

Lexique des structures histologiques des ovaires et de l'ovogenèse de la plie, *Pleuronectes platessa*, Linnaeus, 1758



KELLNER Kristell
SAUGER Carine

Juillet 2019 (v. 1.2 Aout 2024)

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 atresie
oaB : ovocyte émis en atresie
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

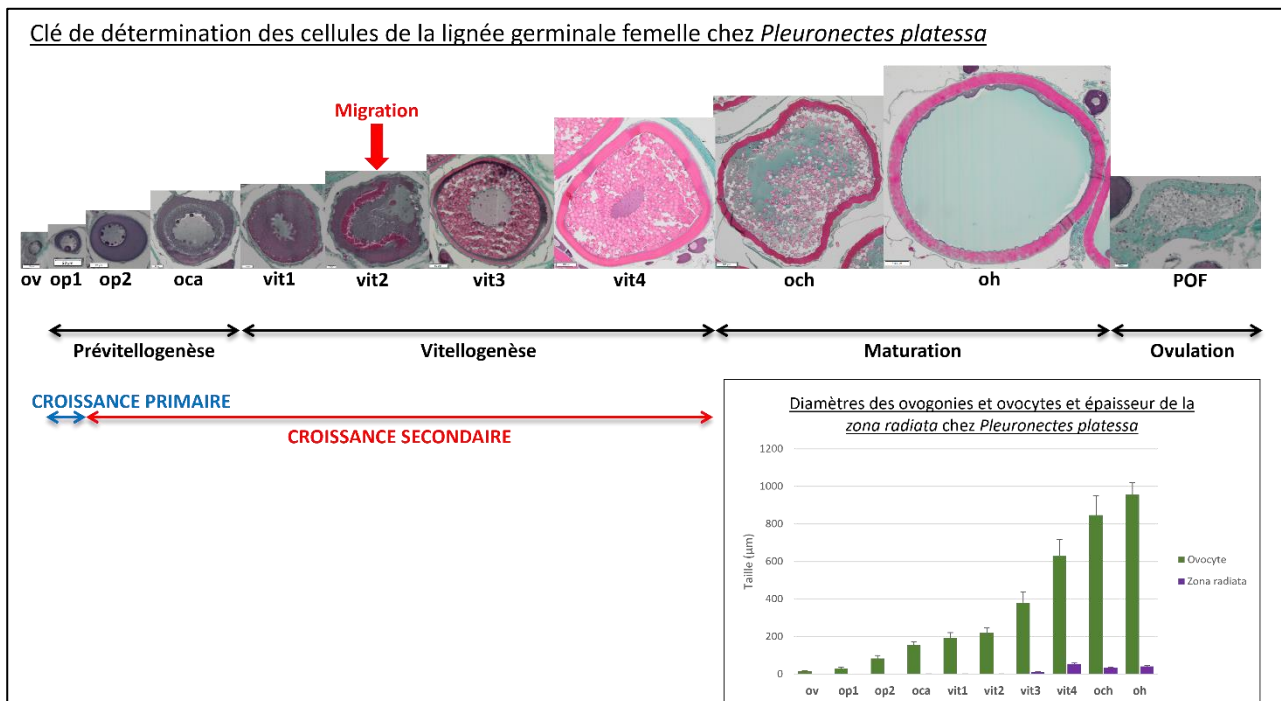


Figure 1 : Clé de détermination des différentes cellules de la lignée germinale femelle qui peuvent être retrouvées chez *Pleuronectes platessa* lors des différents stades de l'ovogenèse. Avec les diamètres des ovogonies et ovocytes (\pm écart-type en μm), ainsi que les épaisseurs de la *zona radiata* (\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* »)

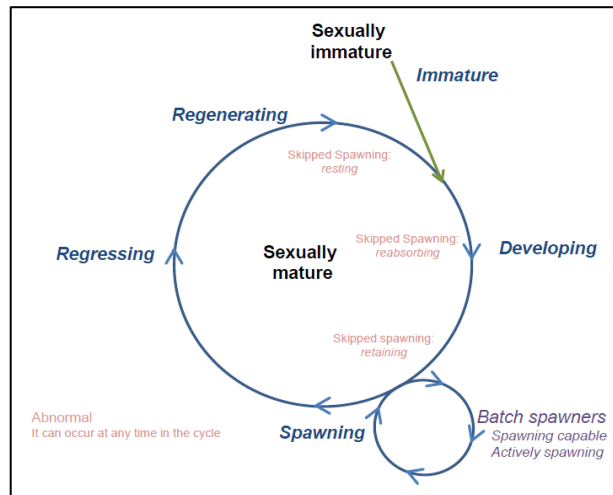


Figure 2 : Cycle de maturation des téléostéens avec les différentes phases selon l'ICES (2018a). Avec les phases : Immature (A), Développement (B), Frai (C), Régression/Régénération (D), Omission de frai (E), Anormal (F)

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*).

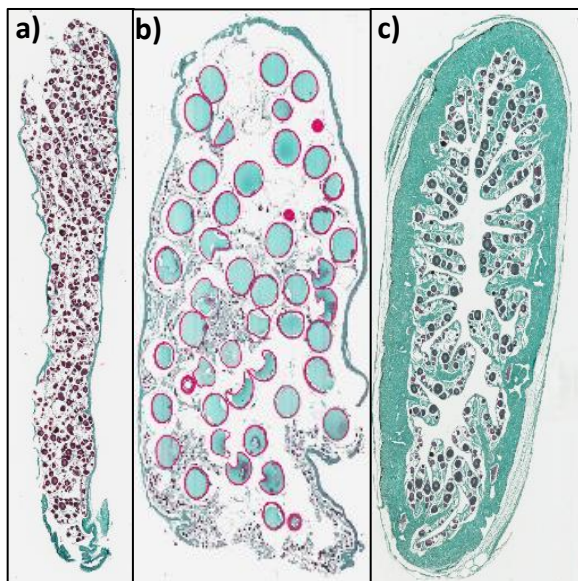


Figure 4 : Coupes transversales d'ovaire de plie aux phases **a)** immature ; **b)** en frais/avec des ovocytes prêts à être émis ; et **c)** en régénération/ayant pondu

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.

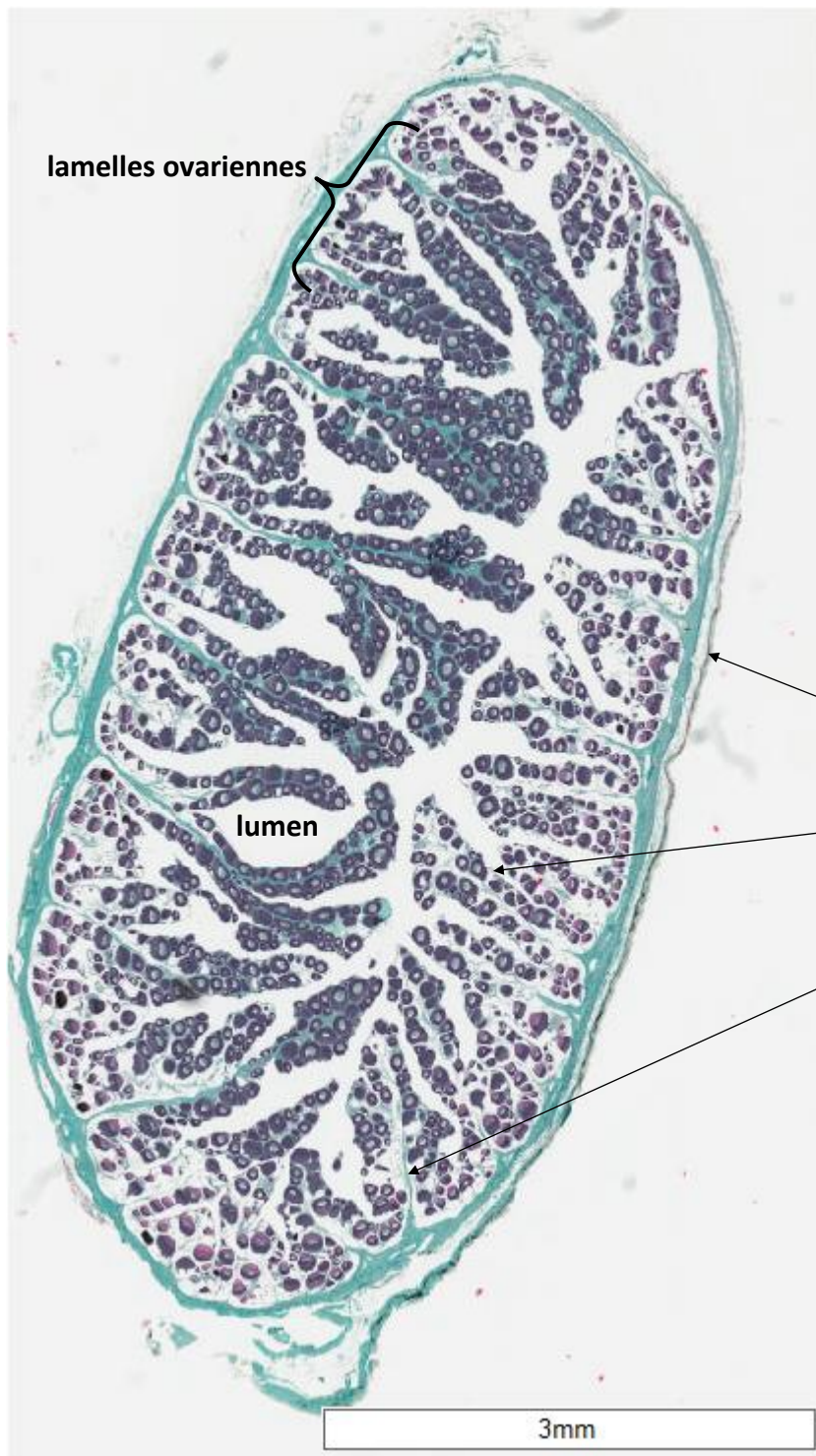


Figure 5 : Structure générale d'une coupe d'ovaire d'une plie, avec la paroi gonadique (**pg**), la lumière de la gonade, ou **lumen**, et un **épithélium germinatif** plissé en **lamelles ovariennes** et portant les ovocytes associés à un tissu conjonctif (**tc**)

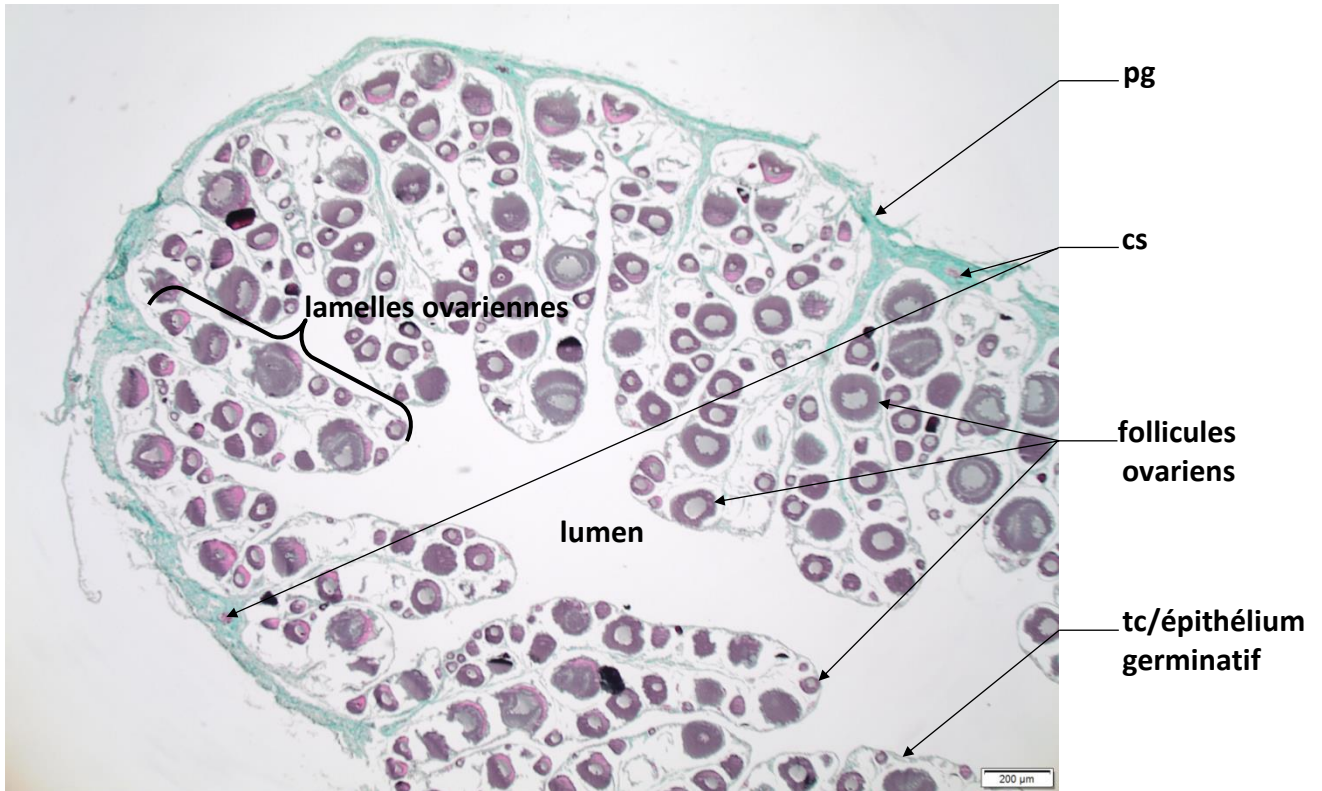
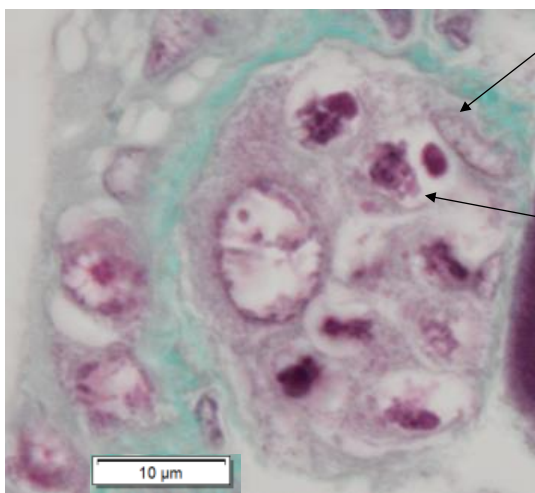


Figure 6 : Aspect global d'un morceau de coupe d'un ovaire de *Pleuronectes platessa* avec la paroi gonadique (**pg**), des vaisseaux ou capillaires sanguins (**cs**), la lumière de la gonade, ou **lumen**, et des follicules contenant des ovocytes rangés en structure de **lamelles ovariennes** et tissu 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**)

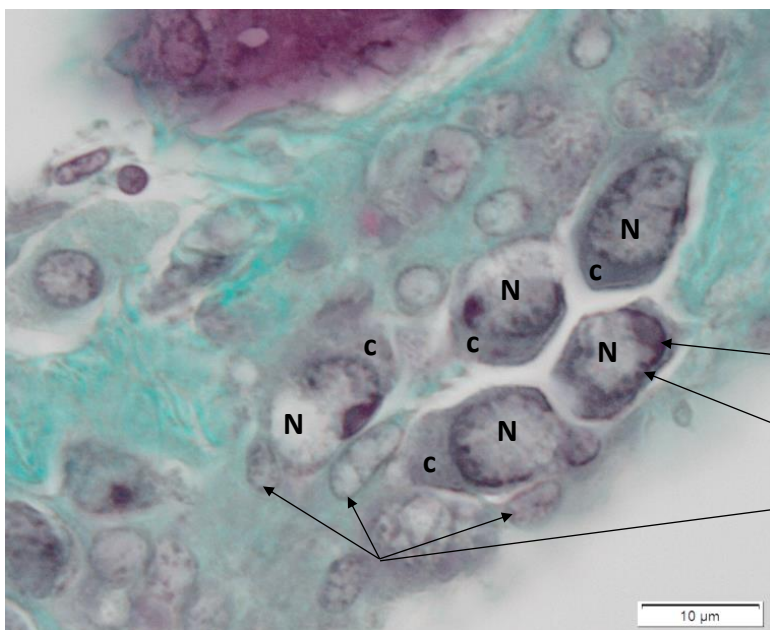
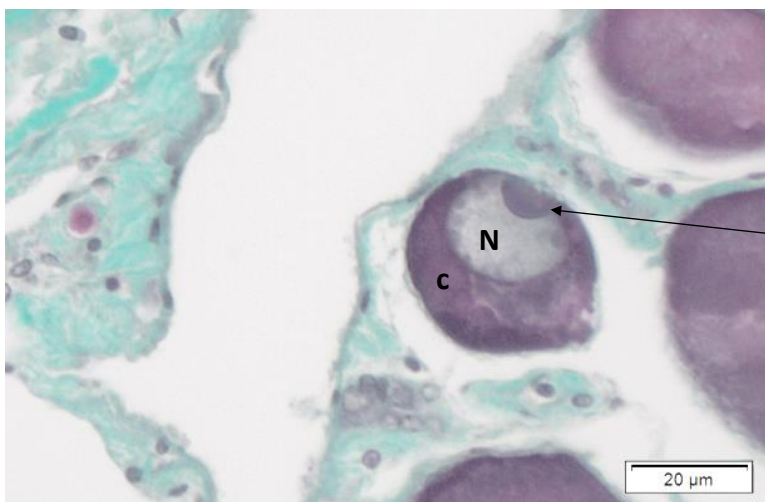


Figure 8 : Ovogenies (**ov**) avec un noyau (**N**) décondensé contenant un seul nucléole (**nl**) et des amas de chromatine (**chrom**). Le cytoplasme (**c**) est peu coloré. Présence de cellules somatiques (**som**)

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**)

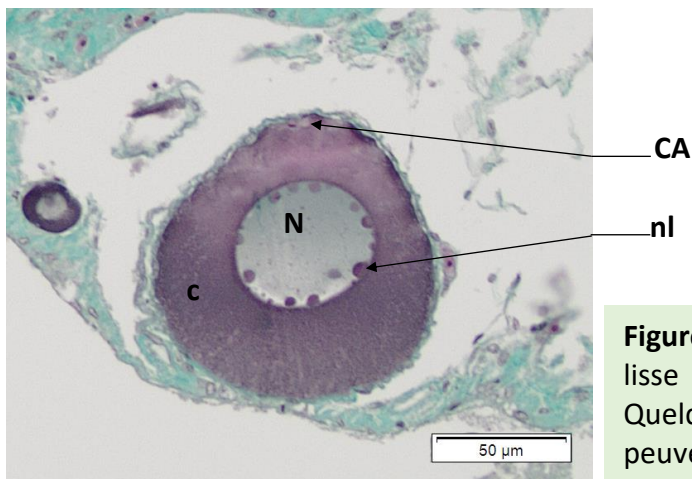


Figure 10 : Ovocyte précoce au stade 1 (**op1**) un noyau (**N**) sphérique et lisse contenant deux nucléoles (**nl**). Le cytoplasme (**c**) est plus foncé que pour une ovogonie (**ov**)

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**)

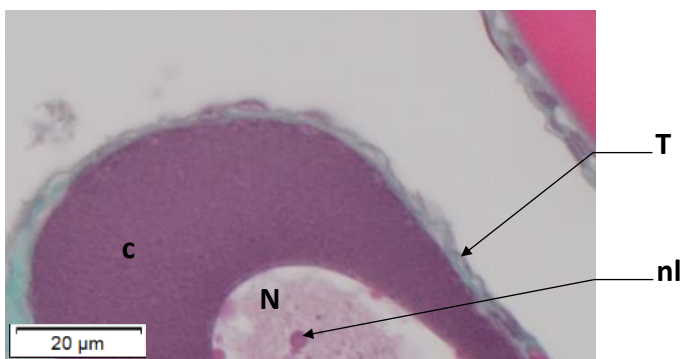


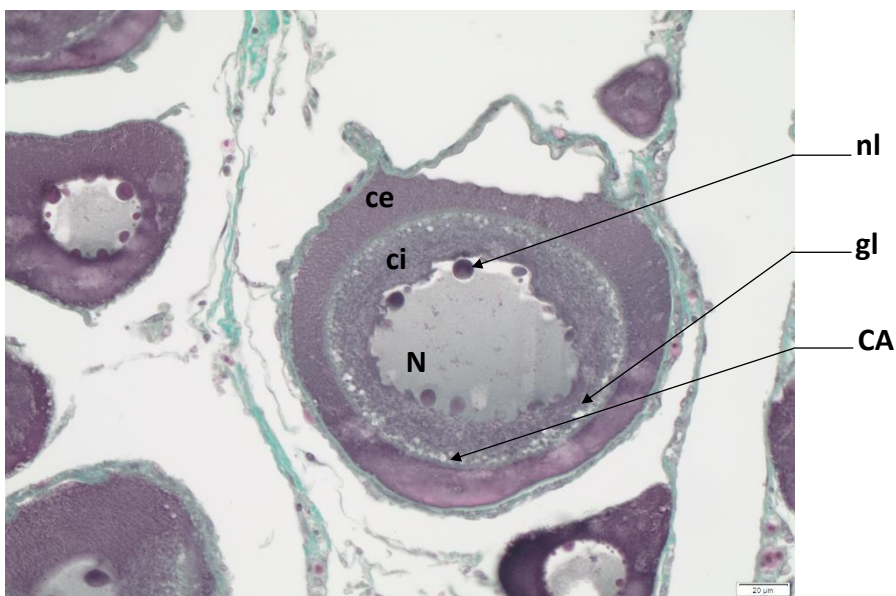
Figure 12 : Paroi d'un **op2**, avec le noyau (**N**) sphérique et lisse contenant de nombreux nucléoles (**nl**). La thèque (**T**) va venir contenir le cytoplasme (**c**)

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**

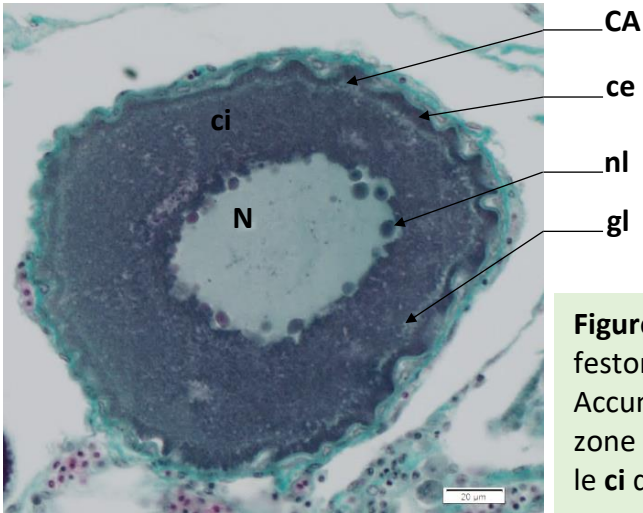


Figure 14 : Ovocyte avec des CA (oca), un noyau (N) festonné contenant de nombreux nucléoles (nl). Accumulation de gouttelettes lipidiques (gl) entre la zone des cytoplasmes interne (ci) et externe (ce), avec le ci qui repousse le ce

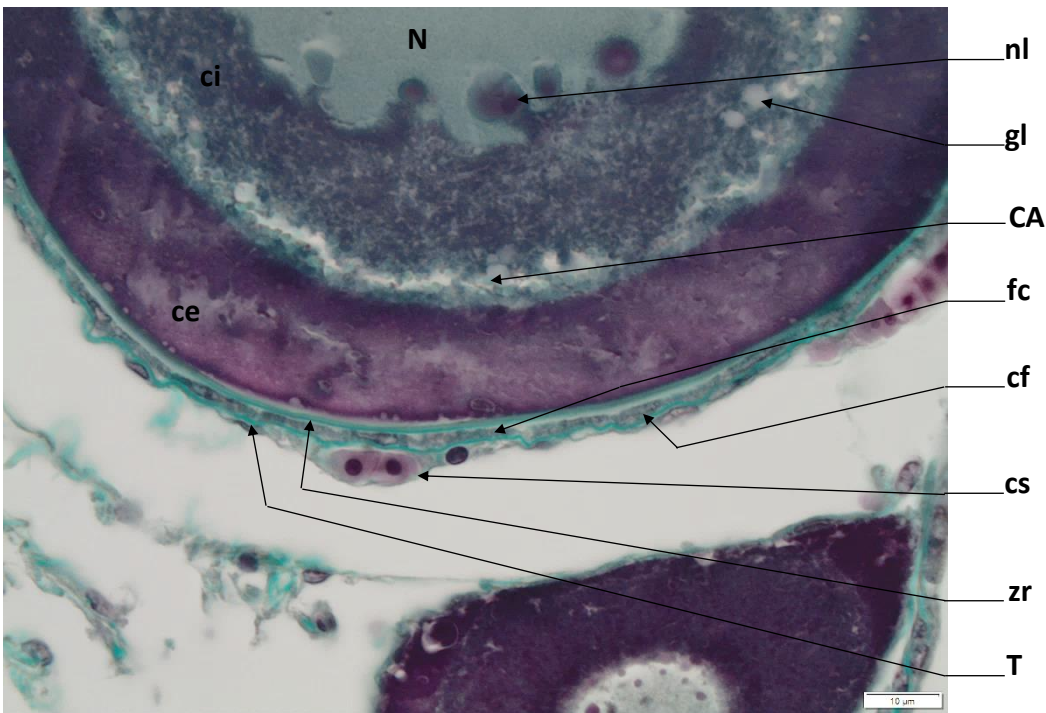


Figure 15 : Paroi d'un ovocyte avec des corticales alvéolaires (oca), avec le noyau (N) festonné contenant de nombreux nucléoles (nl). Accumulation de gouttelettes lipidiques (gl) entre la zone des cytoplasmes interne (ci) et externe (ce). Formation de la zona radiata (zr), présence de vésicules alvéolaires 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)

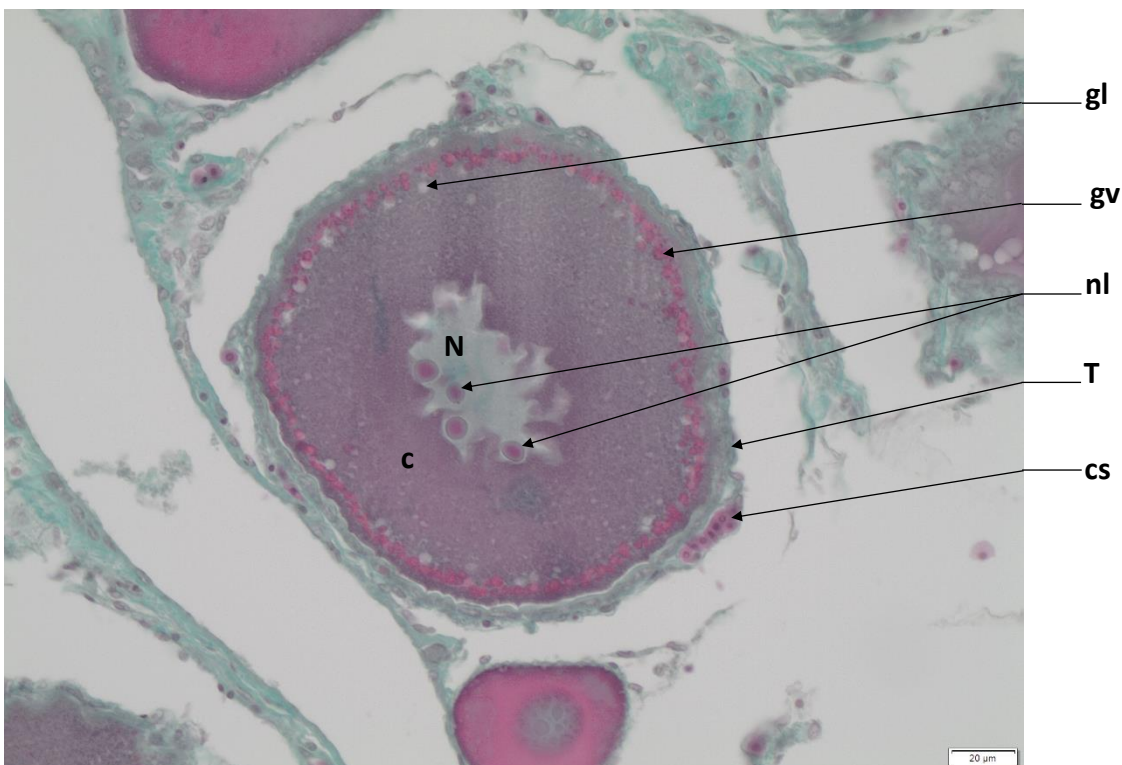


Figure 16 : Ovocyte au stade **vit1**, avec le noyau (**N**) dont l'enveloppe est festonnée et contenant de nombreux nucléoles (**nl**). Une couronne de gouttelettes de vitellus (**gv**) se forme en périphérie du cytoplasme (**c**). Des gouttelettes lipidiques (**gl**) sont encore observées à ce stade. La thèque (**T**) possède des capillaires sanguins (**cs**)

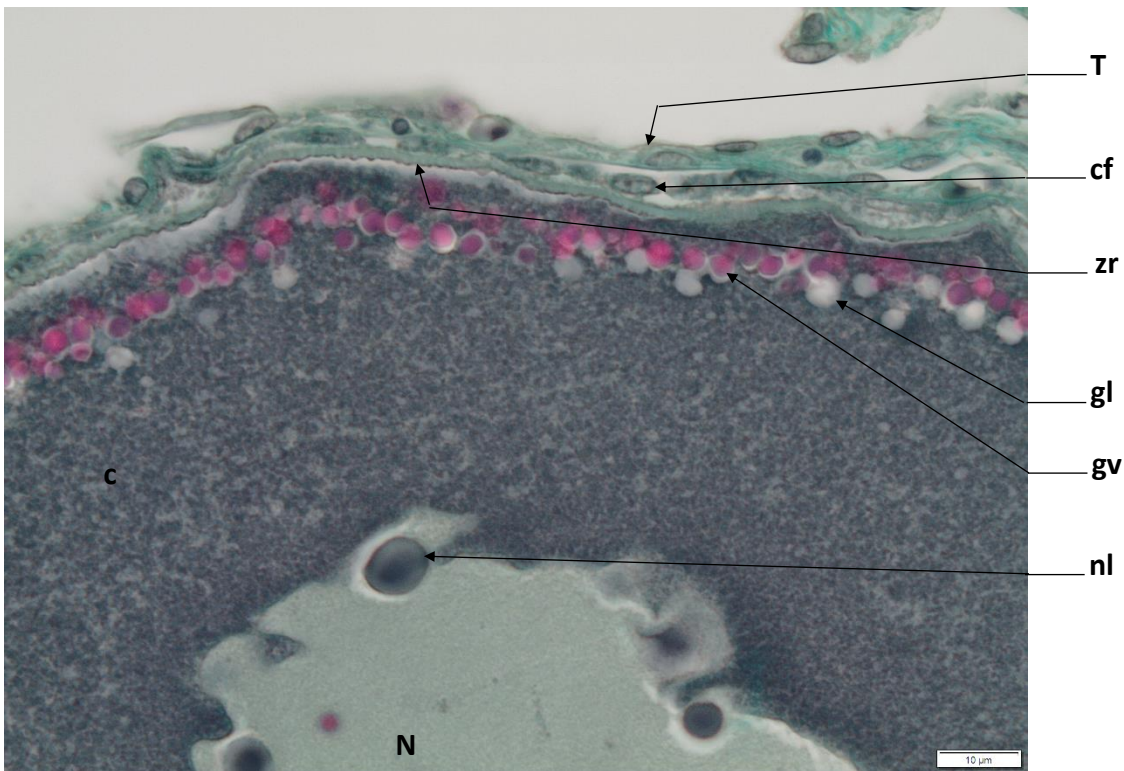


Figure 17 : Paroi d'un ovocyte au stade **vit1**, avec le noyau (**N**) festonné contenant de nombreux nucléoles (**nl**). Formation d'une couronne de gouttelettes de vitellus (**gv**) et présence de gouttelettes lipidiques (**gl**) en périphérie du cytoplasme (**c**). La thèque (**T**) contient des 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)

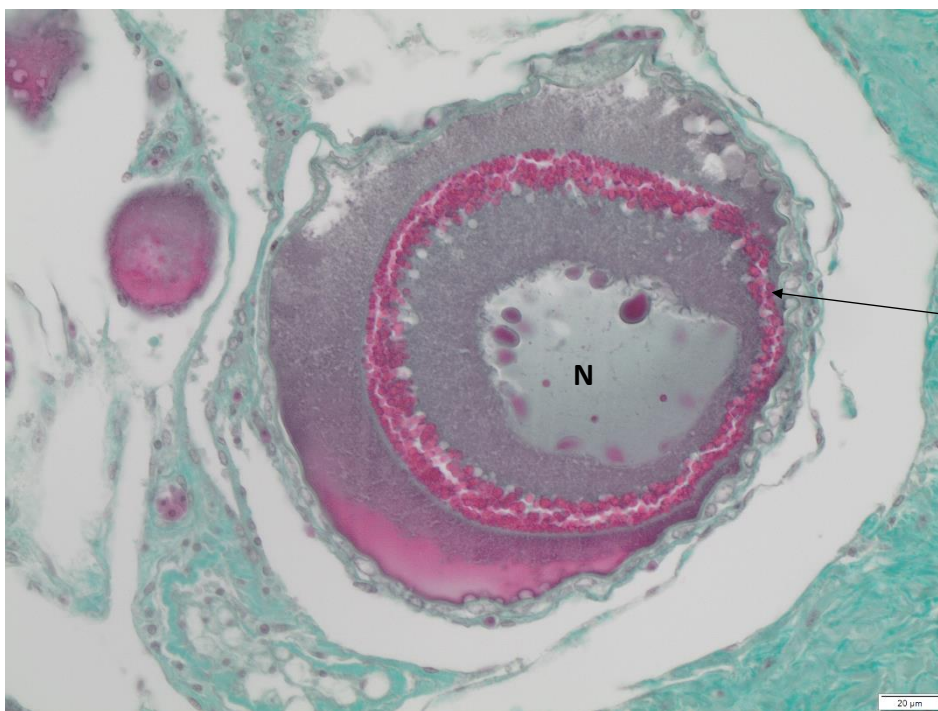
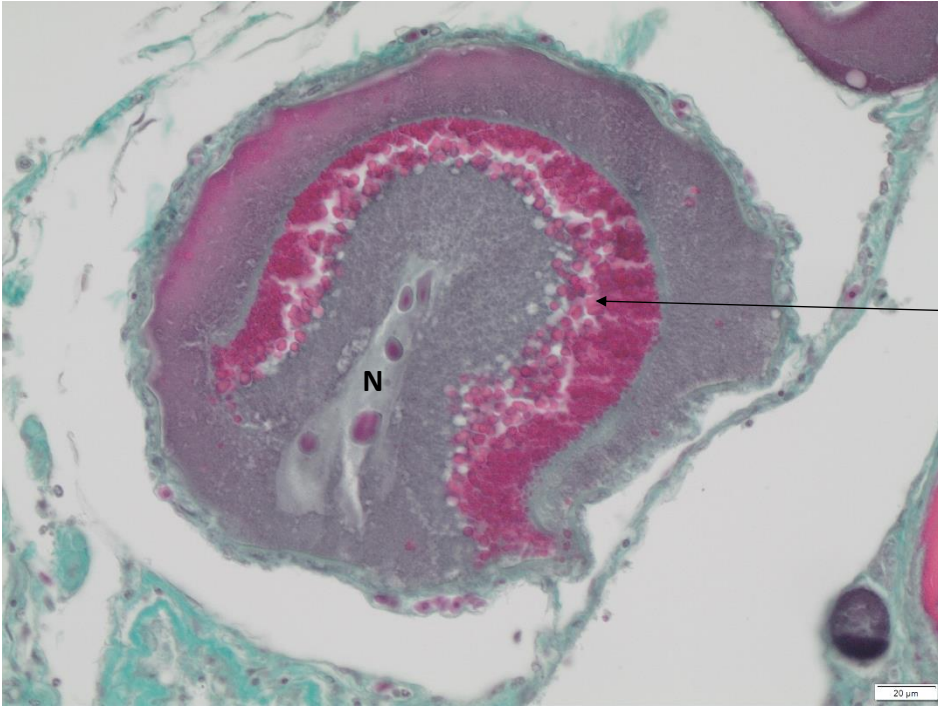
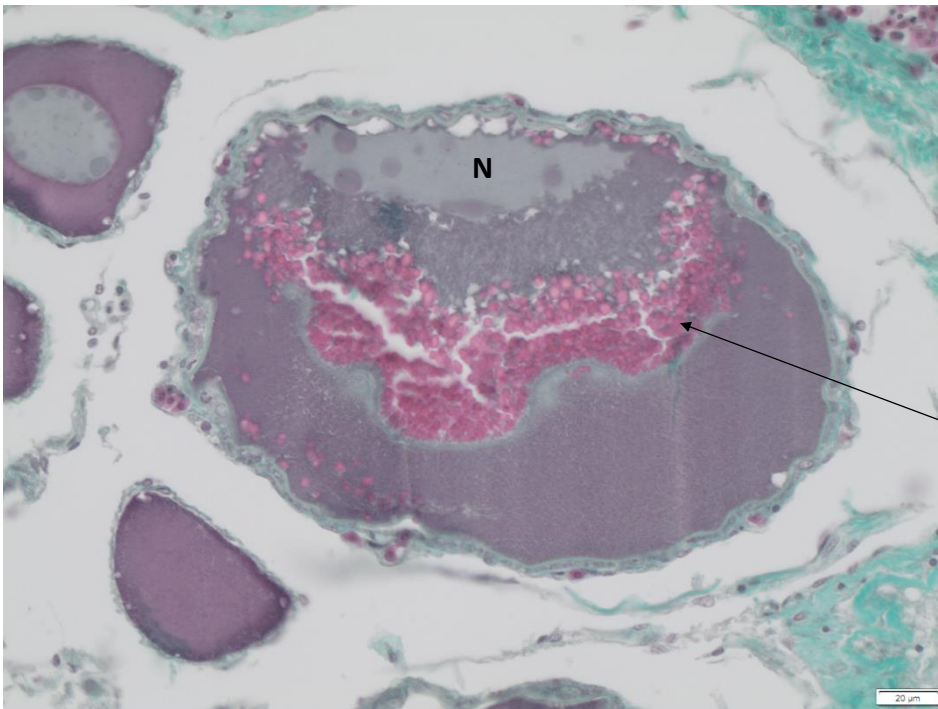


Figure 18 : Ovocyte au stade **vit2**, avec le noyau (**N**) qui a commencé sa migration vers la couronne de gouttelettes de vitellus (**gv**)



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

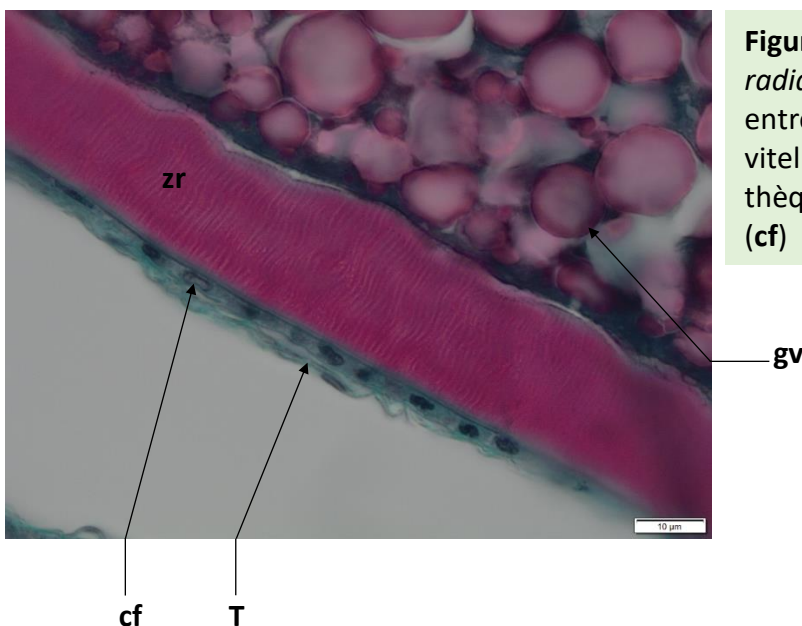


Figure 22 : Paroi d'un **vit3** avec une *zona radiata* (**zr**) rose et légèrement striée entre de nombreuses gouttelettes de vitellus de tailles variables (**gv**) et une thèque (**T**) avec des cellules folliculaires (**cf**)

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.

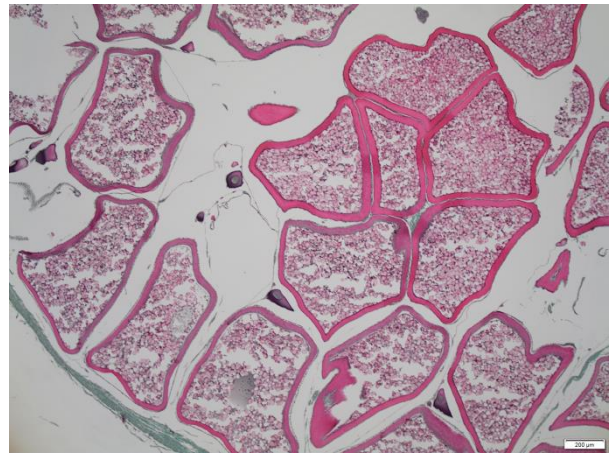


Figure 23 : Structure emboîtée d'ovocytes en fin de vitellogénèse (**vit4**)

Taille moyenne

vit4 : 629.47µm (±88.45µm)

zr : 53.81µm (±5.10µm)

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**)

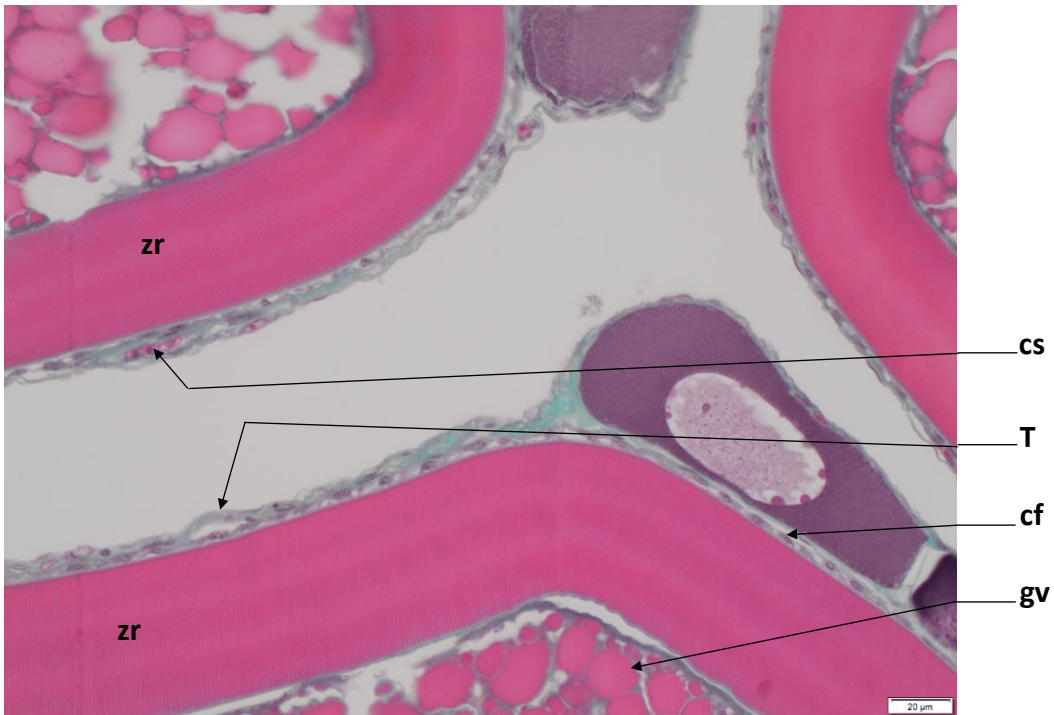
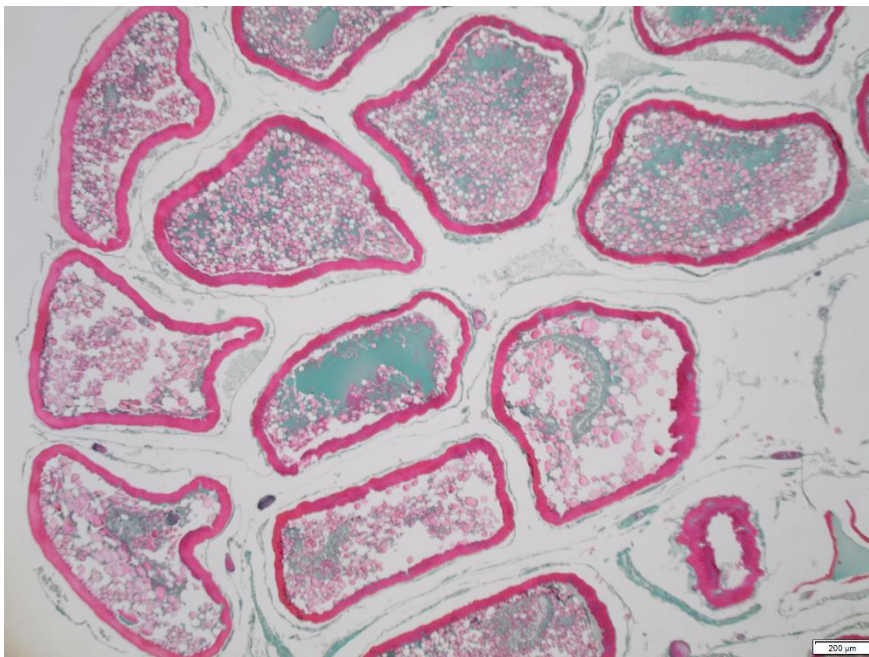


Figure 25 : Paroi d'un ovocyte en fin de vitellogenèse (**vit4**) qui entourent des gouttelettes de vitellus (**gv**). La membrane est constituée de la zona radiata (**zr**), de cellules folliculaires (**cf**) et d'une thèque (**T**) parcourue de capillaires sanguins (**cs**)

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 polygonales 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)

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**)

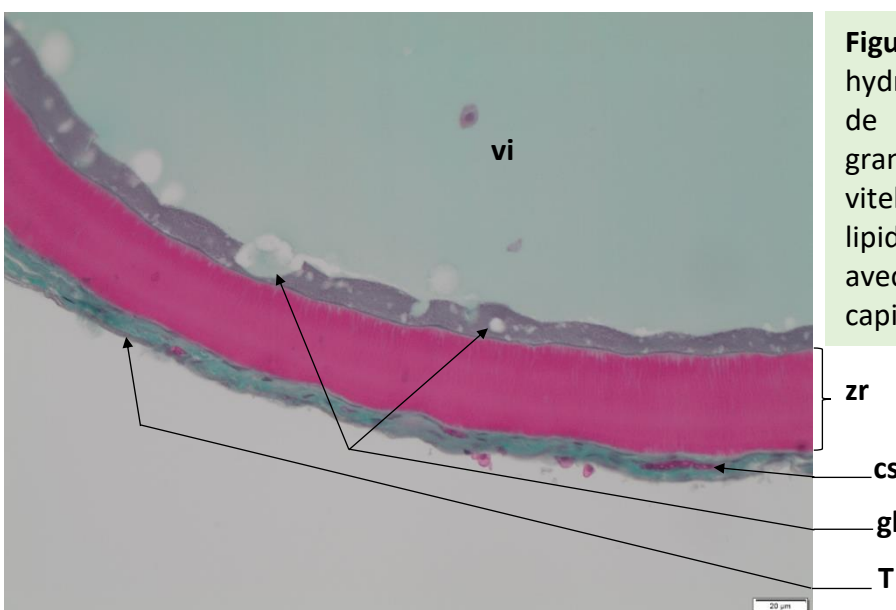


Figure 29 : Paroi d'un ovocyte hydraté (**oh**) non émis (présence de la thèque (**T**)), avec une grande partie homogène de vitellus (**vi**), des gouttelettes lipidiques (**gl**), la *zona radiata* (**zr**) avec des stries radiales, et des capillaires sanguins (**cs**)

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.

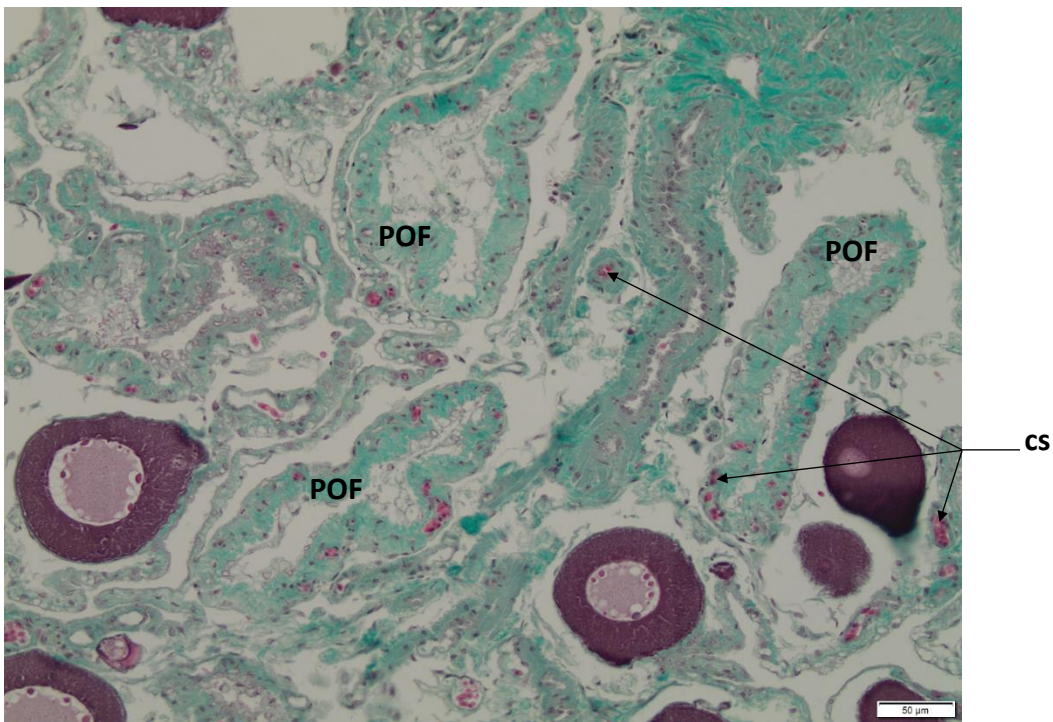


Figure 30 : Follicule post-ovulatoire (**POF**) avec présence de capillaire sanguin (**cs**)

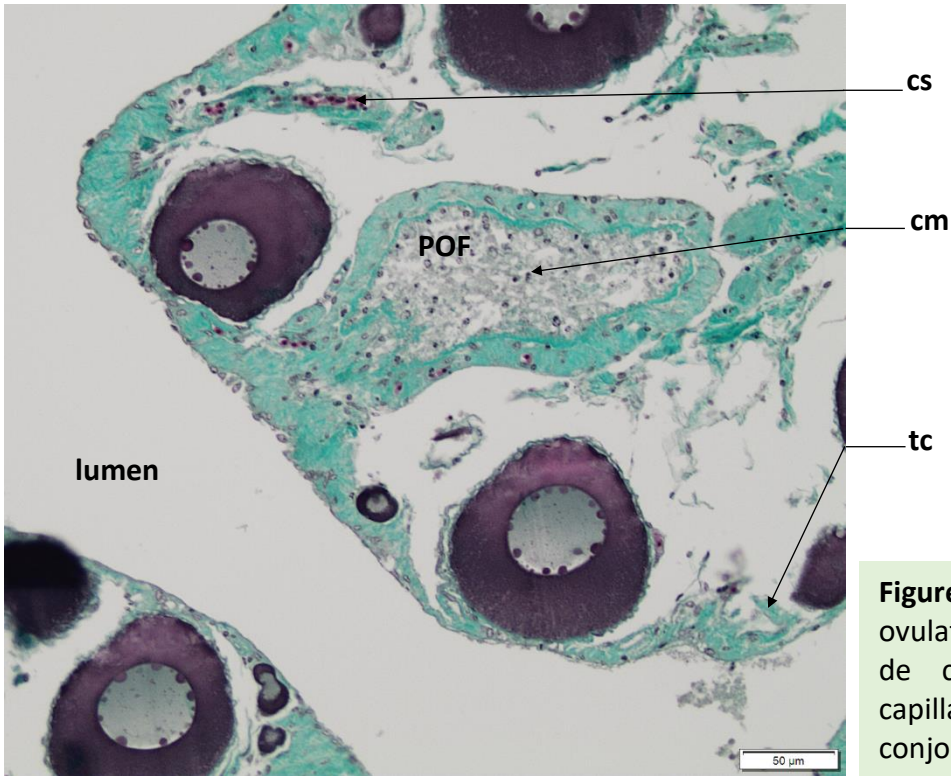


Figure 31 : Follicule post-ovulatoire (**POF**) avec présence de cellules de lyse (**cm**), capillaire sanguin (**cs**) et tissu conjonctif (**tc**)

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**.

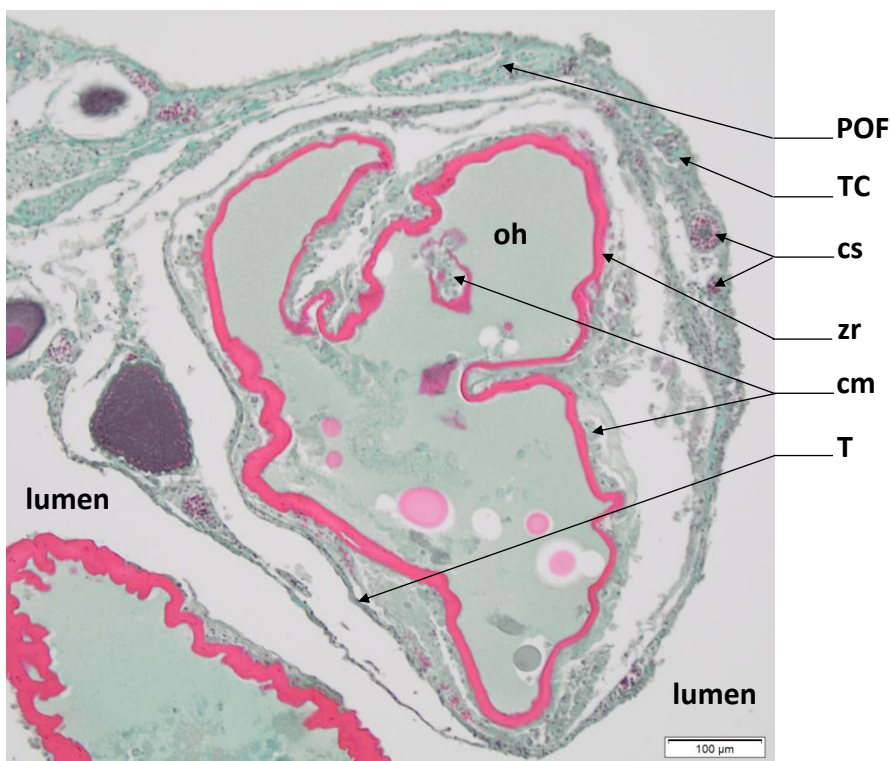


Figure 32 : Ovocyte hydraté en atrésie précoce (**oaA**). L'ovocyte hydraté (**oh**) n'a pas été émis dans le **lumen**, il est encore dans le tissu conjonctif (**tc**) de la lamelle ovarienne, entouré de sa thèque (**T**) et de macrophages (**cm**) sont observés entre la thèque et la **zr**. Présence 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 atresie 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**.

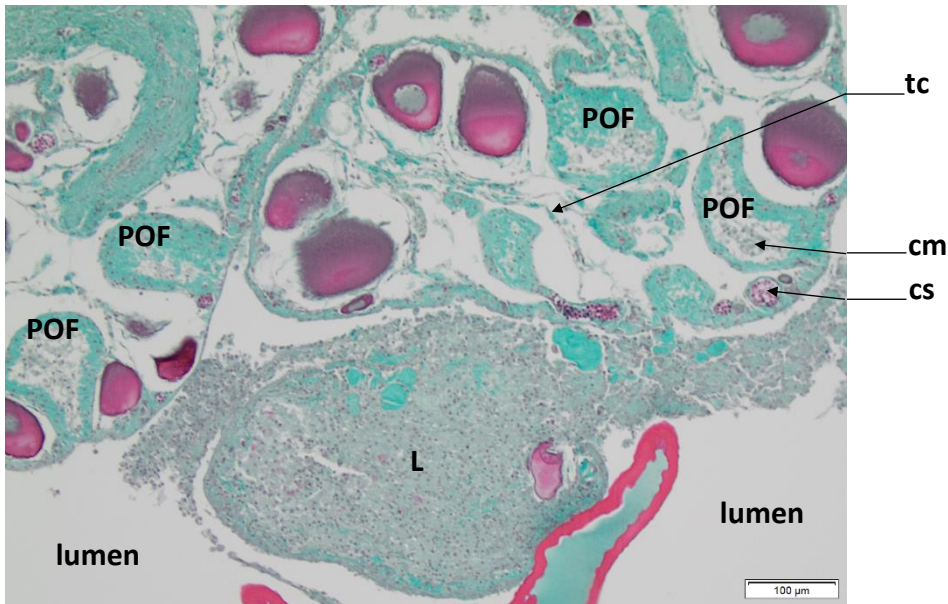


Figure 34 : Plage de lyse cellulaire (L) dans le **lumen**, avec présence de follicules post-ovulatoires (POF) qui contiennent des cellules de lyse (cm). Présence aussi de tissu conjonctif (tc) et capillaires sanguins (cs)

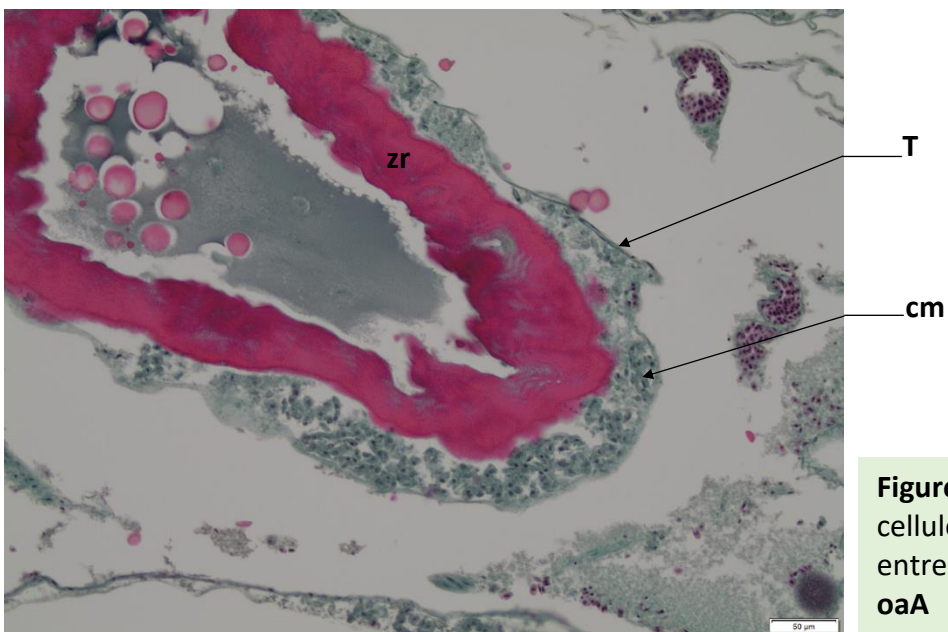


Figure 35 : Zoom sur des cellules macrophages (cm) entre la zr et la thèque (T) d'un oaA

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**.

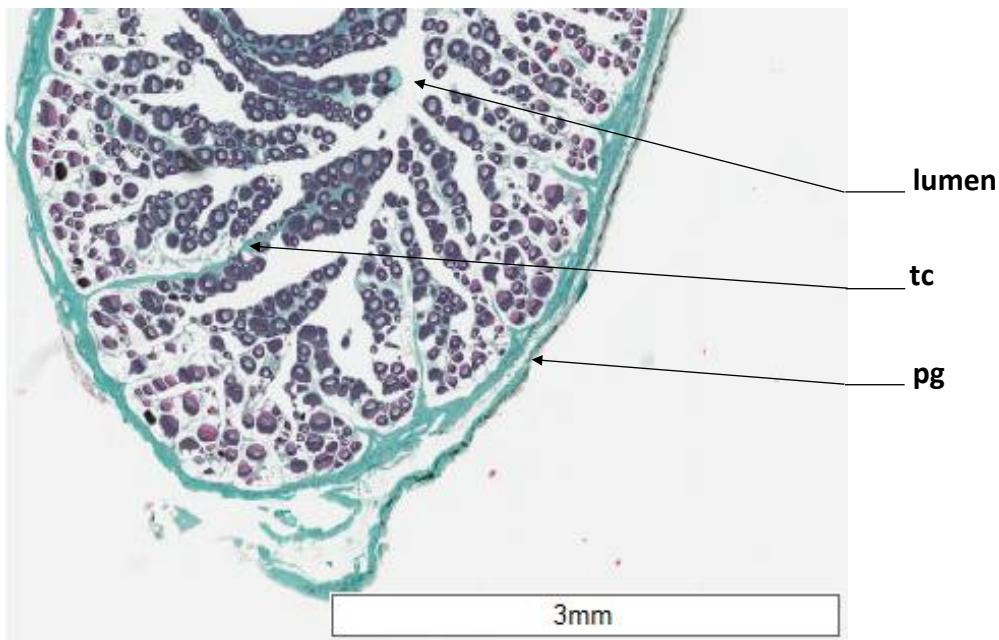


Figure 36 : Coupe d'ovaire de plie entourée de la paroi gonadique (**pg**). Les lamelles ovariennes tenues par du tissu conjonctif (**tc**) délimitent la zone du **lumen**

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.