

Comment une approche histologique couplée à une analyse quantitative peut apporter des informations sur le cycle de reproduction de la sole (*Solea solea*) femelle

Adeline B. ¹, Dubreil E. ^{1,2}, Quinquis J. ², Elie N. ³, Kellner K. ¹, Heude Berthelin C. ¹

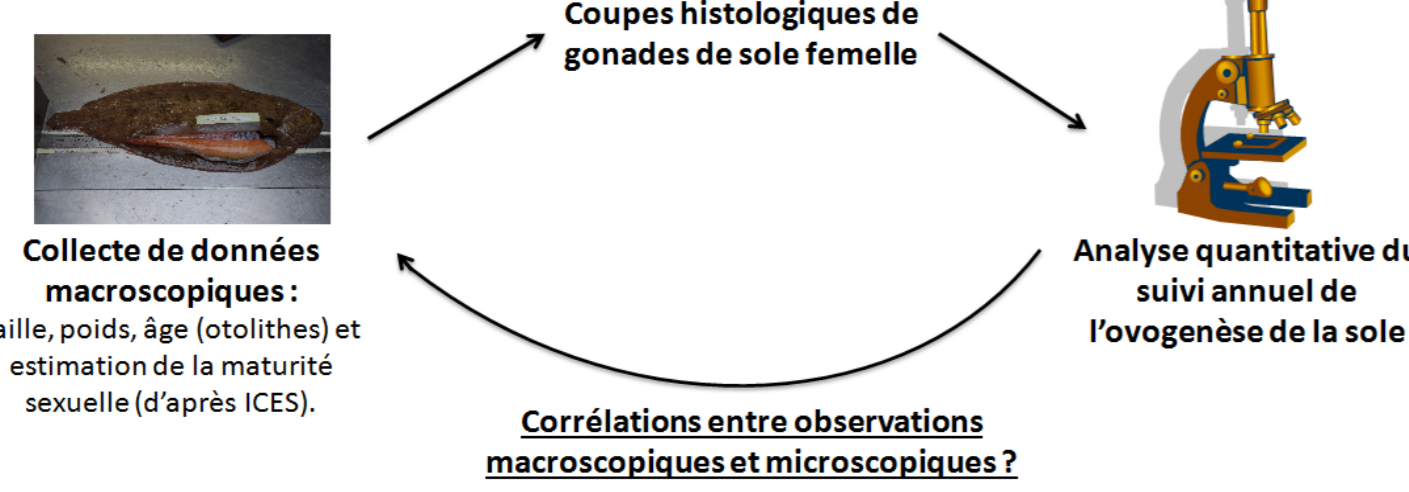
¹ UMR BOREA, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques, MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7208, IRD-207, Université de Caen Normandie

² IFREMER, Port en Bessin-Huppain, Normandie

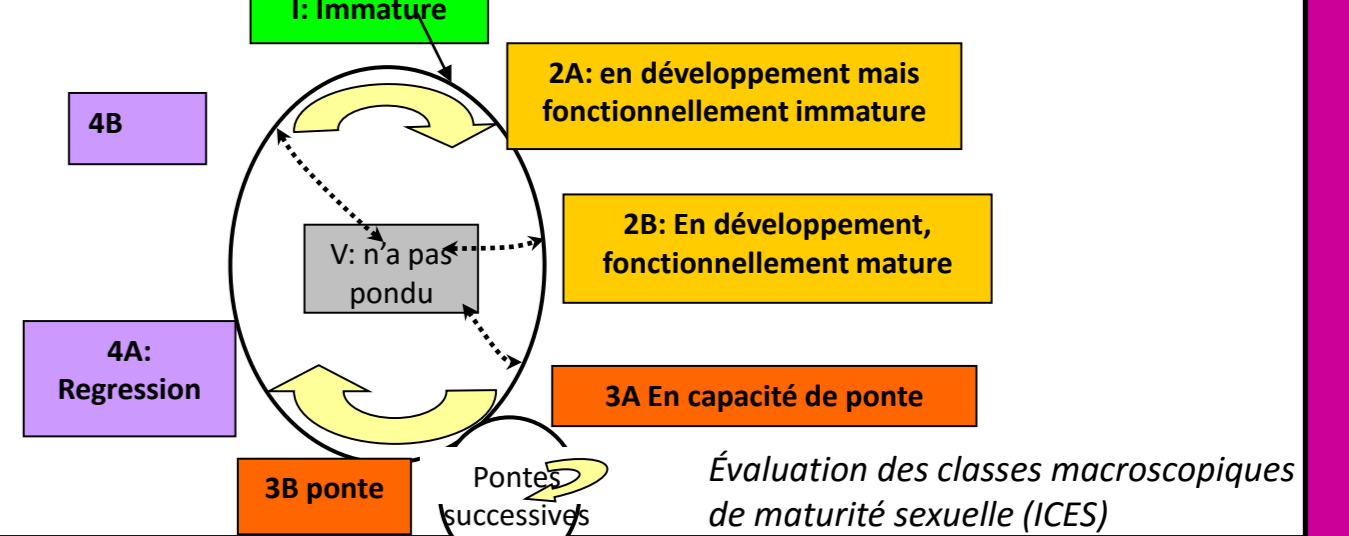
³ CMABio3, Centre de Microscopie Appliquée à la biologie, SFR ICORE, Université de Caen Normandie



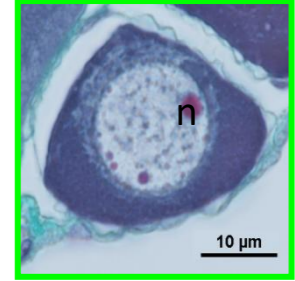
La sole commune *Solea solea* est une espèce commerciale de haute valeur ajoutée, dont les stocks halieutiques font l'objet d'un suivi. Deux critères importants entrant dans ce suivi sont l'âge et la taille auxquels la sole atteint sa maturité sexuelle. Actuellement, l'évaluation de la maturité par observation macroscopique de la gonade (taille, couleur, texture) est l'approche la plus courante. Les classes de maturité utilisées sont celles de l'ICES (International Council for Exploration of the Sea). Néanmoins ces classes macroscopiques atteignent leurs limites lorsqu'il s'agit de discriminer de jeunes individus immatures (I) de jeunes individus participant à l'effort de reproduction (IIb), seule une observation microscopique de la gonade permet de différencier ces deux catégories. Notre étude porte sur les soles femelles : le nombre d'ovocytes à l'issue de l'ovogenèse est représentatif du nombre potentiel de descendants et donc du recrutement. Le premier objectif de cette étude est de mettre en place une clé de détermination des cellules de la lignée germinale femelle en s'appuyant sur les données bibliographiques existantes (Brown-Peterson *et al.*, 2011 ; Lowerre-Barbieri *et al.*, 2011). Le second objectif est de mettre au point une méthode quantitative d'évaluation de la proportion de chaque type cellulaire présent dans l'ovaire de manière à déterminer quelles soles participent à la reproduction. Ces données seront mises en corrélation avec des données macroscopiques collectées lors d'un échantillonnage annuel sur des soles de différentes tailles en Manche Est (zone CIEM VIId).



Un échantillonnage de soles est réalisé du mois d'avril 2015 au mois de janvier 2016. Le stade de maturité est déterminé selon l'indice ICES d'après l'aspect macroscopique de la gonade (appréciation visuelle de la couleur, texture, taille de la gonade). Les soles sont mesurées, l'âge est déterminé par lecture des otolithes. Les ovaires sont coupés transversalement et les coupes sont colorées au trichrome de Prenant-Gabe. L'observation histologique permet de caractériser les cellules de la lignée germinale femelle. Toutes les lames sont scannées avec un Scanner Aperio CS. L'analyse quantitative est effectuée grâce au logiciel Image Scope – Stereology Toolkit. Les observations microscopiques et macroscopiques sont mises en corrélation.

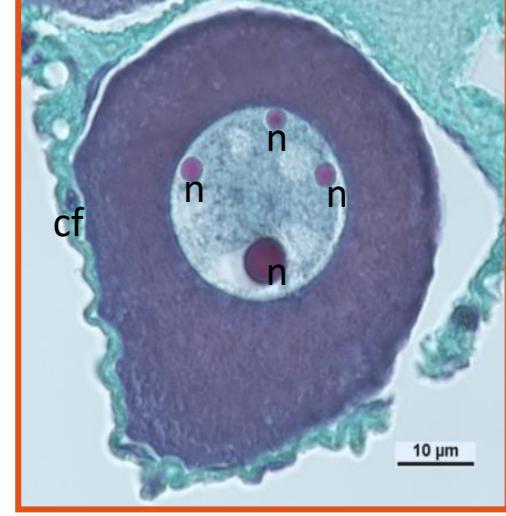


Clé de détermination des cellules de la lignée germinale de la sole femelle



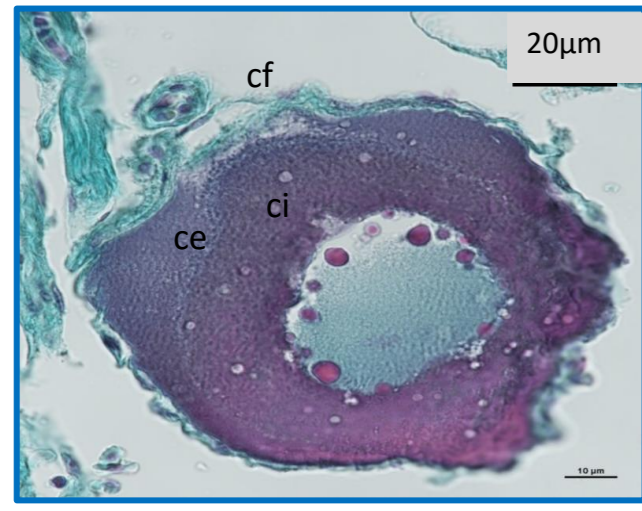
Ovogonies (ov)

Taille : 23,3 µm (± 3,8)
Elles sont localisées près de l'épithélium germinatif, leur cytoplasme est encore clair ou présente une zone claire, le noyau présente 1 ou 2 nucléoles (n). Rapport nucléo-cytoplasmique ≥0,5



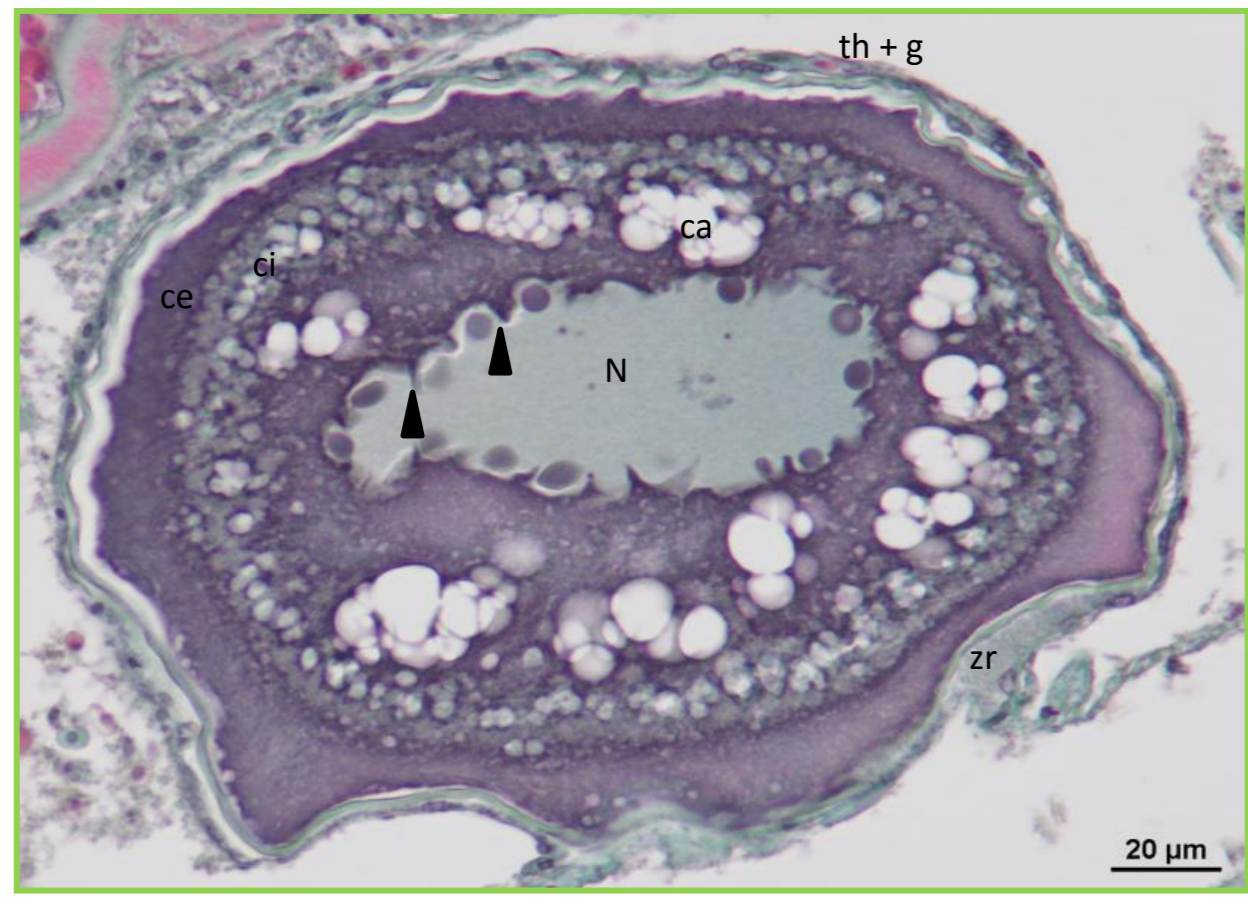
Ovocytes précoces (op)

Taille : 35,0 µm (± 8,9)
Leur noyau contient un gros ou plusieurs petits nucléoles (n). Le cytoplasme est homogène et dense. Rapport nucléo-cytoplasmique ≤0,5
Une couche de cellules folliculaires (cf) se met en place autour de l'ovocyte

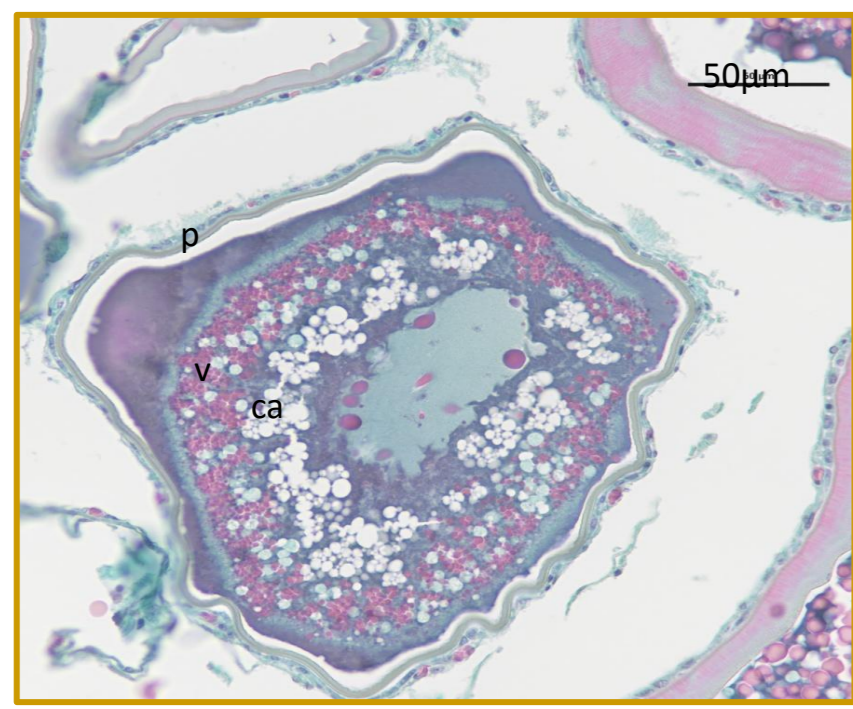
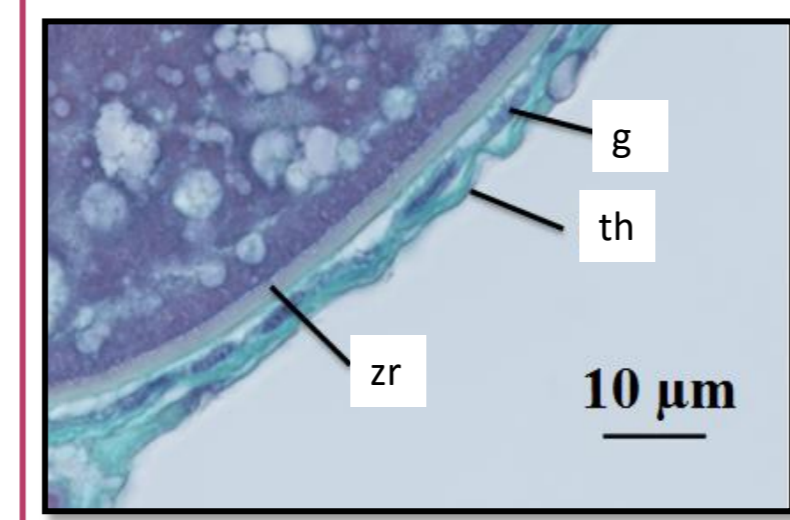


Ovocytes à vésicules corticales alvéolaires (« cortical alveolar »)

Le rapport nucléo-cytoplasmique diminue fortement. Les nucléoles sont localisés en périphérie du noyau, contre l'enveloppe nucléaire. Le noyau prend un aspect festonné (flèches). Le cytoplasme est scindé en 2 parties (interne ci, externe ce) d'aspects différents. Des vésicules corticales alvéolaires claires apparaissent progressivement dans la zone interne du cytoplasme.
Ovocyte « Cortical alveolar » précoce (cap) : Taille : 80,0 µm (± 30,1). Les 2 régions du cytoplasme sont peu distinctes, seules quelques vésicules sont visibles

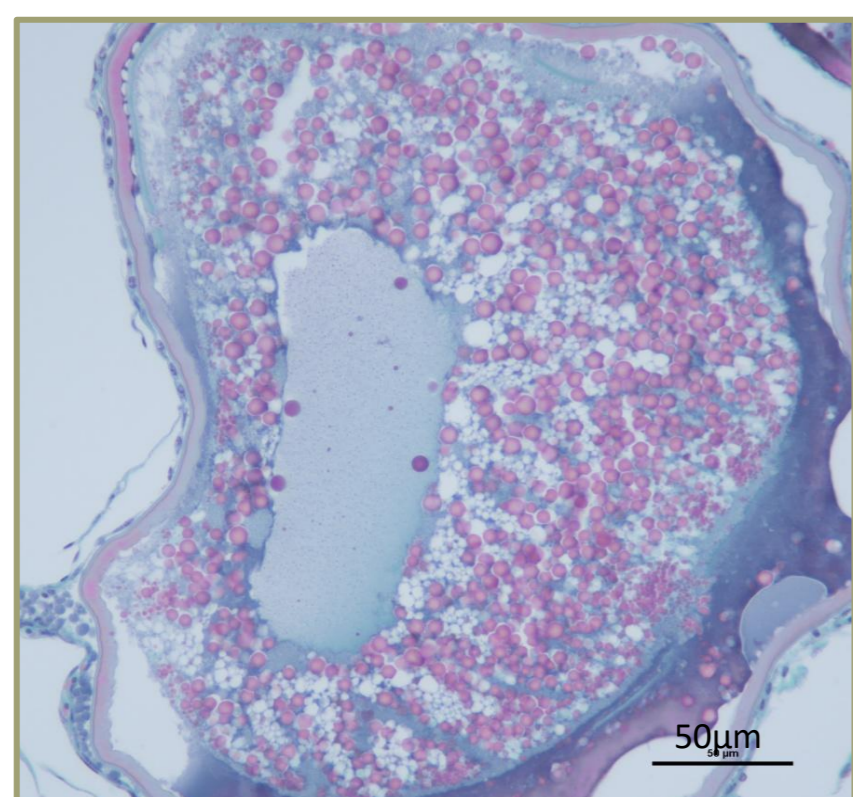
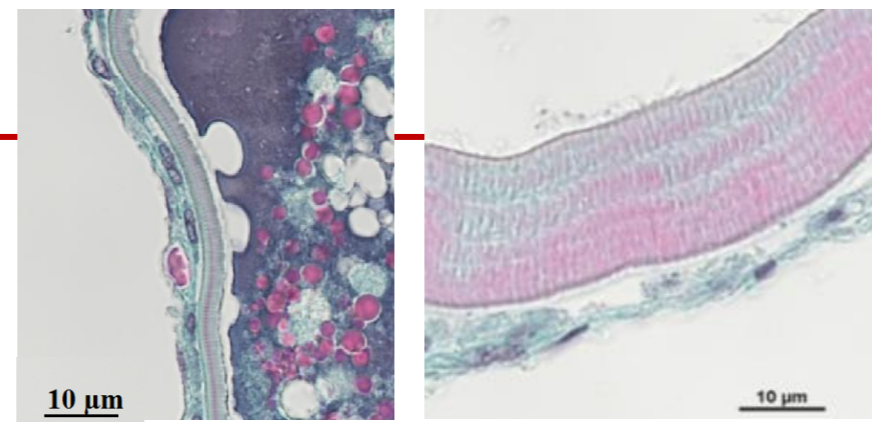


Ovocyte « Cortical alveolar » (ca) : Taille : 156,8µm (±30,1)
La zone interne du cytoplasme est remplie de vésicules corticales (ca)
La **zona radiata (zr)** est visible. Thèque (th) et granulosa (g) sont organisées.



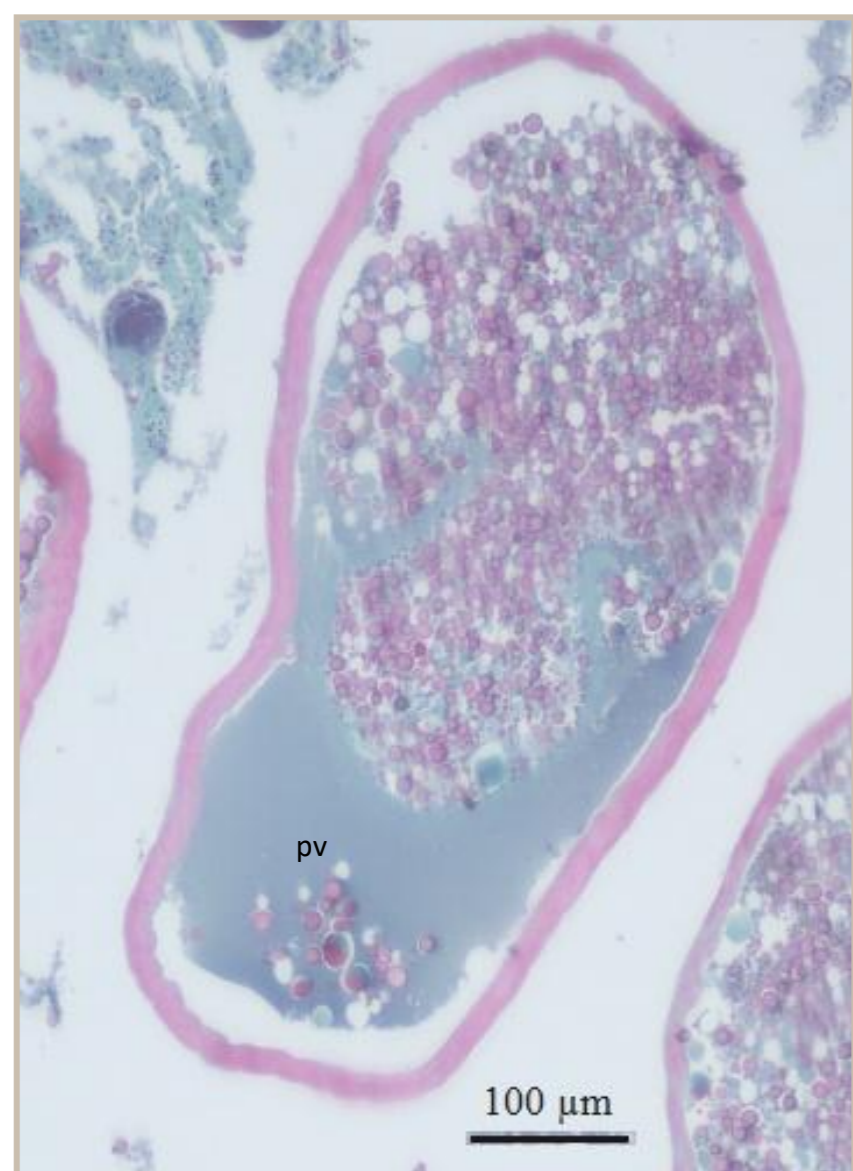
Ovocytes en vitellogenèse (vit)

Taille : 325.571 µm (± 60.153)
Ils se caractérisent par l'apparition de gouttelettes de vitellus (v) dans le cytoplasme. Les vésicules corticales alvéolaires augmentent en nombre et en taille. La **zona radiata** est nettement visible, elle résulte de l'exocytose de glycoprotéines par l'ovocyte et présente progressivement des stries radiales.



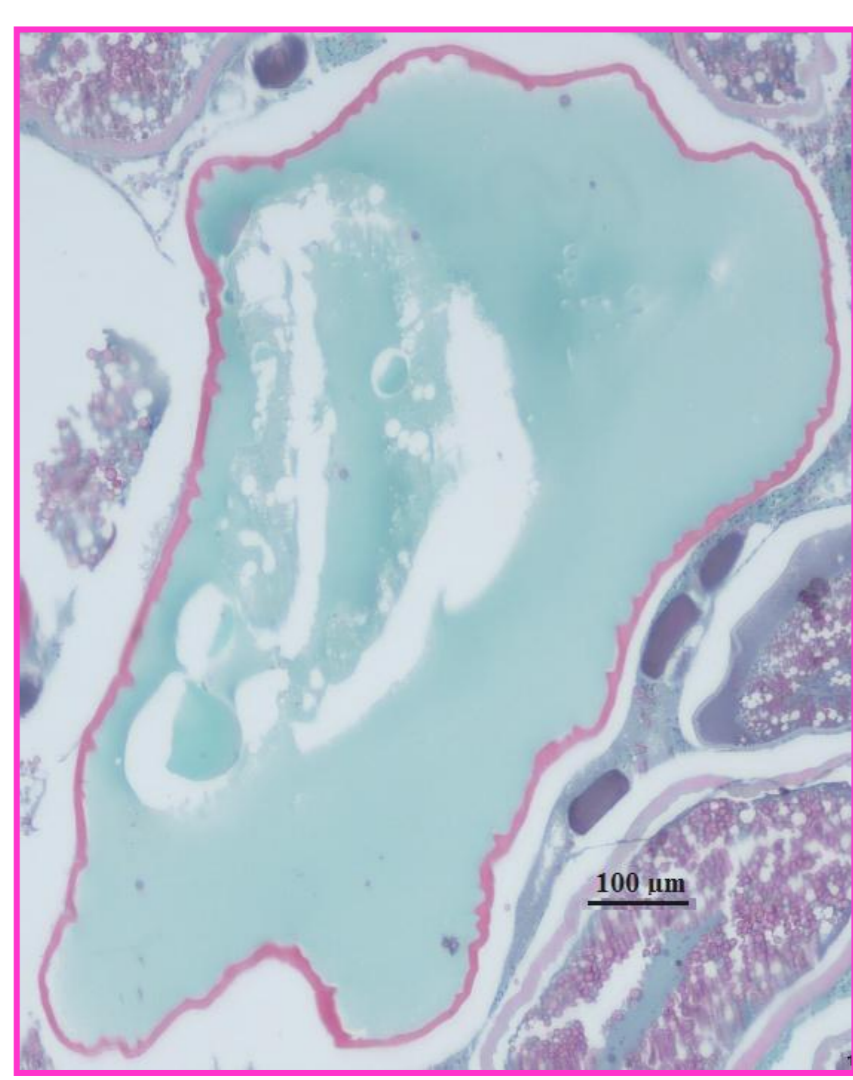
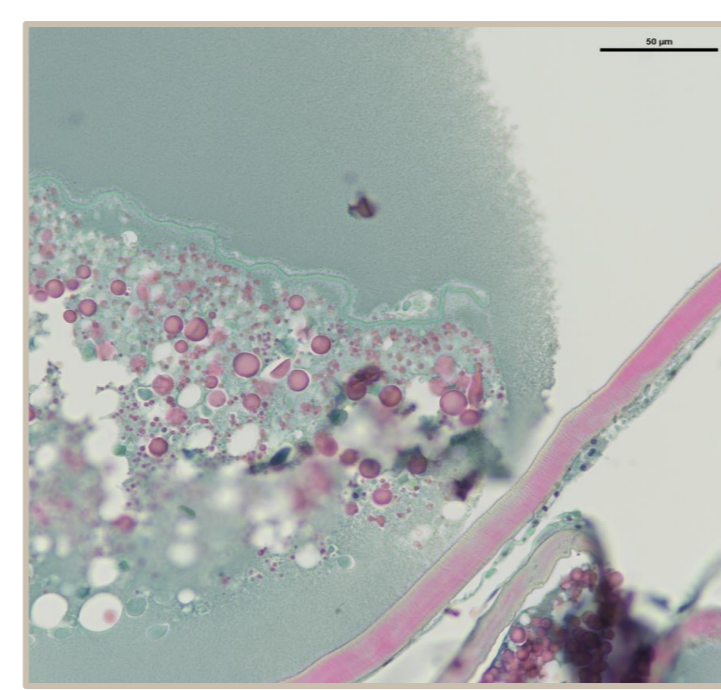
Migration de la vésicule germinative (vg)

Taille : 381.155 µm (± 98.854)
Le noyau, qui est alors appelé « vésicule germinative », migre vers le pôle animal de l'ovocyte.



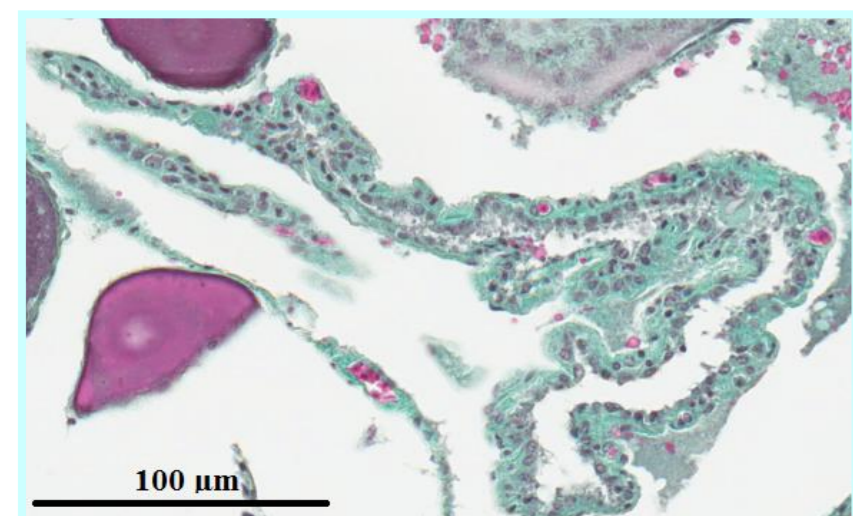
Ovocytes en cours d'hydratation (och)

Taille : 669.86 µm (± 88.353)
Les gouttelettes de vitellus se brisent d'abord dans la zone du pôle végétatif (pv) et le cytoplasme devient progressivement homogène.
La **zona radiata**, la **granulosa** et la **thèque** s'amincissent.



Ovocytes hydratés (oh)

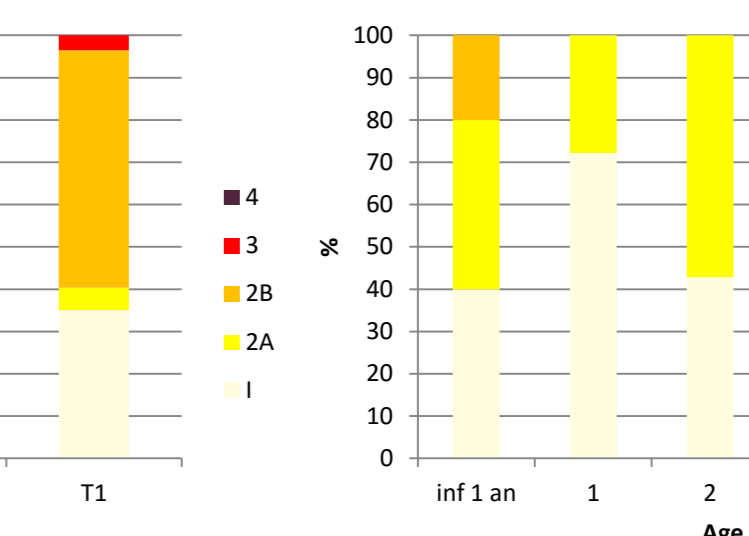
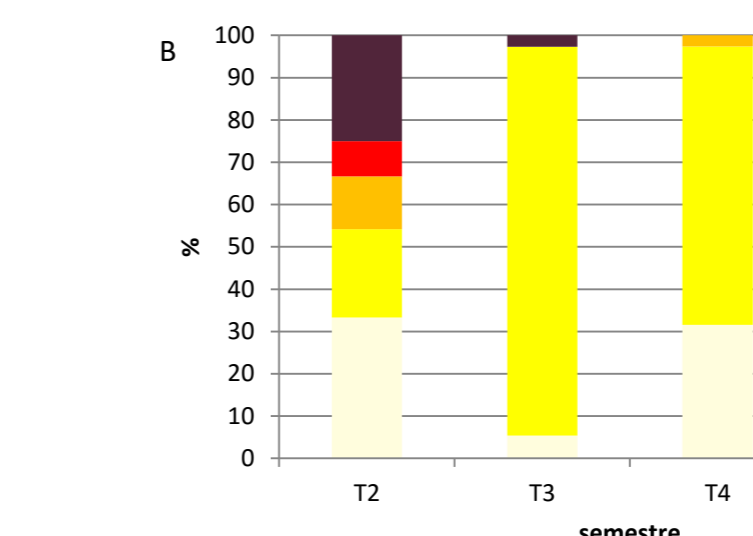
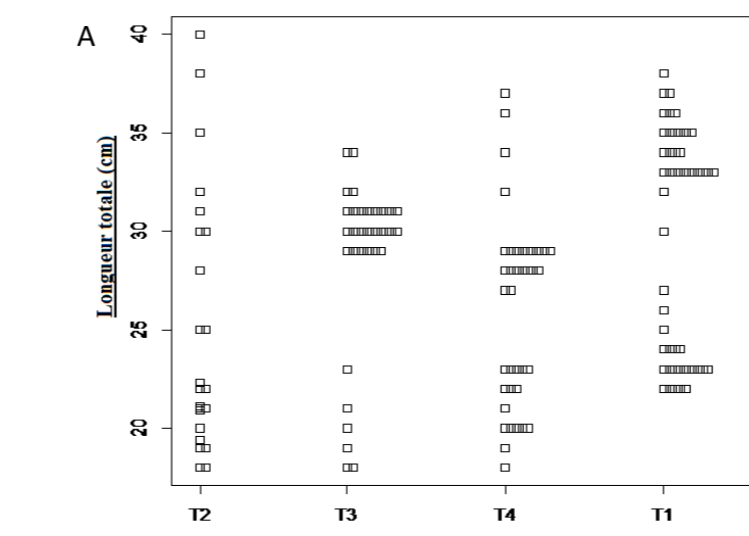
Taille : 881.77 µm (± 110.172)
Toutes les vésicules vitellines se sont brisées. La **zona radiata**, la **granulosa** et la **thèque** sont de plus en plus fines.



Follicule post ovulatoire (pof)

Lorsque l'ovocyte est hydraté, l'ovulation a lieu après la rupture des couches folliculaires. Des résidus de follicules restent présents dans l'ovaire, ce qui témoigne d'une ponte récente. Ces résidus constituent les follicules post-ovulatoires (POF).

Echantillonnage annuel de soles : détermination taille, âge, classe de maturité ICES



Répartition des tailles (A) et des classes de maturité (B) des soles femelles pour les 4 semestres échantillonnés. T2: semestre 2 d'avril à Juin 2015; T3: semestre3 de juillet à septembre 2015; T4: semestre 4 d'octobre à décembre 2015; T1 semestre1 janvier et février 2016

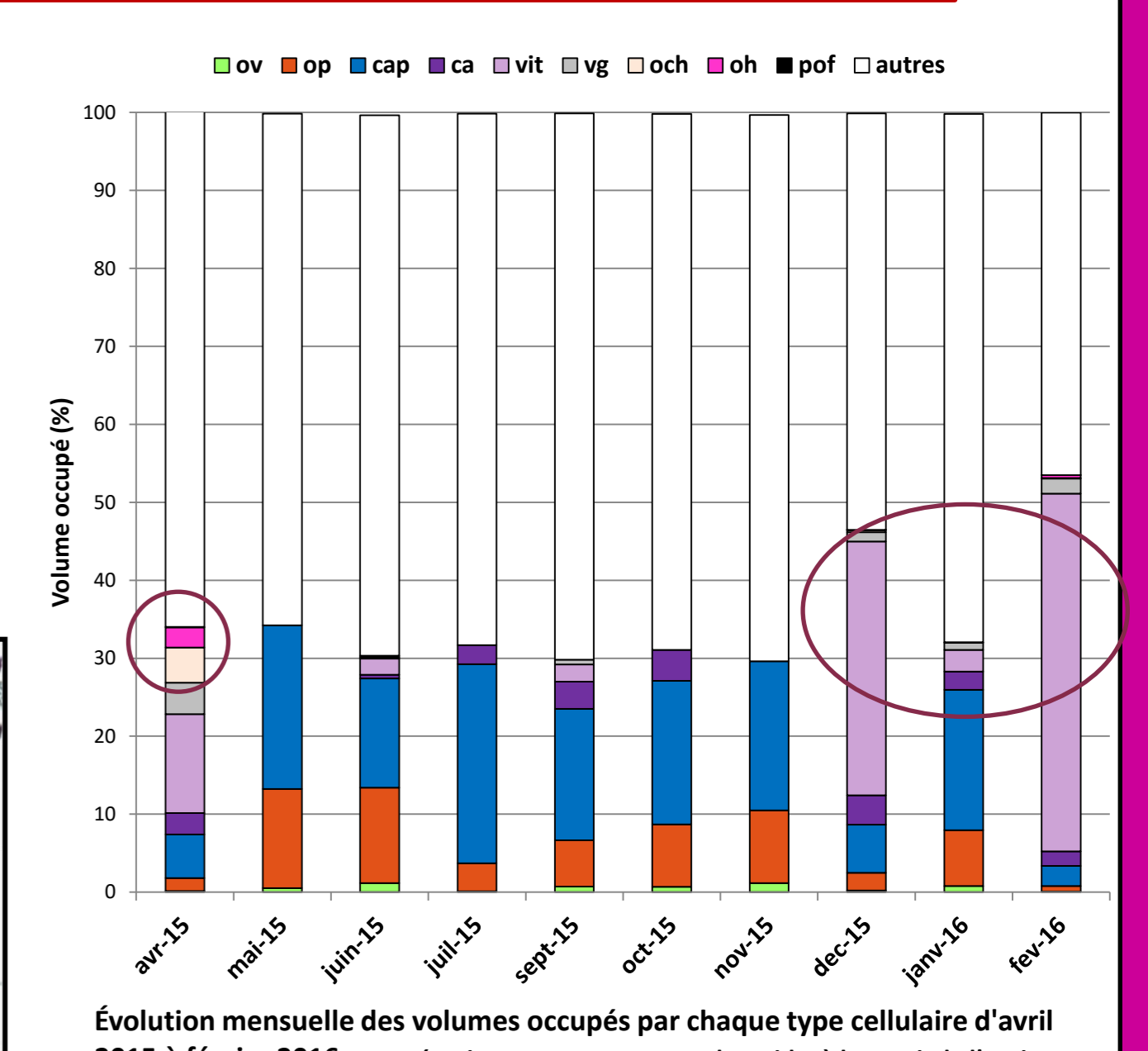
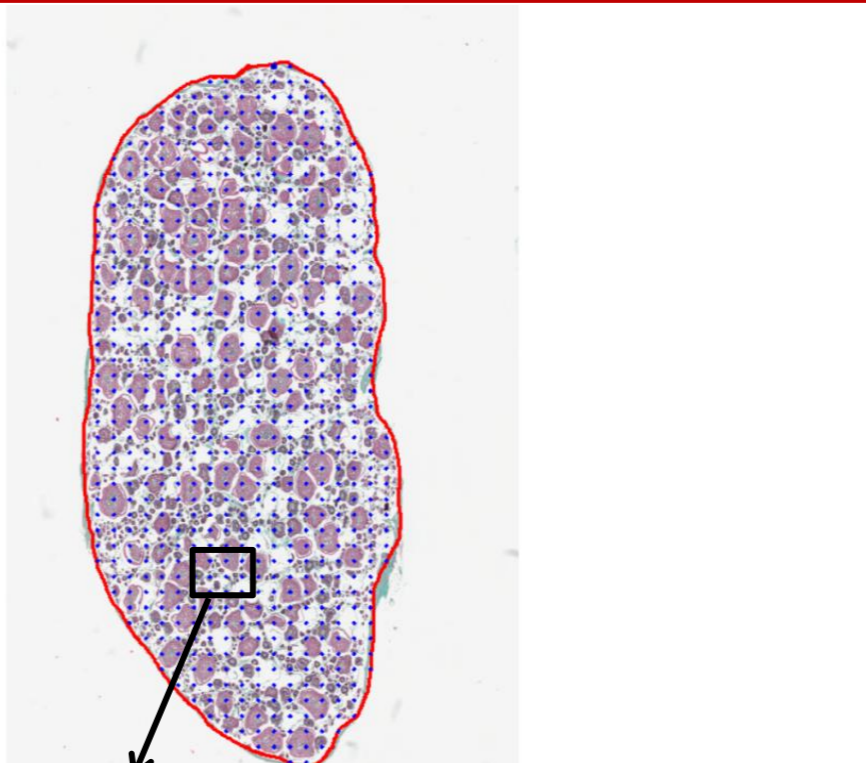
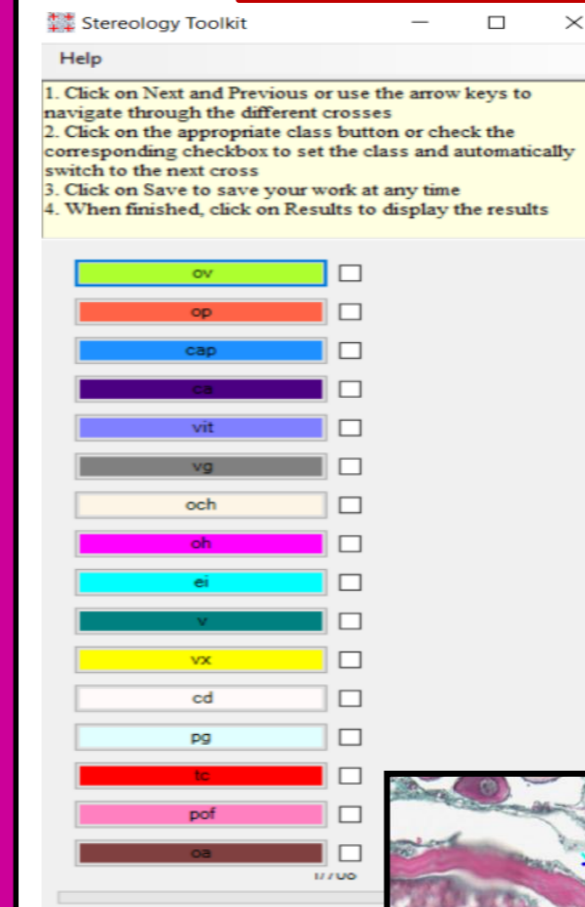
Répartition des classes de maturité en fonction de l'âge.

Les tailles échantillonnées s'échelonnent entre 18 et 40 cm. Les classes avec développement sexuel (2B) et de ponte (3 et 4) sont observées entre avril et juin. Les soles femelles de plus de 3 ans présentent les critères de maturité sexuelle (présence de classe 3 et 4).

Détermination quantitative des types cellulaires (en % de surface de gonade)

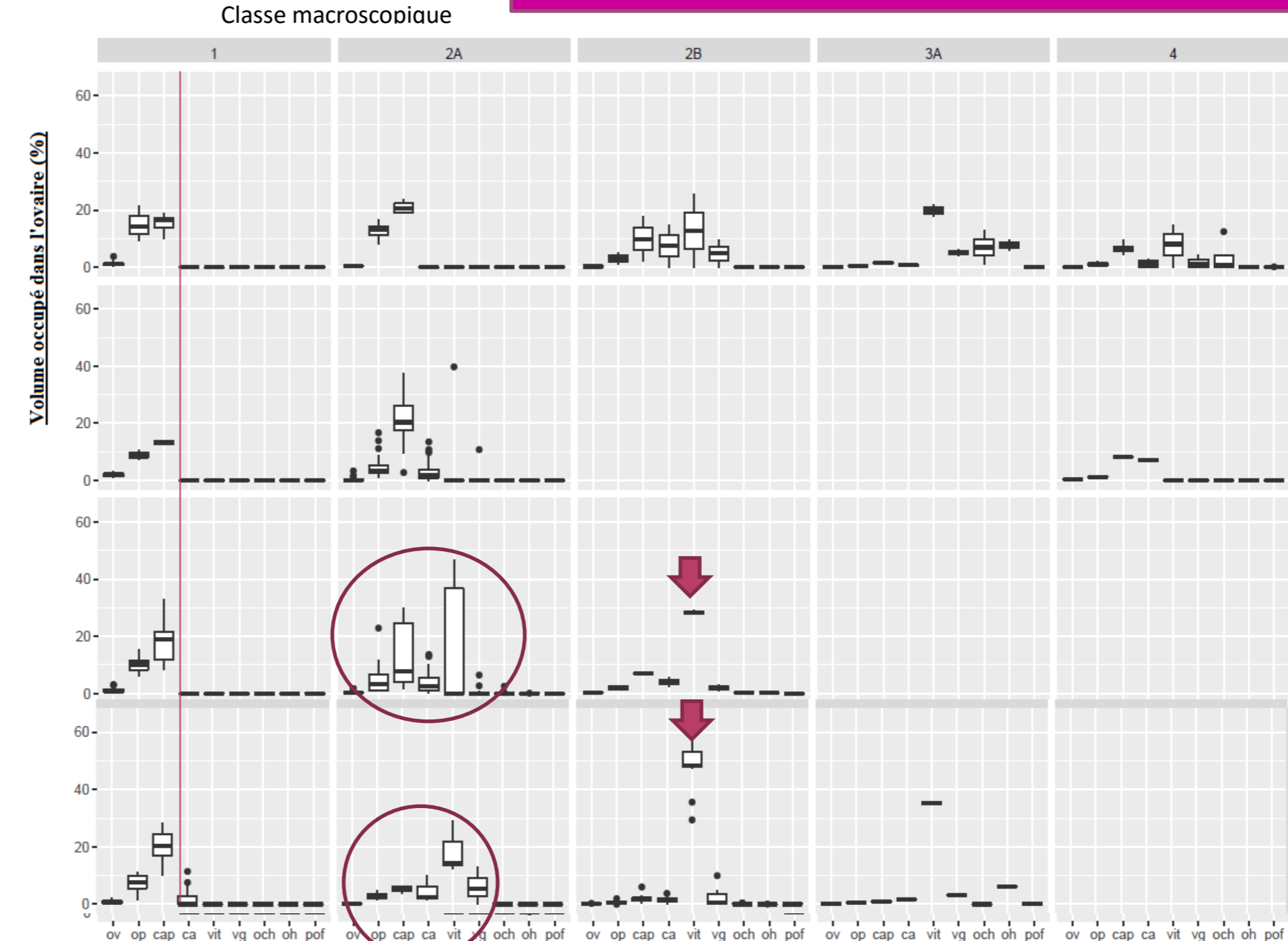
Utilisation du logiciel Image Scope – Stereology Toolkit .

- 1- Définir la zone d'intérêt et la résolution du maillage.
- 2- Déterminer le type cellulaire recouvert par chaque croix du maillage.

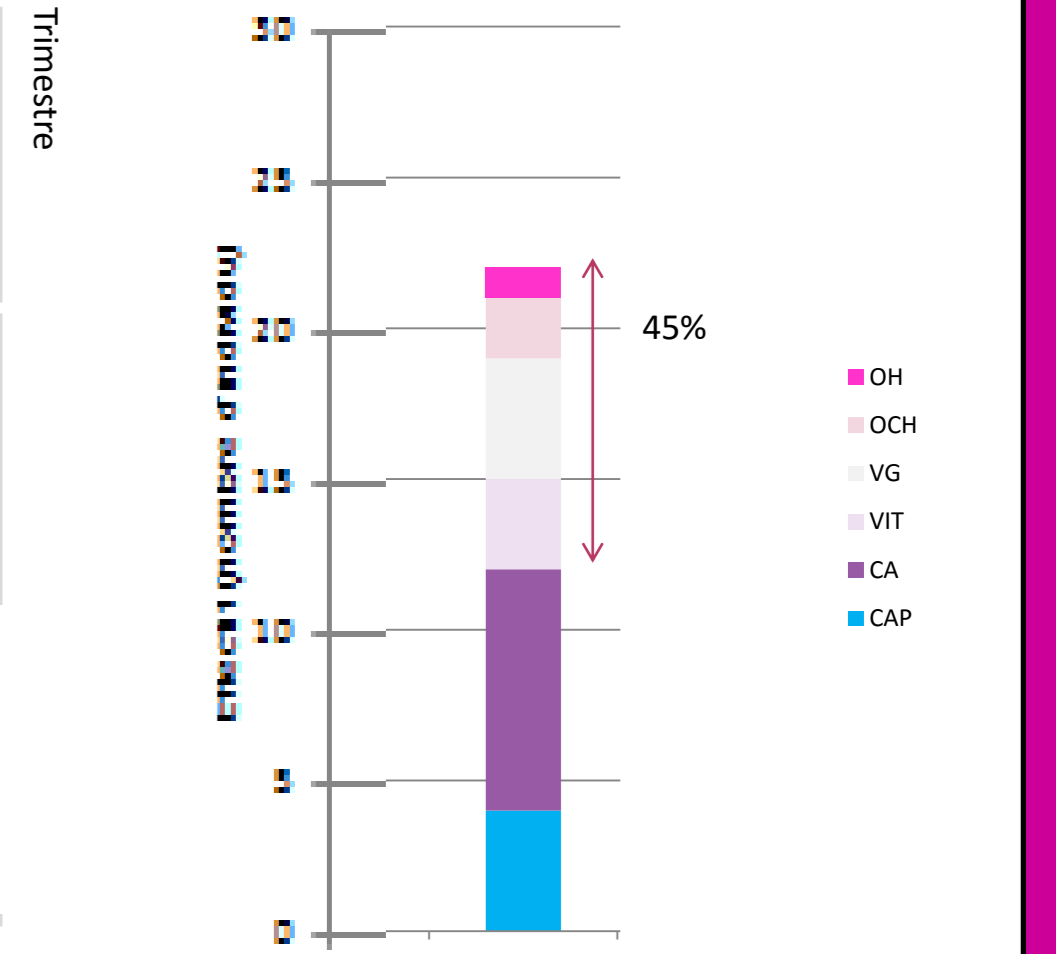


Le stade le plus avancé (ovocyte hydraté) est observé en avril (période de ponte). La vitellogenèse (vit et stades plus avancés) a lieu essentiellement de décembre à avril.

Corrélation avec les données macroscopiques



Volume occupé dans l'ovaire par les cellules de la lignée germinale en fonction de la maturité macroscopique



Effectifs des stades les plus avancés chez les individus F2A, en fonction des trimestres. T2 : avril–juin 2015 ; T3 : juillet–septembre 2015 ; T4 : octobre–décembre 2015 ; T1 : janvier à février 2016

Les soles classées immatures (I) ne dépassent pas le stade cap (ovocyte présentant peu de vésicules alvéolaires). Ce critère peut donc être un critère d'immaturité. De octobre à février, la gonade des soles classées 2B (fonctionnellement matures) contient essentiellement des ovocytes en vitellogenèse (flèches). Pour les soles classées 2A, la gonade est beaucoup plus hétérogène, les ovocytes en pré-vitellogenèse (jusqu'au stade cap) restent abondants. Mais des ovocytes en vitellogenèse sont également présents. Environ 45% de ces femelles présentent des ovocytes engagés en vitellogenèse comme stade le plus avancé dans la gonade, elles participent donc à l'effort de reproduction. Les autres (environ 55%) sont immatures. Ce stade 2A regroupe donc des animaux de stade reproducteur très différent.

Conclusion

Ce travail a permis de développer un outil méthodologique quantitatif de suivi d'ovogenèse chez la sole *Solea solea*, en s'appuyant sur la caractérisation des cellules de la lignée germinale femelle. Cette étude a montré que :
- les animaux classés immatures (I) ne participent effectivement pas à l'effort de reproduction
- les animaux considérés sexuellement actifs (2B) présentent une ovogenèse complète (vitellogenèse)
- l'approche quantitative est efficace pour distinguer dans le groupe hétérogène des animaux 2A, les immatures des matures sexuellement. L'analyse plus approfondie des données permettra de savoir si la difficulté de classer ces animaux peut être liée à l'âge ou à la taille.
Cette approche méthodologique pourra à terme être transférée à d'autres espèces de poissons faisant l'objet de suivi halieutique.