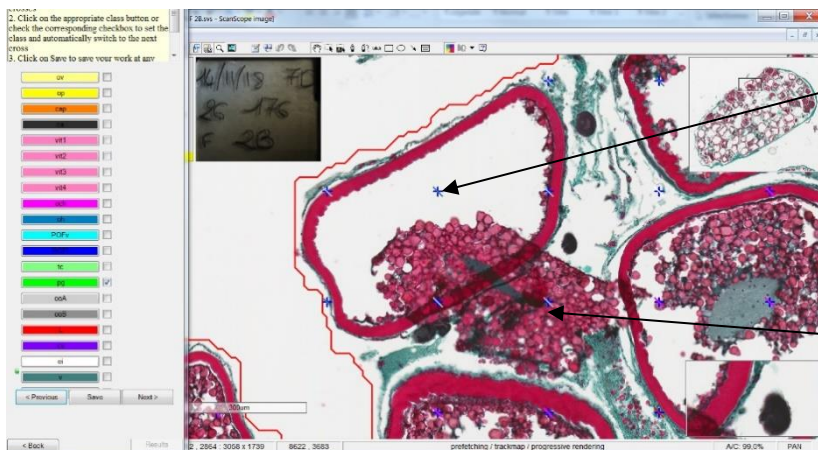
Moreover, if the cross falls between the **theca** and the **zona radiata** (with the **theca** detached from the **zona radiata**), we still identify the cross as being on the **follicle**.



Cross (↘) near an incomplete and broken piece of **theca**. Put this cross in the **Is** category. In doubt, put **U**



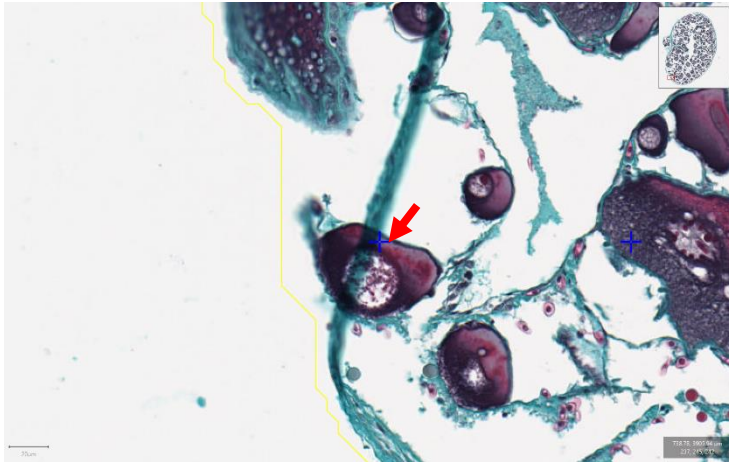
Cross (↘) on (or in) a complete **theca**. The oocyte was ripped away during the mounting, making it impossible to determine the cell type. Put this cross in the **U** category



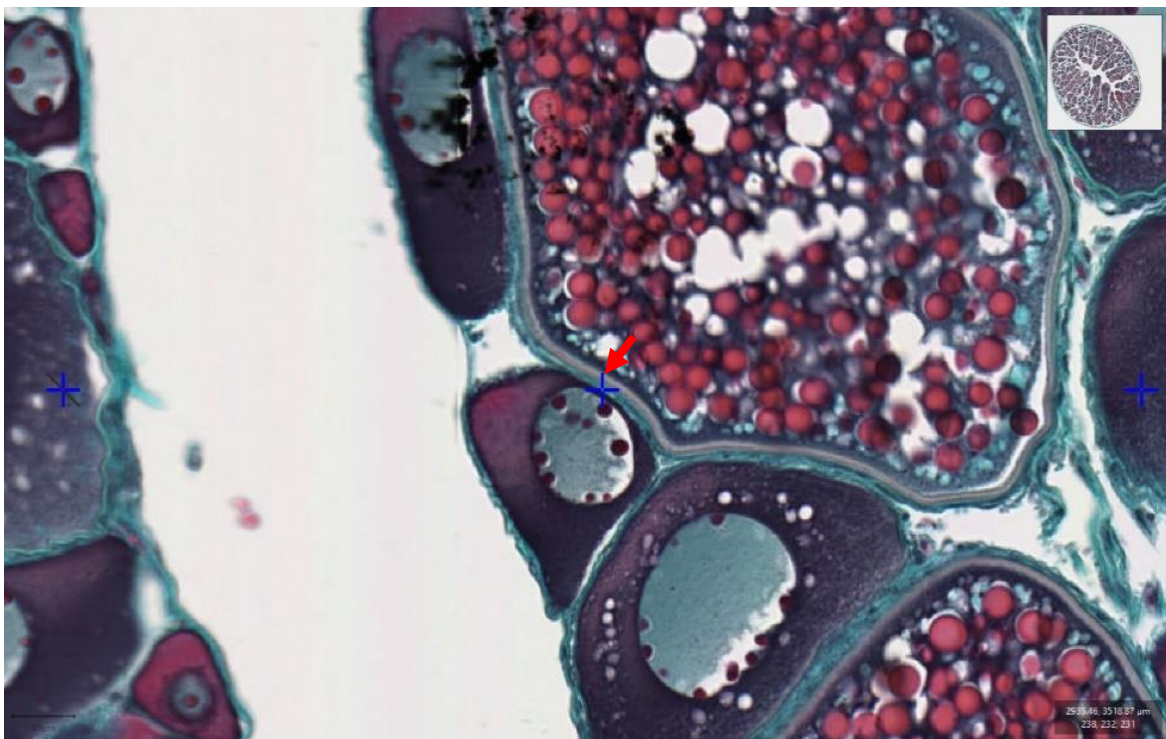
Cross inside a follicle with the **vd** that have started to shift out of the theca. Put this cross in the **vit4** category

Cross outside of the follicle's theca, but inside the shifted **vd**. Put this follicle in the underneath most category : **Is**

If a cross falls on a structure that is **covered entirely or partially by another structure**, (a cell may have been dislocated or the gonadal wall may have been folded over oocytes), **the structure to identify will be the one most underneath**.

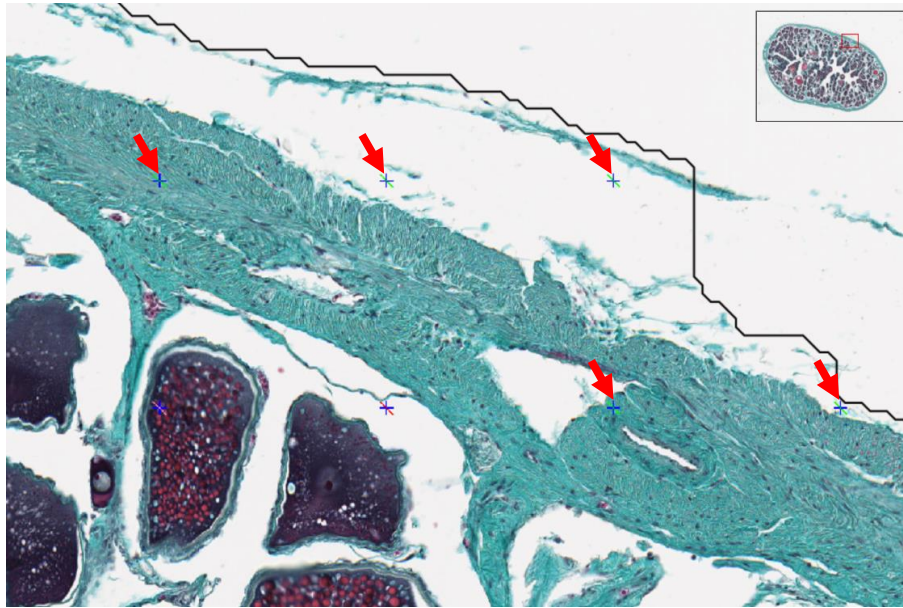


The cross (↙) falls on the gonadal wall (gw) that overlaps a po2 follicle. In this case, identify the underneath most structure. Put this cross under **po2**



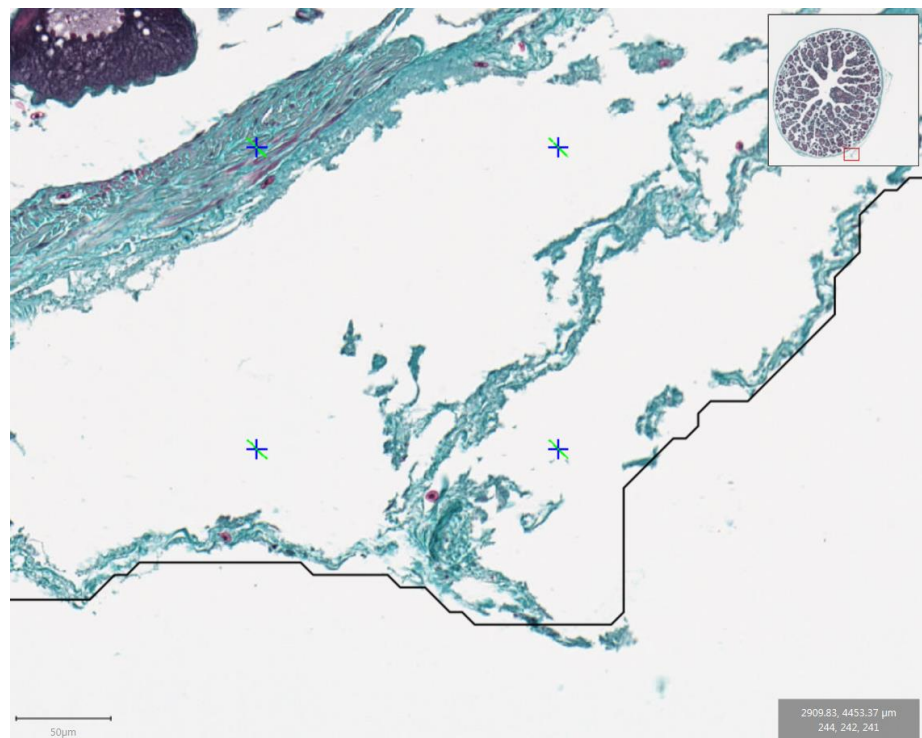
If a cross falls between two different follicle types (↙), place it under **U**

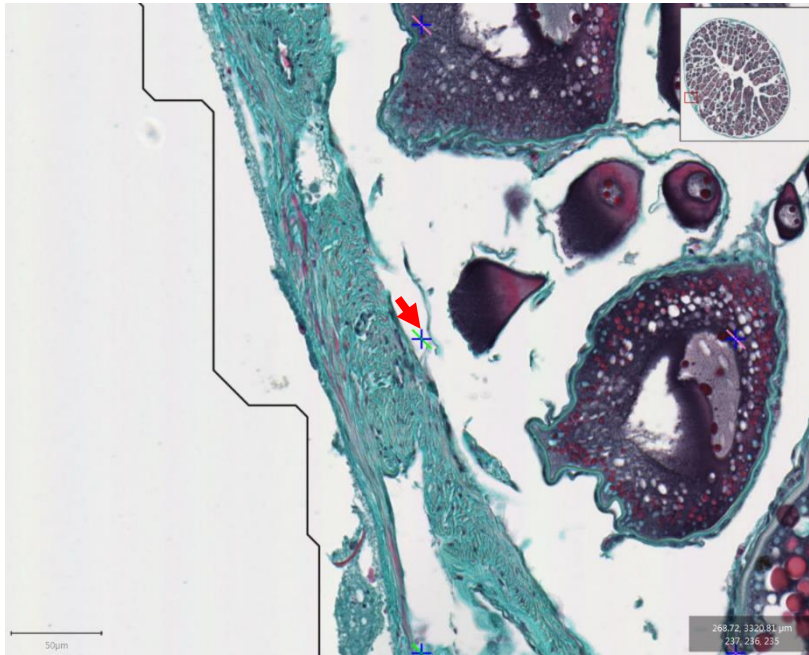
4.4. Gonadal wall (gw)



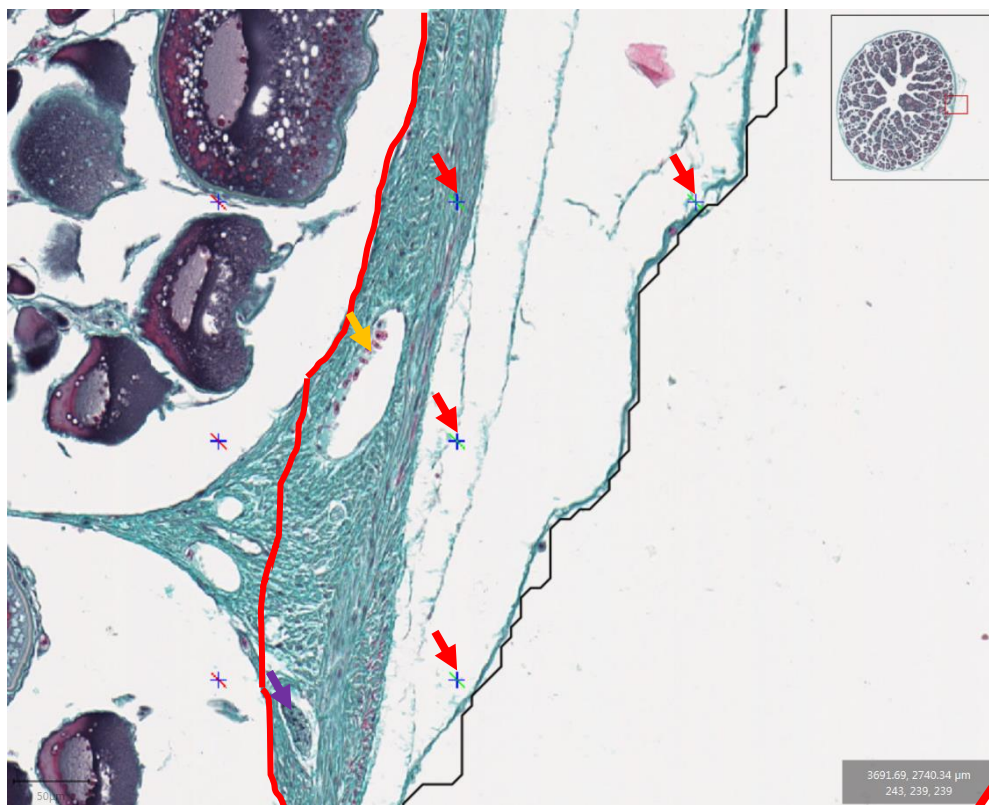
Crosses (↘) on the **gw**. The top right two crosses are under a layer of cell from the **gw**, so even if they are in a « white zone » they will be categorized as **gw**

All the crosses here are between the external and internal cell layer of the **gw**. Put all of these crosses into the **gw** category





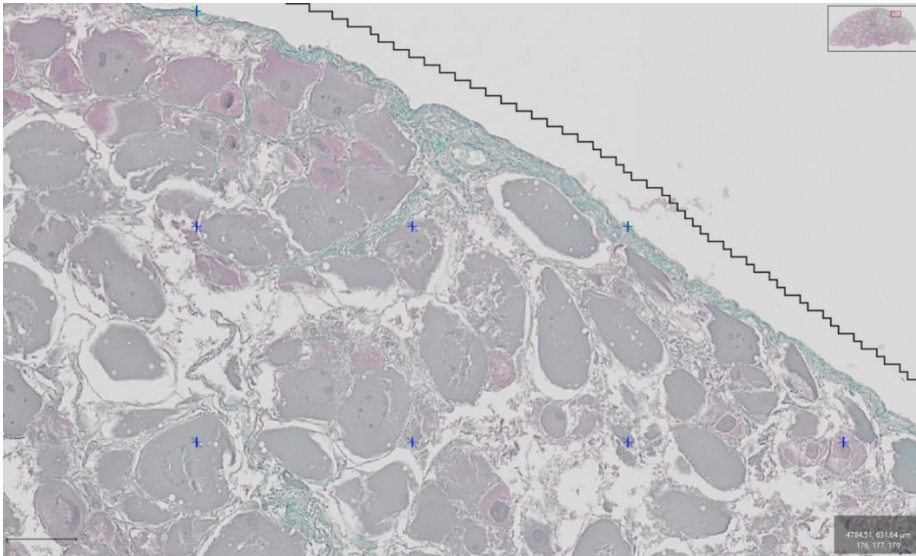
Cross (↘) under the inner most cell layer of the gw.



3691.69, 2740.34 µm
243, 239, 239

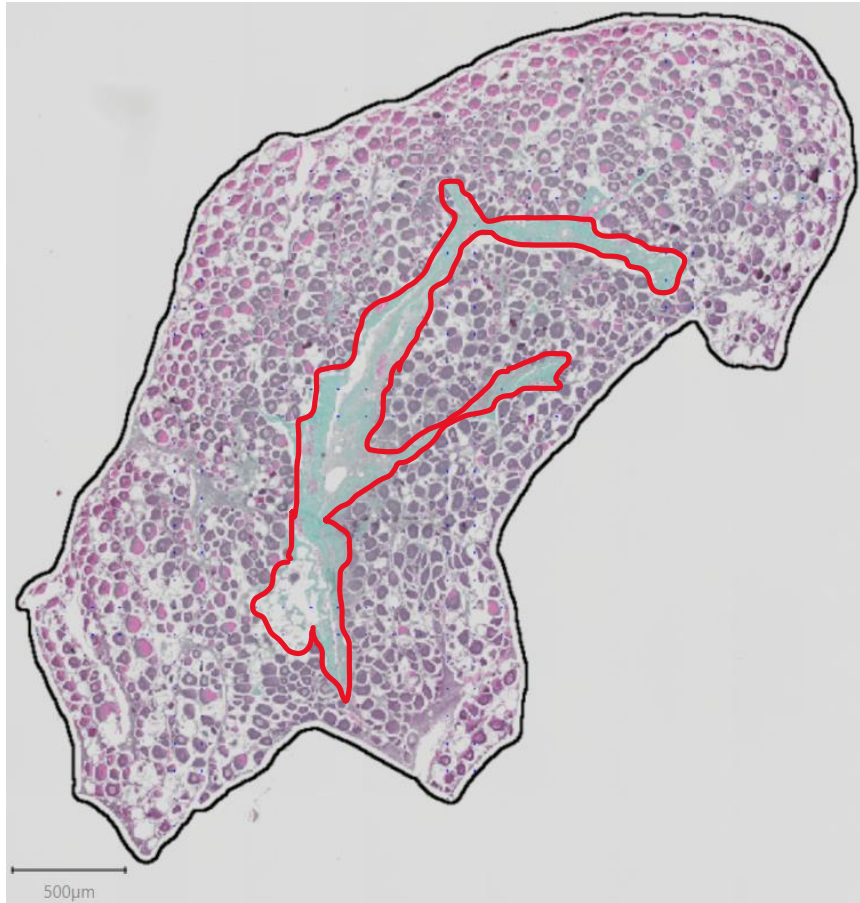


The ovarian lamellae are connected to the gonadal wall (gw) by connective tissue (ct). The gw ends where the ct enters the lamella. In this example, the gw is delimited by the red line. Crosses (↘) on gw tissue. If a cross falls on a muscle tissue (↙) inside the gw, put the cross in the gw category. If a cross falls on a blood vessel (bv / ↘) inside the gw, put this cross in bv category



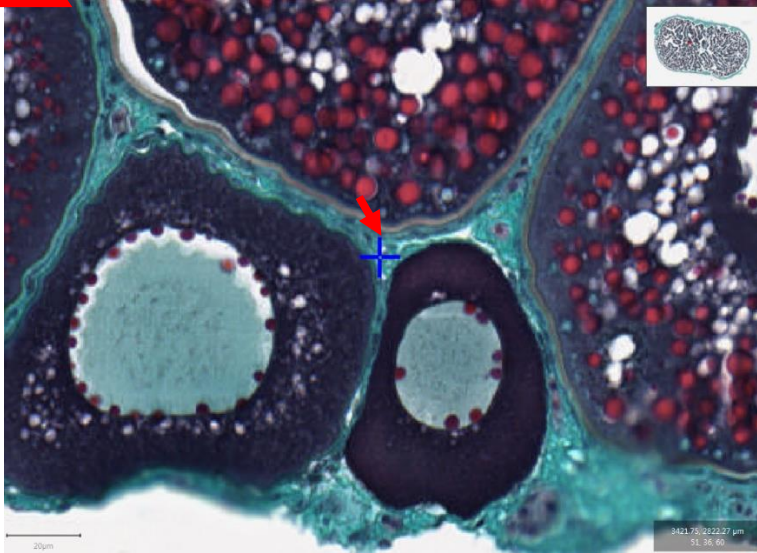
The area is discolored, but the **gw** will be properly visible and colored in green. Even in a discolored area, identify the **gw** if a cross falls on it.

The sample was flipped inside out, and the gonadal wall is now 'on the inside'. All crosses that fall in the area (outlined in red) should be classified under **gw**





4.5. Connective tissue (ct)



The cross () is on **ct**, between the **thecas** of the follicles. Put this cross in the **ct** category.

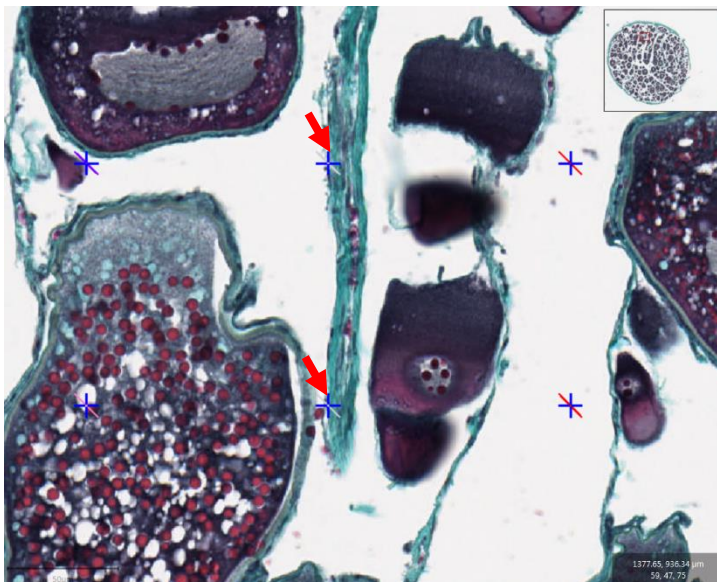
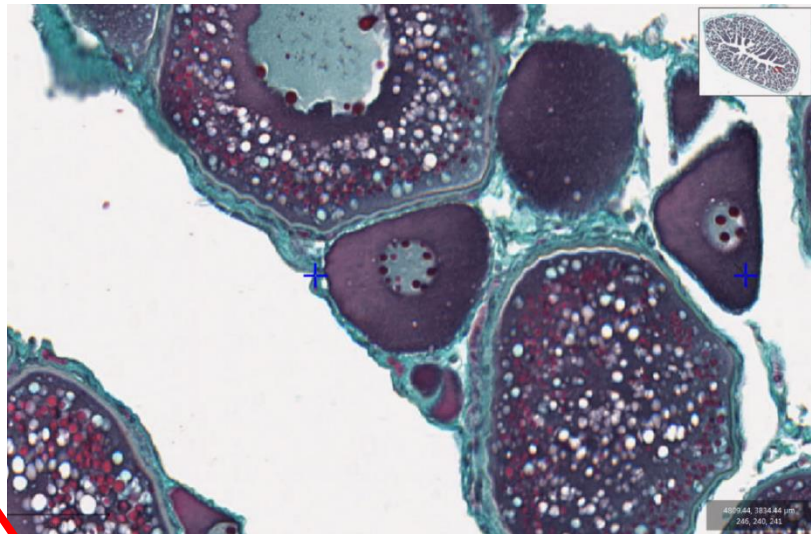
If it can not be determined whether the cross is on **ct** or on the **theca**, favor the follicle.

If it can not be determined where the cross falls when it is between two cells at different stages, put the cross under the **U** category

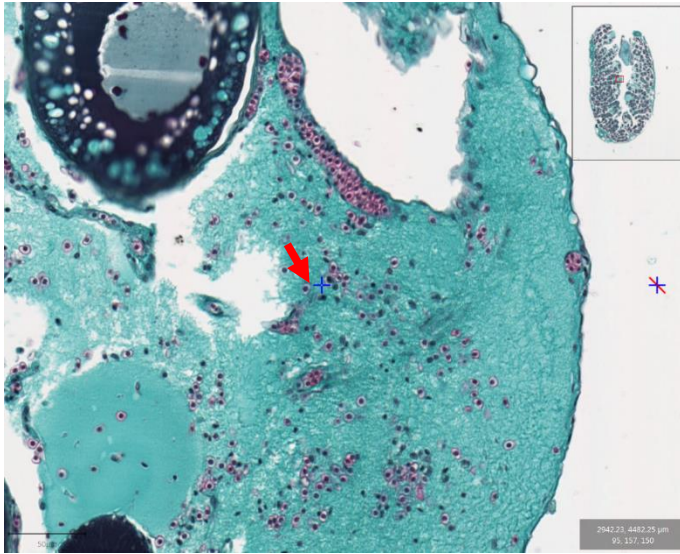
Do not confuse **ct** with the **theca!**

Here the cross is on the germinal epithelium that surrounds the cells into the ovarian lamella.

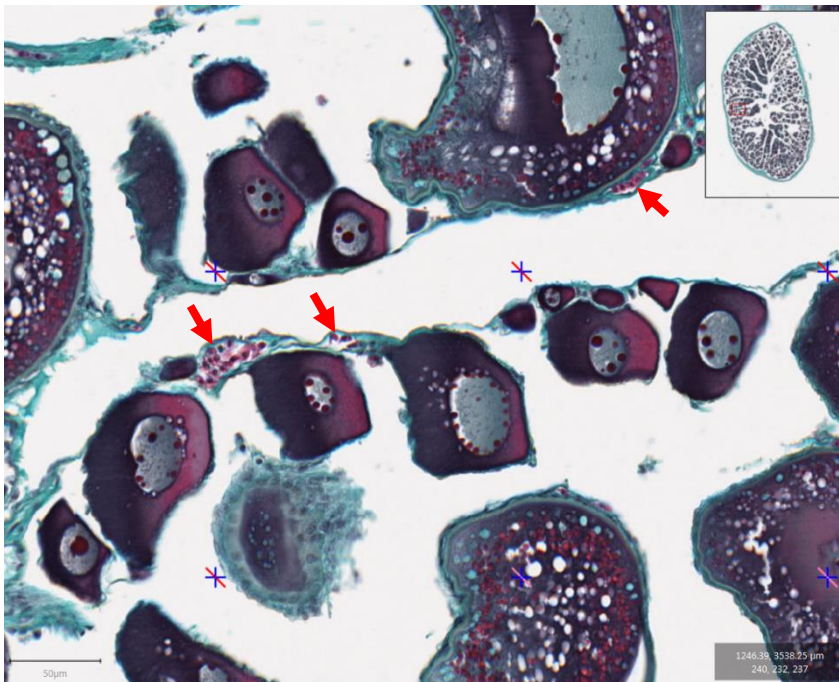
og, **po1** and **po2** follicles have a **theca**. **cao** and vitellogenic follicles have a **zr** and a **theca**. Put this cross in the **ct** category



These crosses () are on **ct**, near blood cells. If a cross had fallen on a blood cell, the category **bv** would have been selected. Here this is not the case, put these crosses in the **ct** category



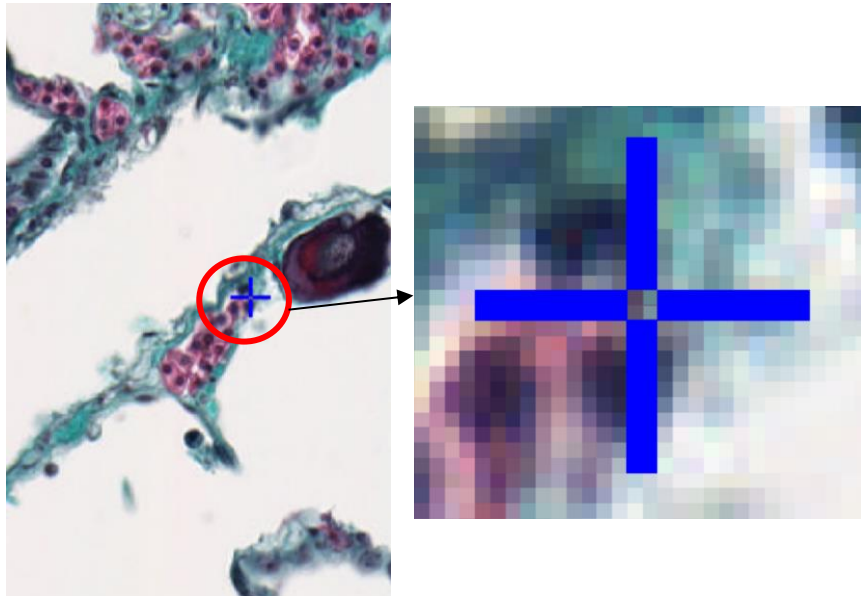
The cross (↯) is on **ct**, between blood cells. The blood cells seem to have been scattered within the lamella during the slide mount. If the cross had fallen on a blood cell, the category **bv** would have been selected. Here this is not the case, put this cross in the **ct** category



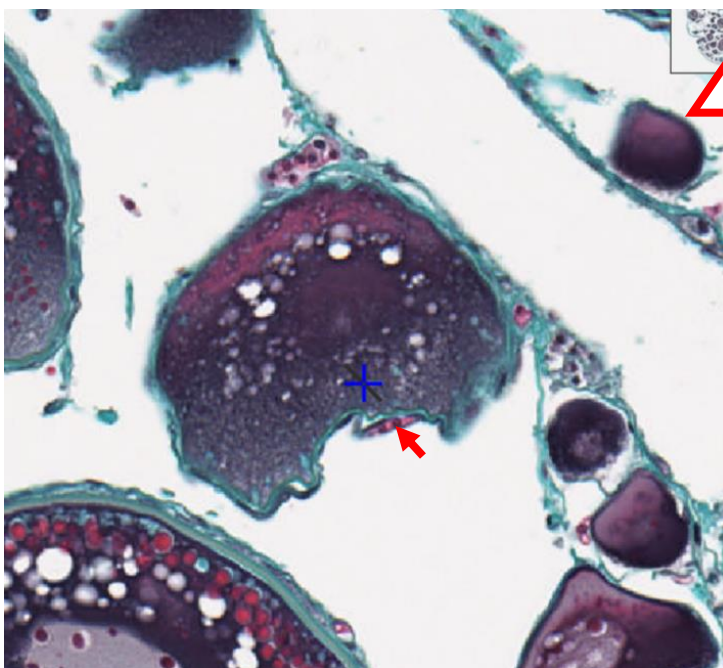
Blood vessels in **ct** (↯). If a cross falls on these, put it in the **ct** category

4.6. Blood vessels (bv)

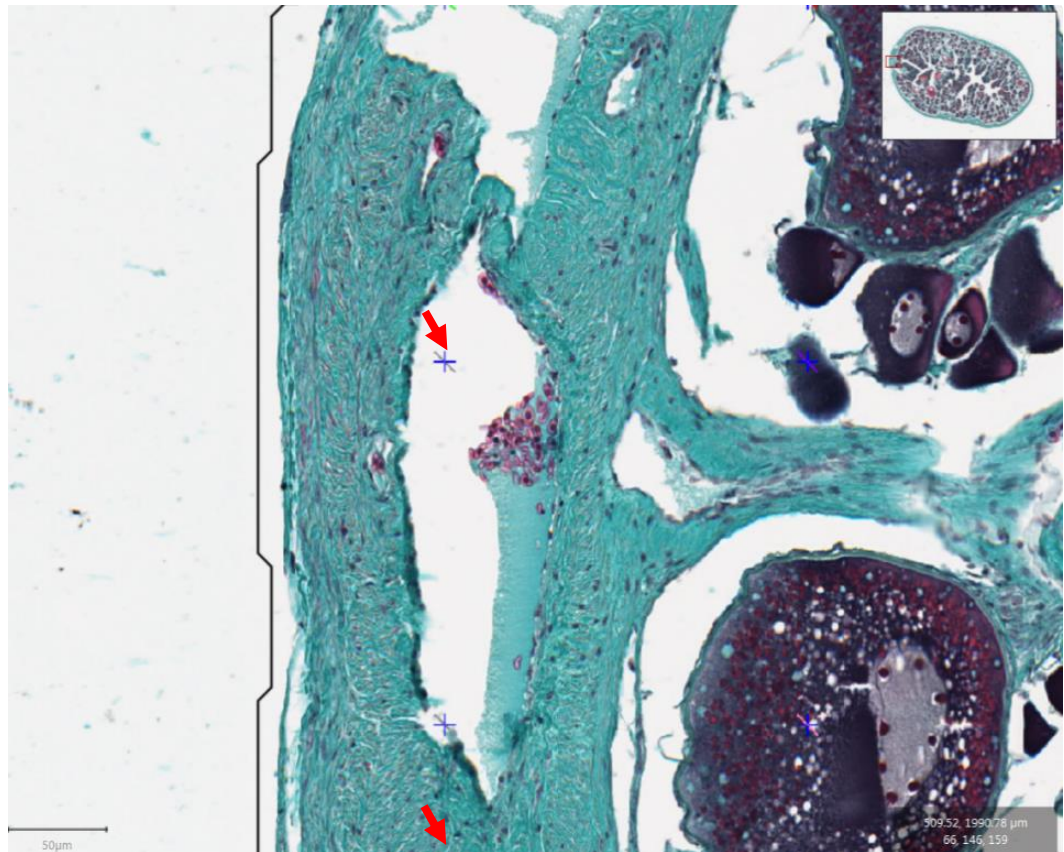
bv = blood capillaries and/or blood vessels and/or blood cells



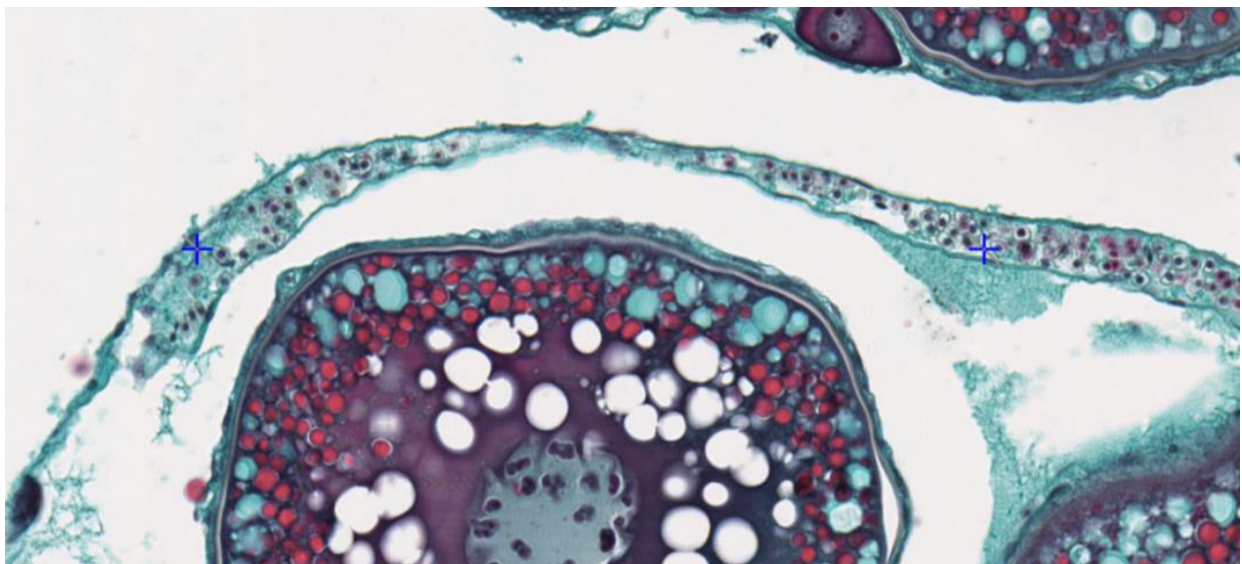
Cross on the edge of a blood vessel.
When zooming in, the cross has 50% red and 50% green.
Because the green can be the cell tissue forming the capillary vessel, it is considered part of the **bv** structure, not **ct**. Put this cross under the **bv** category



Blood vessel in the theca of an oocyte (↘). If a cross falls on this **bv**, classify it under the germinal cell's (**cao**) category

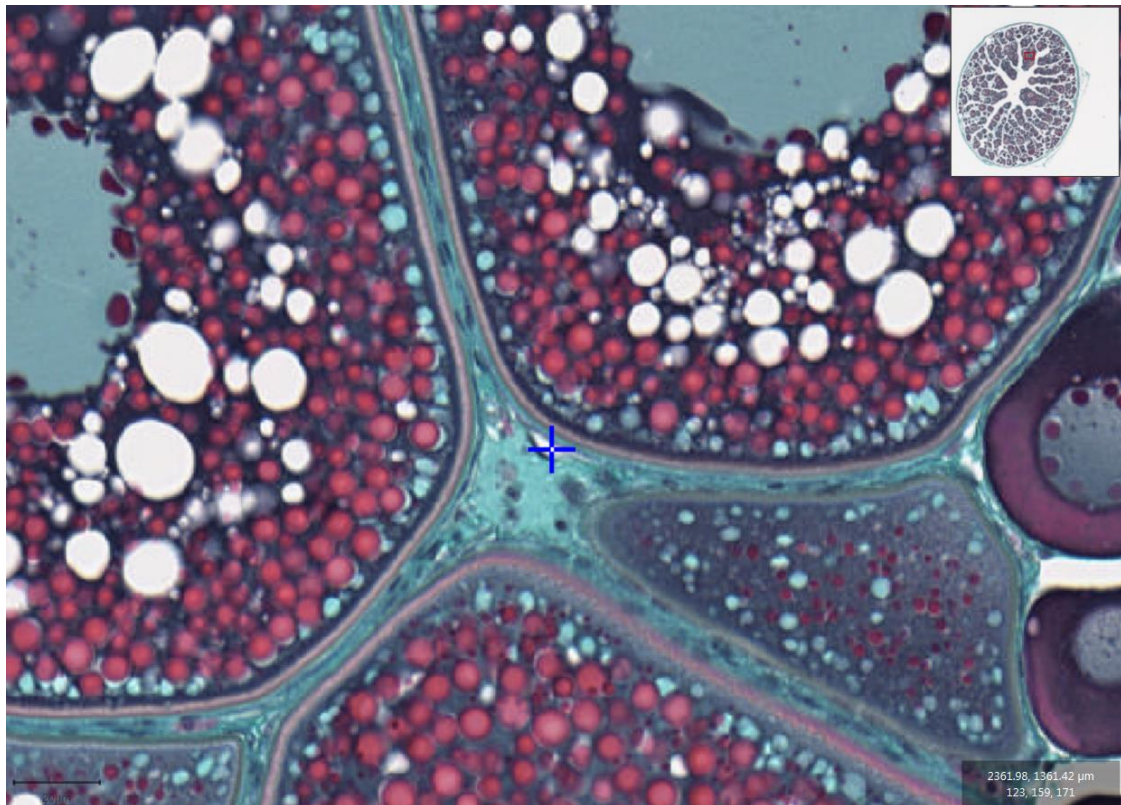


Crosses (↘) in a blood vessel in the **gw**. Put these crosses in the **bv** category



Two crosses in a blood vessel in **ct**, with blood cells that were partly colored. Put this cross in the **bv** category. If there is a doubt, these crosses may also be placed under the **U** category

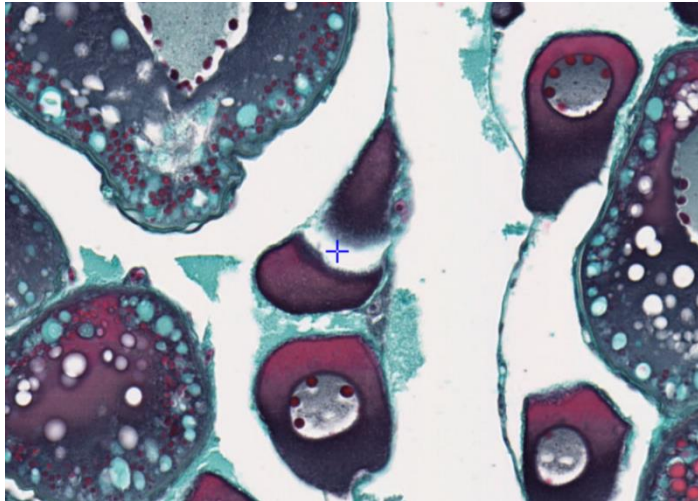
4.7. Intercellular space (Is)



Refer to the center of the cross (4 colored pixels) to determine if the cross is over **ct** or **Is**.

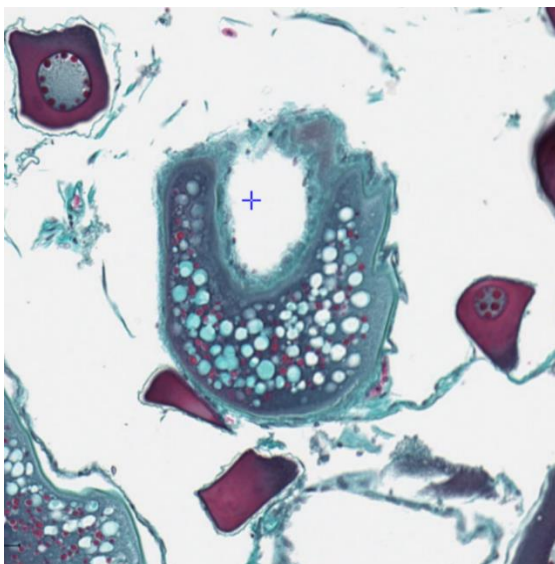
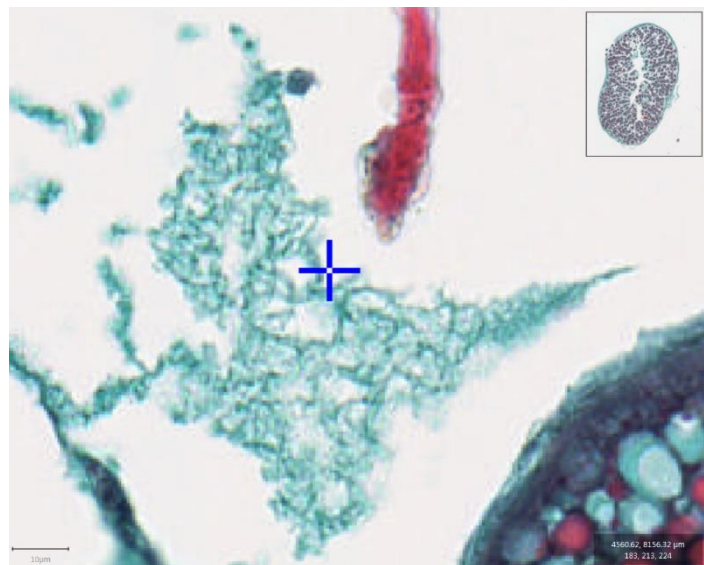


The cross seems surrounded by the **theca** and **ct**, but the **ct** is distorted and the cross falls on a “white zone”. Put this cross in the **Is** category. If there is a doubt, place the cross in the **U** category



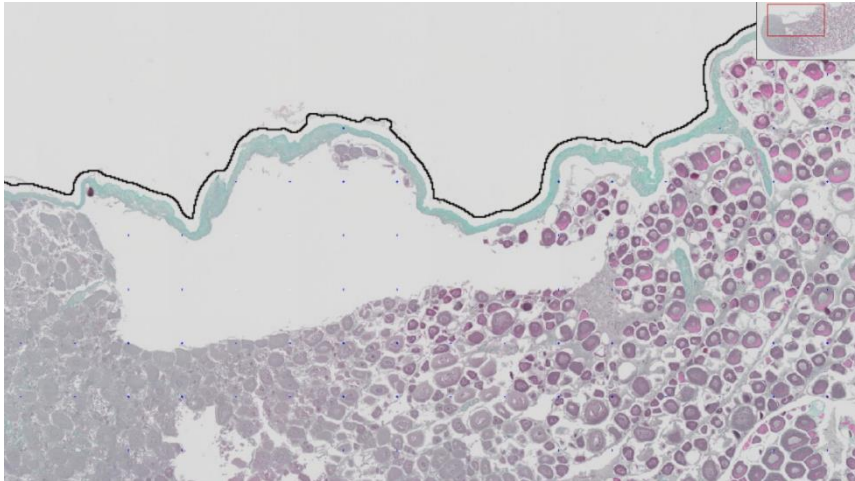
The cross lands between two structures. Put it in the **Is** category

Refer to the center of the cross (4 colored pixels) to determine if the cross is over **ct** or **Is**. Put this cross in the **Is** category

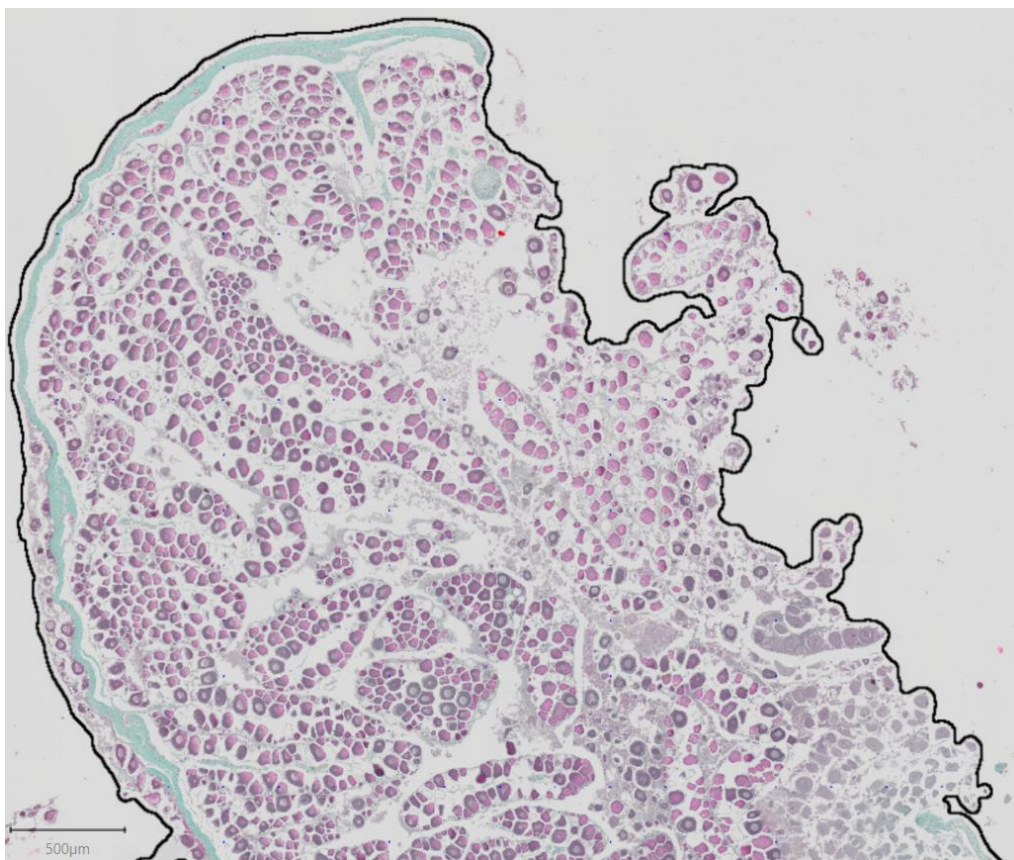


The cross seems surrounded by the theca, but the oocyte is distorted and the “white zone” the cross is in is not an area where the organelle have been ripped away, it is over **Is**. Put this cross in the **Is** category. If there is a doubt, this cross may be placed in the **U** category





The **gw** has been disconnected from the rest of the inner structures. All crosses that fall in this 'white area' that is still inside the gonad are to be classified under the **Is** category



When the **gw** is broken and cellular structures are 'pouring out':

- Classify all follicles, even the ones that are on the other side of the **gw**.
- All 'white space' between the follicles and gw are to be classified under **Is**. There will be no **E** category in this case

When the **gw** is broken but there are no follicles between the sample boundary and the **gw**:

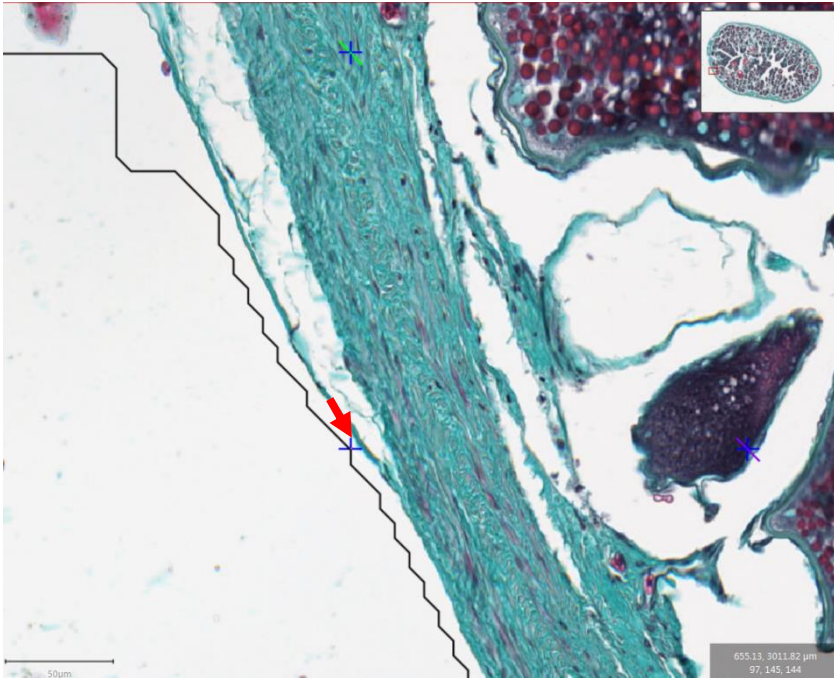
- Crosses found between the outer most cell layer of the **gw** and the sampling area (black line) are to be categorized under **E**

When the **gw** is complete:

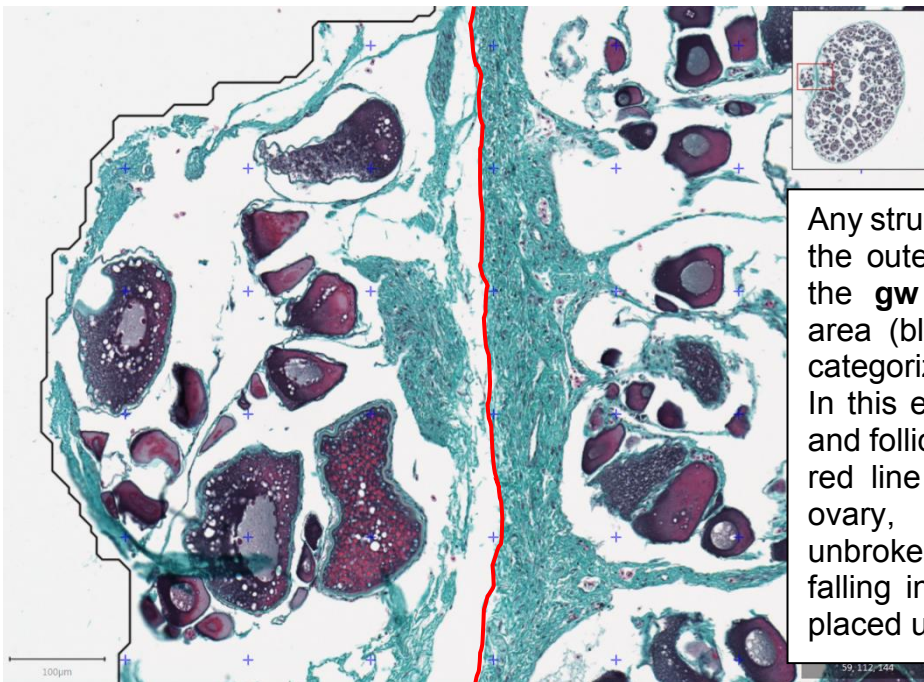
- Any structure found between the outer most cell layer of the **gw** and the sampling area (black line) are to be categorized under **E**.

4.8. Unnatural emptiness (E)

E = All zones outside of the ovarian boundary (i.e. gw)

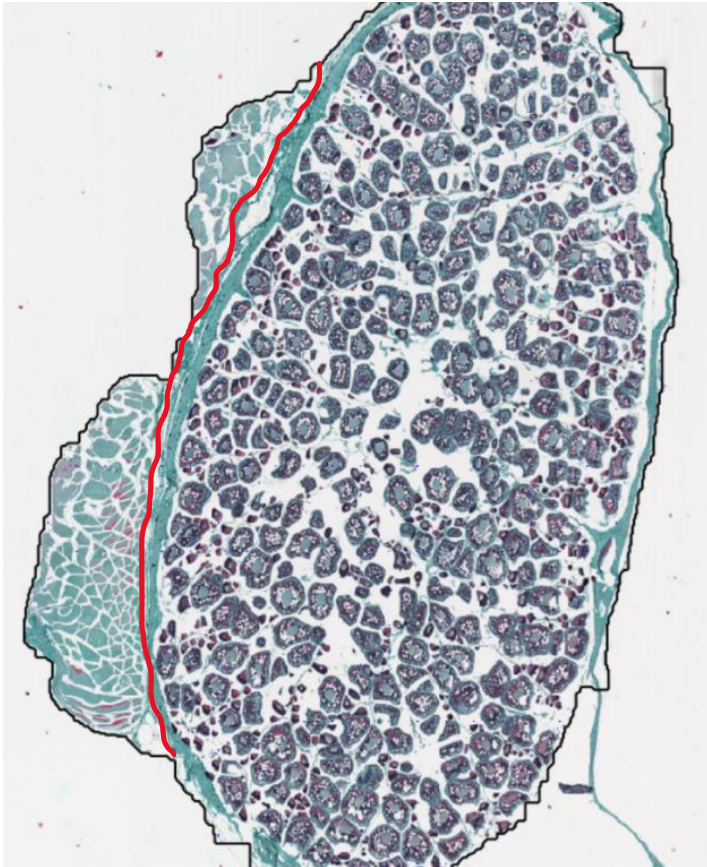


Cross (↯) outside of the outer layer of gw cells. Put this cross in the E category

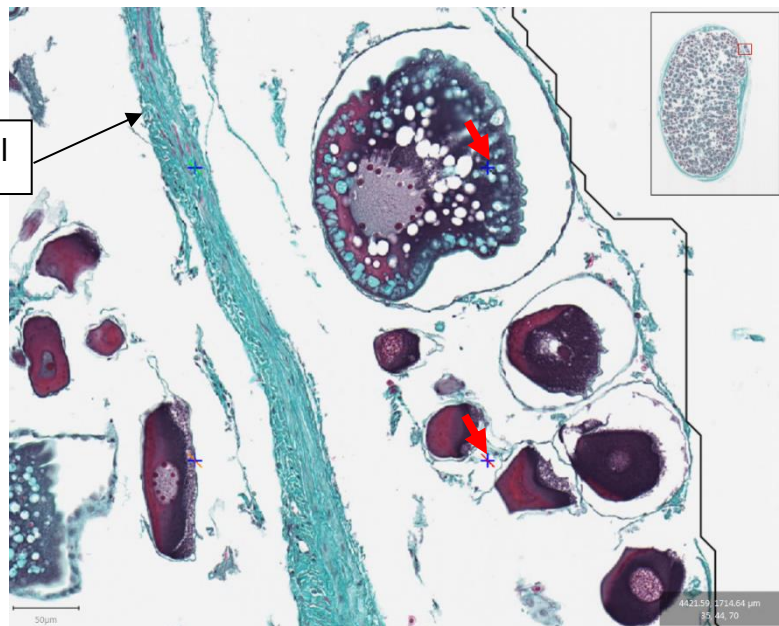


Any structure found between the outer most cell layer of the gw and the sampling area (black line) are to be categorized under E. In this example, the tissues and follicles on the left of the red line are outside of the ovary, delimited by the unbroken gw. Any cross falling in that area must be placed under the E category

Gonadal wall



Any structure found between the outer most cell layer of the **gw** and the sampling area (black line) are to be categorized under **E**. In this example, the tissue on the left of the red line is the mesovarium (tissue that connects the ovary to the coelomic cavity), and it is outside of the ovary, delimited by the unbroken **gw**. Any cross falling in that area must be placed under the **E** category



Gonadal wall

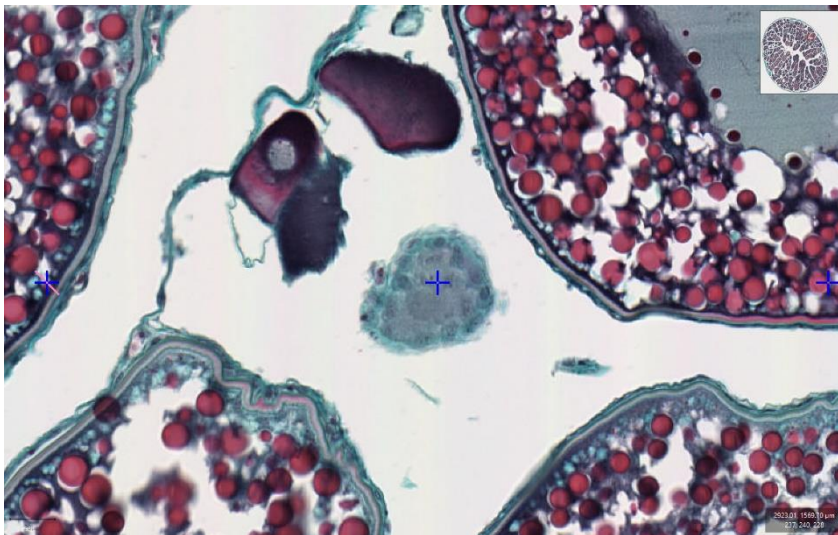
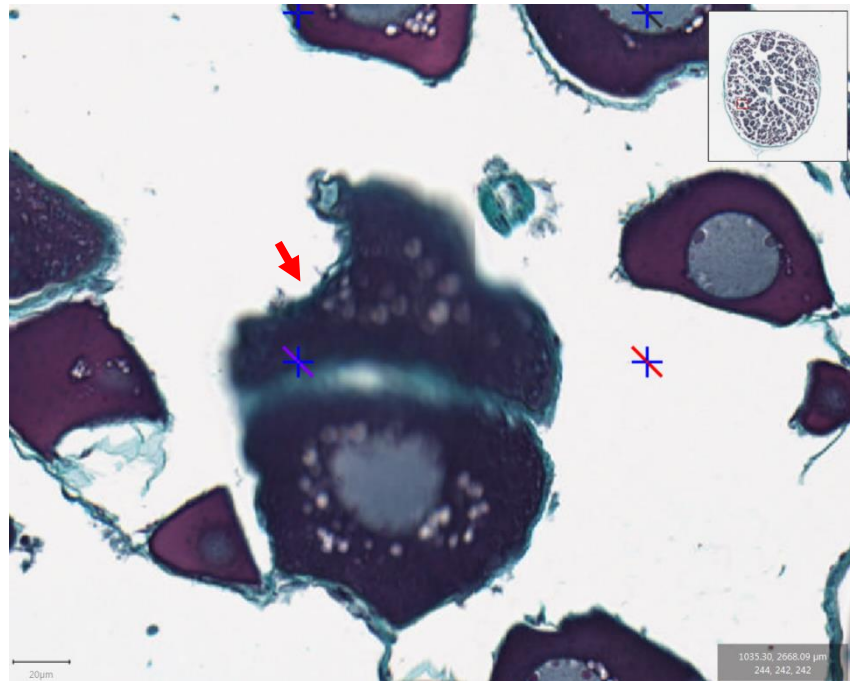
The follicles are outside of the ovary and the **gw** is intact, put these crosses (↘) in the **E** category.

If the follicles are outside of the ovary and the **gw** is intact, put them in the **E** category. If the follicles are outside the ovary but the **gw** is missing, select the cell type

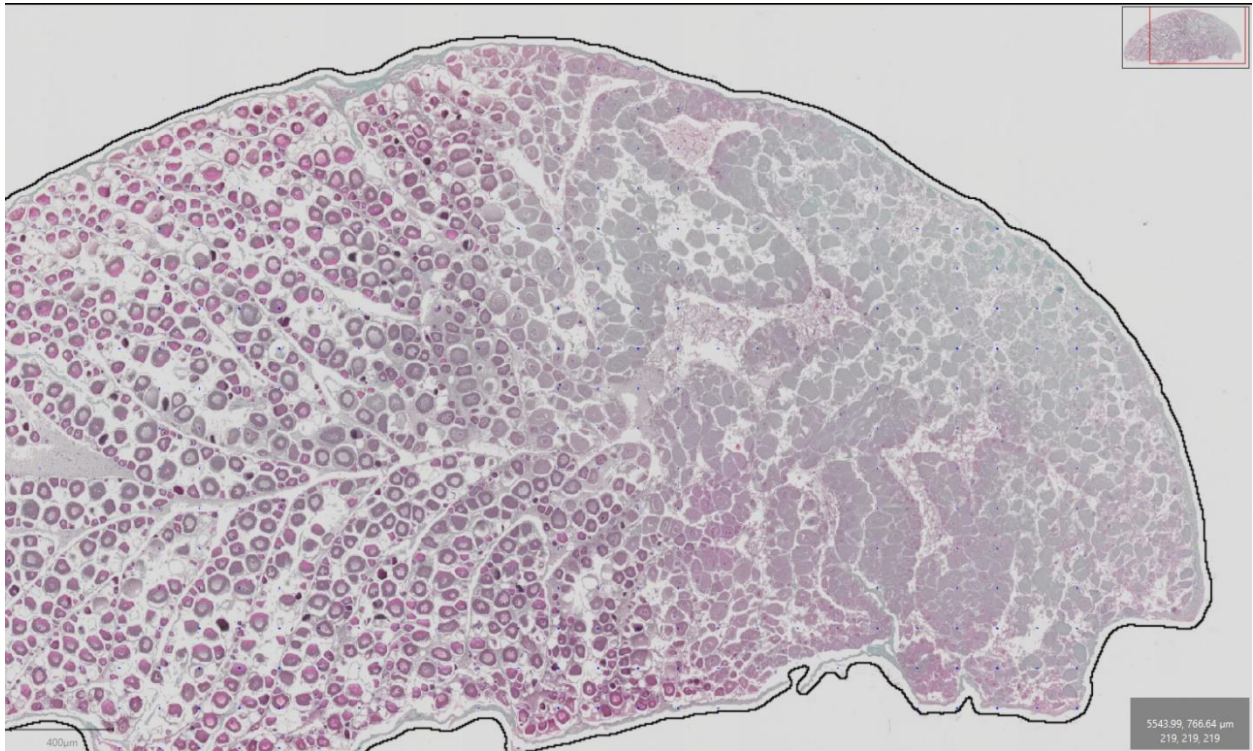


4.9. Undetermined (U)

Cross (↯) on a blurry structure. Put it in the **U** category



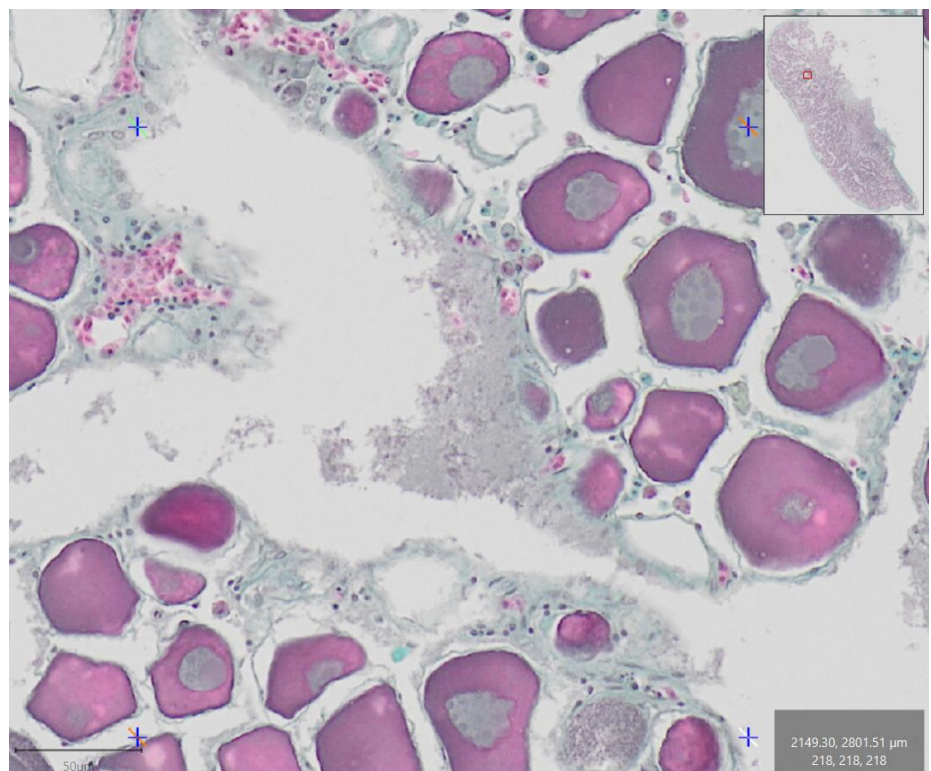
Structures that have not been identified in the protocol or in the lexicon must be placed in the **U** category



Discolored area : Some structures might be mislabeled without the help of coloration. If a structure is discolored, place it in the **U** category



Some discolored structures that can be found in the lumen may be confused with lysis. Place these discolored areas in the lumen under the **U** category



Bibliography

Bankhead, P. et al. (2017). **QuPath: Open source software for digital pathology image analysis**. Sci. Rep. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>

Brown-Peterson, N.J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B.J., Lowerre-Barbieri, S.K. (2011). **A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes**. Mar. Coast. Fish. 3, 52-70.

Gabe, M. (1968). **Techniques Histologiques**, 2nd ed., Masson.

ICES (2012). **Report of the Workshop for maturity staging chairs (WKMATCH) 11-15 June 2012, Split, Croatia**.

ICES (2017). **Report of the Workshop on Sexual Maturity staging from histological tools (WKMATHis) 19-21 September 2017, Caen, France**.

ICES (2018). **Report of the Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF) 30 April - 4 May 2018, Copenhagen, Denmark**. ICES CM/EOSG:38.

Quinquis, J., Adeline, B., Elie, N., Mahé, K. (2018). **Protocole de détermination des critères macroscopiques de gonades de poissons représentatifs des stades I et IIa en vue de leur discrimination à l'oeil nu**. <http://sih.ifremer.fr/>

Sauger, C., Quinquis, J., Dubroca, L., Parrad, S., Kellner, K., Heude-Berthelin, C. (2019). **Sample collection protocol for the extraction of female gonads in the megrim (*Lepidorhombus spp.*) for maturity staging through histology**. IFREMER, <https://doi.org/10.13155/70724>

Sauger, C., Kellner, K., Heude-Berthelin, C. (2020). **Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the four-spot megrim, *Lepidorhombus boscii* (Risso, 1810)**. IFREMER

Sauger, C., Quinquis, J., Kellner, K. et al (2020). **A macroscopic and stereological imaging dataset of *Pleuronectes platessa* ovaries**. *Sci Data* 7, 165. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0505-8>

Tyler, C.R., Sumpter, J.P. (1996). **Oocyte growth and development in teleosts**. Rev. Fish Biol. Fish., Chapman & Hall 6, 287-318.



Objective Maturity of Fish through Quantitative Histology

Abstract In Europe, fish stock management and assessment rely on data collected yearly during scientific campaigns. One biological parameter that is assessed is the sexual maturity phase, used to estimate the portion of spawning capable individuals. This parameter is used in the computation of indexes such as the length or age at which 50% of the population has reached sexual maturity (L_{50} or A_{50}), indexes used to set up indicators such as the Spawning Stock Biomass (SSB), the Spawning Potential Ratio (SPR) or the Minimum Legal Length (MLL). Classically, maturity phase determination is based on the visual observation of macroscopic criteria such as the general aspect of the gonad, its color and its texture, making the assessment subjective and error-prone. This PhD suggests an approach to determine accurately sexual maturity in females, while relying on objective criteria and quantifiable histological ovarian structures and using machine learning to facilitate sample analysis from offshore beam trawl surveys.

Multiple species of commercial interest were studied : the plaice (*Pleuronectes platessa*), the striped red mullet (*Mullus surmuletus*), the megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) and the four spot megrim (*Lepidorhombus bosci*). The first objective was to clarify cellular oogenesis descriptions for these species possessing little data and produce descriptive lexicons of their respective ovarian histology. Secondly, a stereological study allowed for the quantification of cellular structures found within the female gonad to determine a maturity phase. The reliability and reproducibility of these stereological readings was proven through multi-agent calibrations, but also through the sampling of sections at different levels of both ovaries. This method allowed for a monitoring of the oogenesis cycle of these species for a year and highlighted the difficulty of estimating without bias the maturity phase of individuals outside of the spawning period. The L_{50} and A_{50} in stereology were estimated and compared with values obtained through the more classical method by observing macroscopic criteria. For *P. platessa* : $L_{50 \text{ stereo}} = 20.6$ cm and $A_{50 \text{ stereo}} = 1.3$ years against the literature with a $L_{50 \text{ macros}} = 20.9$ cm and an $A_{50 \text{ macros}} = 3$ years. *M. surmuletus* : $L_{50 \text{ stereo}} = 22.9$ cm and $A_{50 \text{ stéréo}} = 1.5$ years against the literature with a $L_{50 \text{ macros}} = 16.9$ cm and an $A_{50 \text{ macros}} = 1$ year. *L. whiffiagonis* : $L_{50 \text{ stereo}} = 20$ cm and $A_{50 \text{ stereo}} = 2.1$ years against the literature with an $L_{50 \text{ macros}} = 24$ cm and an $A_{50 \text{ macros}} = 2$ years.

Though stereological analysis was proven reliable when estimating sexual maturity during spawning periods, the counting of the histological structures isn't easily implemented in the framework of regular monitorings. This is why the data acquired during this PhD was implemented into a deep learning algorithm to automate cellular identifications, yielding 77% of agreement for the maturity phase with stereology.

Estimating a reliable maturity phase of individuals allows for a short term monitoring of populations in their environment. In the long term, this data will also be useful to evaluate / describe the impact of various pressures on these same populations with the aim to set sustainable regulations for exploited stock species.

Key words : Sexual maturity, oogenesis, teleosts, stereology, deep learning

Maturité Objective des Poissons par l’Histologie Quantitative

Résumé En Europe, le suivi et la gestion des stocks de poissons reposent sur l’acquisition de données récoltées annuellement lors de campagnes en mer. Un des paramètres biologiques analysé est la phase de maturité sexuelle des individus afin d’évaluer la proportion d’individus capables de se reproduire. Cette mesure permet le calcul d’indices tels que la longueur ou l’âge auquel 50% des individus atteignent la maturité sexuelle (L_{50} ou A_{50}), indices utilisés dans la mise en place des indicateurs que sont la biomasse reproductrice du stock (SSB), le rapport potentiel de frai (SPR) ou encore les Longueurs Minimales de Captures (LMC). Classiquement, la détermination de la phase de maturité repose sur l’observation de critères macroscopiques tels que l’aspect général de la gonade, sa couleur et sa texture, rendant l’évaluation subjective et source d’erreurs. Cette thèse propose une approche pour déterminer avec précision la maturité sexuelle chez les femelles, en s’appuyant sur des critères objectifs et quantifiables des structures histologiques de la gonade, et en ayant recours à l’apprentissage automatique pour faciliter l’analyse des échantillons provenant des campagnes de suivi.

Plusieurs espèces d’intérêt commercial ont été étudiées : la plie (*Pleuronectes platessa*), le rouget barbet de roche (*Mullus surmuletus*), la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*) et la cardine quatre taches (*Lepidorhombus boscii*). Le premier objectif était de préciser la description cellulaire de l’ovogenèse de ces espèces peu décrites et de réaliser des lexiques descriptifs de l’histologie ovarienne de chaque espèce. Dans un deuxième temps, une étude stéréologique a permis de quantifier les structures présentes dans la gonade des femelles pour déterminer la phase de maturité. La fiabilité et la reproductibilité de la lecture stéréologique a été éprouvée par une calibration inter-agents, mais également sur des coupes réalisées à différents niveaux des deux ovaires. Cette méthode a permis le suivi de l’ovogenèse des espèces pendant un an et a soulevé la difficulté d’estimer sans biais la phase de maturité des individus en dehors des saisons de reproduction. Les L_{50} et A_{50} en stéréologie ont été calculés et comparés aux valeurs classiquement obtenues par observation des critères macroscopiques. Pour *P. platessa* : $L_{50 \text{ stéréo}} = 20.6 \text{ cm}$ et $A_{50 \text{ stéréo}} = 1.3 \text{ ans}$ contre la littérature donnant une $L_{50 \text{ macros}} = 20.9 \text{ cm}$ et un $A_{50 \text{ macros}} = 3 \text{ ans}$. *M. surmuletus* : $L_{50 \text{ stéréo}} = 22.9 \text{ cm}$ et $A_{50 \text{ stéréo}} = 1.5 \text{ ans}$ contre la littérature donnant une $L_{50 \text{ macros}} = 16.9 \text{ cm}$ et un $A_{50 \text{ macros}} = 1 \text{ an}$. *L. whiffiagonis* : $L_{50 \text{ stéréo}} = 20 \text{ cm}$ et $A_{50 \text{ stéréo}} = 2.1 \text{ ans}$ contre la littérature donnant une $L_{50 \text{ macros}} = 24 \text{ cm}$ et un $A_{50 \text{ macros}} = 2 \text{ ans}$.

Si l’analyse stéréologique s’est avérée fiable pour suivre la maturité pendant les saisons de reproduction, le comptage des structures histologique reste difficile à mettre en œuvre dans le cadre de suivis réguliers. C’est pourquoi les bases de données acquises dans le cadre de cette thèse ont été utilisées pour la mise en place d’un modèle d’apprentissage profond (deep learning) pour automatiser l’identification des cellules, obtenant 77% d’accord sur phase de maturité avec la stéréologie.

Déterminer de manière fiable la phase de maturité des individus permet à court terme le suivi des populations dans leur environnement. À plus long terme cette donnée sera également utile pour évaluer et décrire l’impact de pressions diverses sur ces mêmes populations dans un objectif d’appliquer des règles de gestions durables adaptées aux stocks exploités.

Mots clefs : Maturité sexuelle, ovogenèse, téléostéens, stéréologie, apprentissage supervisé