

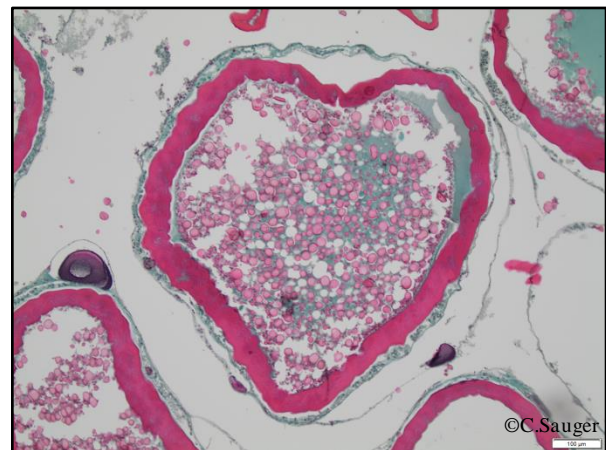
Université de la Réunion
Faculté des Sciences et Technologies
15 Avenue René Cassin, 97744 Saint Denis Cedex 9

Master 2 Biodiversité des Écosystèmes Tropicaux
Parcours Aquatiques, Littoraux et Insulaires

Mémoire de fin d'année de Master 2

SAUGER Carine

Maturité objective d'une espèce de poisson plat, la plie (*Pleuronectes platessa L.*), par l'histologie quantitative



Organisme d'accueil : IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER)
Station de Port-en-Bessin, Laboratoire des Ressources Halieutiques, Avenue
du Général de Gaulle, 14520 Port-en-Bessin

Sous la direction de DUBROCA Laurent (IFREMER) et QUINQUIS Jérôme (IFREMER)

Sous l'encadrement de KELLNER Kristell (UMR-BOREA)

Année universitaire 2018/2019

*Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas
engager la responsabilité de l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil*

Photographies de couverture : Gauche : photo d'une plie, *Pleuronectes platessa*, © IFREMER (IFREMER, 2011). Droite : 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

Remerciements

Laurent D.: Merci de l'opportunité que tu m'as offerte avec ce stage. Merci pour ton aide précieuse avec R, pour les conseils avisés tout au long du stage, du soutien moral surtout vers la fin de la rédaction et ta bonne humeur quasi constante. Et bien sûr, merci pour le plus beau poster géant d'ovaire de plie à la Andy Warhol !

Jérôme Q.: Merci d'avoir initié ce très beau projet MATO, de m'avoir aidé pour les longues heures de lectures des lames, de m'avoir accompagné aux nombreux aller-retour sur Caen, pour les heures Rock'n Roll passées à disséquer des plies... et bien plus encore !

Kristell K.: Un grand merci à toi pour m'avoir fait découvrir l'univers fascinant de la gamétogenèse avec toutes ses belles couleurs et cellules cachées ! Sans ton aide précieuse, le lexique ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui, ou ce qu'il sera demain.

Mélanie L.: Merci pour ton aide avec les lectures des lames, les colorations, les découpes des blocs de paraffine et les bons moments en général.

Julien N.: Merci pour ton aide avec les GLM, ta patience et tes explications, et les discussions intéressantes sur la gaméto entre moules et plies.

Nicolas E.: Merci pour ton temps, ton aide avec la numérisation des lames et images des ovaires et tes questions et remarques pertinentes pour ce rapport.

Finalement, un grand merci à Andréa L., ma voisine de bureau, pour tous ces fous rires. Merci à ma famille qui, même loin, était là pour moi. Et merci à tous les collègues et merveilleuses rencontres que j'ai pu faire sur Bayeux et Port-en-Bessin.

Contrairement à la croyance universelle, il fait souvent soleil en Normandie !

Sommaire

Liste des Figures	ii
Liste des Tableaux	iii
I. Introduction.....	1
II. Matériel et Méthode	9
A. L'échantillonnage.....	9
B. Fixation et préparation des coupes histologiques.....	11
C. Catégorisation des cellules et mise en place d'un lexique	11
D. Développement d'un protocole d'analyse histologique par imagerie quantitative	13
E. Analyses des données.....	13
a. Calibration interagents des lectures histologiques	13
b. Homogénéité histologique inter et intragonades.....	15
c. Analyses des lectures.....	15
1. Paramètres histologiques	16
2. Paramètres macroscopiques	16
3. Taille à la maturité sexuelle de 50% de la population (L50).....	17
III. Résultats	19
A. Calibration interagents.....	19
B. Homogénéité inter et intragonades.....	21
C. Résultats des lectures.....	21
a. Définition objective des phases de maturité.....	23
b. Évolution temporelle des structures histologiques.....	23
c. Description histologique des phases de maturité objective.....	27
d. Paramètres macroscopiques	31
e. Taille à la maturité sexuelle de 50% de la population (L50).....	31
IV. Discussion	33
A. Description de l'ovogenèse chez <i>Pleuronectes platessa</i>	33
B. Calibration et qualité des lectures	37
C. Cycle reproductif chez <i>Pleuronectes platessa</i>	39
D. Maturité objective vs Maturité estimée visuellement.....	45
E. Maturité objective en fonction des paramètres macroscopiques.....	45
V. Conclusion.....	46
Références.....	49
Annexes.....	II
<u>Annexe 1 : Protocole de photographie des gonades.....</u>	<u>II</u>
<u>Annexe 2 : Protocole pour le nom et identifiant des individus</u>	<u>III</u>
<u>Annexe 3 : Protocole de préparation des lames via fixateur Davidson</u>	<u>IV</u>
<u>Annexe 4 : Protocole de coloration au trichrome de Gabe et montage de lame au Roti-histol.....</u>	<u>IV</u>
<u>Annexe 5 : Analyse en composantes principales des 90 lames lues pour les 15 individus.....</u>	<u>VI</u>
<u>Annexe 6 : Analyse en composantes principales des 90 lames lues pour les 15 individus et 6 positions ..</u>	<u>VII</u>
<u>Annexe 7 : Distribution des 20 structures histologiques.....</u>	<u>VIII</u>

Liste des Figures

<i>Figure 1 : Schéma du cycle de reproduction avec la terminologie qui lui est associée pour les différentes phases de maturité (ICES, 2012).....</i>	<i>6</i>
<i>Figure 2 : Aire de distribution de la plie, Pleuronectes platessa en Europe (IFREMER, 2011).....</i>	<i>6</i>
<i>Figure 3 : Sous-régions marines et Divisions ICES et de la FAO pour les zones de pêche 27 et 37 en Atlantique Nord-Est (European Commission, 2014).....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 4 : Placement des 6 échantillons pour un individu dans des caissettes histologiques, avec leur identifiant.....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 5 : Interface Aperio.....</i>	<i>14</i>
<i>Figure 6 : Moyennes des pourcentages de comptage des différentes structures histologiques dans les ovaires de plies récoltés en novembre, décembre, janvier, février, mars et juin.....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 7 : Boîtes à moustaches des pourcentages de comptage des 20 structures histologiques retrouvées dans les ovaires de la plie pour les 4 groupes de maturité objective modélisés.....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 8 : Boîtes à moustaches des pourcentages de comptage des 20 structures histologiques retrouvées dans les ovaires de la plie, pour la phase de maturité objective D.....</i>	<i>30</i>
<i>Figure 9 : Arbre de classification des phases de maturité objective en fonction des différents paramètres macroscopiques.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 10 : Taille des 149 individus en cm en fonction de leur masse en g.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 11 : Ovogonies (ov).....</i>	<i>34</i>
<i>Figure 12 : Ovocyte précoce (op) et ovocyte à alvéoles corticales – précoce (cap).....</i>	<i>34</i>
<i>Figure 13 : Ovocyte avec alvéoles corticales (ca).....</i>	<i>34</i>
<i>Figure 14 : Ovocyte en vitellogenèse (vit1 à vit4).....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 15 : Ovocyte en cours d'hydratation (och).....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 16 : Ovocyte hydraté (oh) non émis.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 17 : Ovocyte entre le stade vit3 et vit4.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 18 : Coupe histologique d'un ovaire de plie en phase A (immature).....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 19 : Coupe histologique d'un ovaire de plie en phase B (développement).....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 20 : Coupes histologiques d'ovaires de plie en phase C (frai).....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 21 : Coupes histologiques d'ovaire de plie en phase D (régénération/régression).....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 22 : Coupe histologique d'un ovaire de plie au stade E (omission de frai).....</i>	<i>44</i>
<i>Figure Annexe 1: Gonade ventrale (bas) et gonade dorsale (haut) sur fond vert.....</i>	<i>II</i>

Liste des Tableaux

<i>Tableau 1 : Tableau de conversion entre l'échelle de maturité macroscopique des téléostéens du GFCM et l'échelle de maturité révisée du WKMATCH 2012 de l'ICES (ICES, 2018a).....</i>	<i>4</i>
<i>Tableau 2 : Différences des taux de comptage des structures histologiques pour les premières lectures.....</i>	<i>20</i>
<i>Tableau 3 : Différences des taux de comptage des structures histologiques pour les deuxièmes lectures.....</i>	<i>20</i>
<i>Tableau 4 : Résultats de la fonction drop1 sous R pour les modèles linéaires généralisés (GLM binomial lien logit) de chaque structure histologique retrouvées à travers les 90 lames lues.....</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 5 : Moyennes de la longueur en cm (L_{fish}), de la masse en g (W_{fish}) et de l'âge en année des individus en fonction des mois.....</i>	<i>24</i>
<i>Tableau 6 : Définitions des différentes phases de maturité des ovaires chez les poissons femelles, leurs descriptions macroscopiques et histologiques (ICES, 2012, 2014a, 2018a ; Brown-Peterson et al., 2011), les modèles mis en place pour les différentes phases de maturité objective pour cette étude et images des coupes histologiques des ovaires de plie</i>	<i>25</i>
<i>Tableau 7 : Matrice de confusion entre les phases de maturité estimées visuellement (1, 2A, 2B, 3A, 3B, 4, 4A et, 4B) et les phases de maturité objective (A, B, C, D et E).....</i>	<i>30</i>

I. Introduction

En gestion des pêches, la capacité de reproduction d'un stock est un paramètre essentiel à la mise en place des plans de gestion. Elle correspond à la capacité d'une population à produire des œufs et des larves viables (Alonso-Fernández et al., 2013). Ces stocks sont « *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, 2018a). Cette capacité de reproduction est estimée à partir d'échantillons biologiques, avec prélèvement des individus de l'espèce considérée dans le milieu. Leurs états de maturité sexuelle, d'immatures à matures en passant par différentes phases de développement (Immature, Développement, Frai, Régression, Régénération, Omission de frai) sont estimés en laboratoire ou sur le terrain (Alonso-Fernández et al., 2013). Ces données vont permettre le calcul du nombre d'individus matures dans un stock (SSB ou « *Spawning Stock Biomass* ») (Domínguez-Castanedo et al., 2016), et seront utilisées pour alimenter les modèles de dynamique de population utilisés pour estimer les volumes de captures d'une année à l'autre dans les plans de gestion (Bromley, 2000 ; Domínguez-Castanedo et al., 2016). Il est donc primordial de pouvoir caractériser et classer correctement les états matures et immatures d'une espèce afin de pouvoir estimer de manière fiable et précise la taille et la capacité de reproduction de ces stocks commerciaux (Alonso-Fernández et al., 2013 ; FAO, 2018). Une amélioration des méthodes d'estimation des phases de maturité individuelles permettra la mise en place de modèles plus fiables pour l'évaluation de la productivité des stocks exploités et, *in fine*, permettra une meilleure gestion de ces stocks (Alonso-Fernández et al., 2013).

Chez les poissons, la détermination de la maturité utilise classiquement une lecture visuelle des caractères macroscopiques des gonades d'un individu (taille, couleur, texture) (Brown-Peterson et al., 2011 ; ICES, 2018a ; IFREMER, 2018b). Si cette méthode est simple et rapide, elle peut engendrer une grande incertitude dans l'identification de la phase de maturité du fait de la subjectivité de certains critères de lecture (Brown-Peterson et al., 2011 ; Gerritsen and McGrath, 2006). De plus, les cycles de maturité sexuelle sont mal connus chez certaines espèces de poissons et la détermination des phases de maturité peut être imprécise et présenter de grandes variabilités entre opérateurs (Gerritsen and McGrath, 2006 ; Quinquis et al., 2018). En effet, les résultats des lectures peuvent varier de 30 % à 50 %, avec des incertitudes les plus élevées aux phases précoces de maturité (d'immature à la première maturité) (ICES, 2018b, 2013 ; IFREMER, 2018b).

À ce jour, il n'existe pas de terminologie précise pour décrire le développement du système de reproduction des poissons. Or la description de ces processus est essentielle dans de nombreux domaines qui ont besoin de décrire ces processus à différents niveaux (e.g. le développement des gonades des poissons en biologie, ou encore le développement des gamètes et l'impact sur la physiologie des individus en aquaculture) (Brown-Peterson et al., 2011). La méthode la plus précise qui produit aussi le plus d'information, dans le but de classer des individus dans les différentes phases du cycle reproductif, est la classification basée sur l'étude histologique de la gonade (Brown-Peterson et al., 2011 ; Hunter and Macewicz, 1985).

Il existe de nombreuses classifications et terminologies dans la littérature pour qualifier le cycle de reproduction ichtyologique (Brown-Peterson et al., 2011 ; ICES, 2018a, 2014a, 2012, 2010, 2008). De plus, ces échelles de maturité sont en constante évolution et diffèrent en fonction des instituts (ICES, 2018a). En effet, le Tableau 1 compare deux échelles : celle de la Commission générale des pêches pour la Méditerranée (GFCM) avec celle du Conseil International pour l'Exploration de la Mer (ICES). La plus grande différence est que là où l'ICES définit 8 phases, le GFCM en définit 7 et ne prend pas en compte les individus qui font de l'omission de frai ou qui sont intersexués. De plus, les définitions au sein même de ces phases peuvent varier, comme c'est le cas par exemple pour la phase 2b du GFCM (individus qui ont terminé un cycle de reproduction et qui se préparent à en effectuer un second) qui est associée à la phase Bb de l'échelle ICES, phase qui débute à l'entrée en période de reproduction jusqu'à avant la ponte et qui est constituée des individus possédant des ovocytes à alvéoles corticales, jusqu'aux ovocytes en début de vitellogenèse (ICES, 2018a).

Cette profusion d'informations provoque des confusions et des problèmes de communication entre les différentes disciplines liées à l'ichtyologie (Brown-Peterson et al., 2011). Ces incertitudes ont trois conséquences majeures :

- (1) elles entravent la compréhension fine des mécanismes régissant les évolutions des traits d'histoire de vie des populations exploitées (Marty et al., 2014),
- (2) elles remettent en question la qualité de plus de 30 000 mesures de maturité effectuées chaque année par l'IFREMER, et cela sur plus de 80 espèces (IFREMER, 2018b),
- (3) elles impactent la mise en place des modèles d'évaluation des stocks et donc par extension les politiques de gestion de stocks à l'échelle européenne (IFREMER, 2018b).

Tableau 1 : Tableau de conversion entre l'échelle de maturité macroscopique des téléostéens du GFCM et l'échelle de maturité révisée du WKMATCH 2012 de l'ICES (ICES, 2018a)

GFCM SCALE Bony fish	WKMATCH 2012 maturity scale revised
1. IMMATURE / VIRGIN	A. IMMATURE
2a. VIRGIN DEVELOPING	Ba. DEVELOPING BUT FUNCTIONALLY IMMATURE
2b. RECOVERING	Bb. DEVELOPING AND FUNCTIONALLY MATURE
2c. MATURING	C. SPAWNING
3. MATURE / SPAWNER	
4a. SPENT	Da. REGRESSING
4b. RESTING	Db. REGENERATING
	E. OMITTED SPAWNING
	F. ABNORMAL

Cette disparité a conduit l'ICES à poser deux recommandations lors du travail européen WKMATCH, 2012 : améliorer les connaissances sur le sujet et harmoniser les pratiques (ICES, 2014a, 2012a). C'est dans cette visée que le projet de recherche MATO (MATurité Objective des poissons par l'histologie quantitative) s'inscrit, afin d'approfondir les connaissances, d'objectiver les techniques de lecture histologiques et de mettre en place des protocoles précis de détermination de la maturité en suivant les critères de l'ICES.

Dans le souci d'uniformité des pratiques pour cette étude, c'est la terminologie de Brown-Peterson et al. (2011) qui sera utilisée dans ce rapport, car elle est en accord avec les groupes de travail de l'ICES ayant défini les grilles d'évaluation des échelles de maturité pour les espèces européennes (ICES, 2018a, 2014a, 2013, 2012a, 2010, 2008). Cette grille stipule que, pour le cycle de reproduction des poissons, le terme « phase » est utilisé dans le cadre du développement des gonades avec une division de ces phases en 7 sections (Figure 1) : la phase Immature (A) qui regroupe les juvéniles, la phase Développement (B) avec les individus dont les gonades sont en train de commencer leur cycle de reproduction, la phase de Frai (C) avec les individus en ponte, la phase de Régression (Da) avec des individus qui viennent de pondre et qui nettoient leurs gonades via de la lyse, la phase de Régénération (Db) avec les individus qui ont pondu et qui reconstituent une population de cellules germinales dans leurs gonades, les individus en Omission de Frai (E) et la phase Anormal (F) ou avec des individus intersexués. Pour la description du développement individuel des gamètes, le terme « stade » sera utilisé (Brown-Peterson et al., 2011 ; ICES, 2018a).

Cette étude fait suite au projet MATO après à une première démarche descriptive de la maturité sexuelle des ovaires chez la sole (*Solea solea*, Linné 1758) (Quinquis et al., 2018), avec comme nouveau modèle d'étude un autre poisson plat : la plie (*Pleuronectes platessa*, Linné 1758). Cette espèce européenne est exploitée depuis plusieurs siècles et est un des poissons commerciaux les mieux étudiés en mer du Nord (ICES, 2014b ; IFREMER, 2019). Elle présente une aire de répartition (Figure 2) allant de l'ouest de la mer Méditerranée, longeant les côtes européennes et remontant jusqu'en Islande, en passant par la mer du Nord et le Skagerrak (Hoarau et al., 2002 ; ICES, 2014b ; IFREMER, 2011). D'un point de vue commercial, la pêche de plies représente 110 000 tonnes de poissons débarquées en 2017 dans le secteur d'étude (ICES, 2018c).

La plie est un poisson téléostéen de l'ordre des Pleuronectiformes, de la famille des Pleuronectidés et est le seul représentant de son genre (Hoarau et al., 2002 ; ICES, 2014b ; IFREMER, 2011). Ce poisson plat est caractérisé par des yeux sur la partie droite du corps, ainsi qu'une ligne latérale bien développée de chaque côté du corps (ICES, 2014b ; IFREMER, 2011).

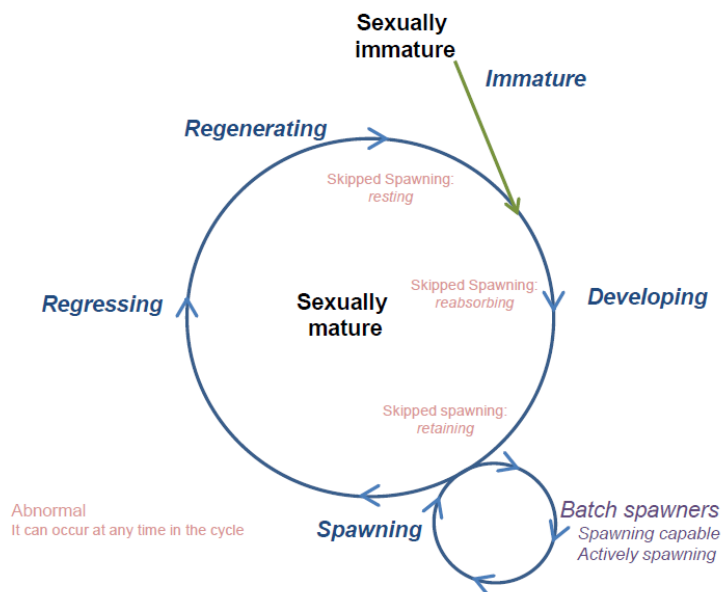


Figure 1 : Schéma du cycle de reproduction avec la terminologie qui lui est associée pour les différentes phases de maturité (ICES, 2012)



Figure 2 : Aire de distribution de la plie, *Pleuronectes platessa* en Europe (IFREMER, 2011)

Cette espèce est dite « synchrone », c'est-à-dire que les femelles vont pondre leurs ovocytes en une seule fois lors de la saison de reproduction (« *total spawners* » en anglais) (Brown-Peterson et al., 2011) avec une période de ponte allant de décembre à mars (Bromley, 2000 ; Brule, 1987 ; Cushing, 1969 ; Dawson and Grimm, 1980 ; Hoarau et al., 2002). De plus, d'après la littérature, les femelles atteindront une maturité sexuelle vers 4 et 5 ans (ICES, 2014b ; IFREMER, 2011).

L'histologie des gonades chez la plie est peu référencée dans la littérature, ou renvoie à des publications anciennes (Barr, 1963 ; Brule, 1987 ; Lincoln, 1981 ; Miossec, 1984). Pour cette étude, seules les gonades des femelles seront étudiées, les gamètes femelles étant plus faciles à observer par leurs plus grandes tailles et apportent une information sur la production d'œufs dans les calculs de productivité des stocks (Brown-Peterson et al., 2011). Dans les organisations régionales de gestion des pêches telles que le Conseil International pour l'Exploitation de la Mer (ICES) et la Conférence Générale des Poids et Mesures (CGPM), il n'existe toujours pas de fiches descriptives standardisées des caractères macroscopiques (Società Italiana di biologia marina, 2015) et microscopiques des phases de maturité de la plie (FAO, 2018 ; Società Italiana di biologia marina, 2015).

La visée de cette étude est donc la mise en place d'une méthode objective de détermination des phases de maturité chez la plie. À l'heure actuelle, ce sont les critères macroscopiques (couleur, texture et aspect visuel de l'ovaire) qui sont utilisés pour la détermination des phases de maturité. Notre objectif était de valider les individus échantillonnés dans ces phases de maturités en utilisant les critères histologiques des ovaires de la plie. Il a fallu avant tout décrire l'ovogenèse complète de l'espèce avec la mise en place d'un document descriptif précis des différentes cellules et structures histologiques retrouvées dans les ovaires de la plie. En partant de ce document, il a été possible d'établir un protocole de lecture quantitative de lames histologiques pour l'espèce étudiée. Ce travail a mené à la confection d'une base de données histologique en suivant les définitions de l'ICES pour établir la maturité objective de chaque individu. Ce travail permettra non seulement la mise en place de grilles d'évaluations objectives de la maturité des poissons en fonction de données histologiques et macroscopiques, mais complètera en plus les connaissances fragmentaires sur le développement sexuel de ce poisson.

Afin de répondre à cette problématique, dans un premier lieu, la description de l'ovogenèse et des critères histologiques pour la classification des poissons dans les différentes phases de maturité sera établie. Par la suite, les individus des différentes phases seront regroupés via des arbres de classification pour relier ces phases de maturité objective avec leurs variables macroscopiques. Dans un dernier temps, il sera possible de comparer les résultats obtenus pour l'indice à 50 % de maturité des individus d'une population (L50) avec ceux de la littérature.

II. Matériel et Méthode

A. L'échantillonnage

Le protocole d'échantillonnage suit celui mis en place pour l'étude de la maturité de la sole (*Solea solea*, Linné 1758) qui a eu lieu en 2015 et 2016 (Quinquis et al., 2018). Pour cette étude, les plies sont pêchées par chalutage (ICES, 2015) en Manche (division ICES VII d) (Figure 3). Afin de couvrir l'ensemble du développement ovarien durant les différentes phases de maturité de la plie, le plan d'échantillonnage prend en compte l'ensemble des tailles d'individus disponibles sur la zone d'étude. Les individus sont obtenus via les prélèvements biologiques issus du suivi des pêcheries commerciales menées par l'IFREMER. Ces échantillons incluent les poissons en dessous et au-dessus de la taille légale de commercialisation (27 cm). Afin de prendre en compte tout le cycle de reproduction, les individus ont été prélevés pendant la période de ponte de l'espèce, de décembre à mars (Bromley, 2000 ; Brule, 1987 ; Cushing, 1969 ; Dawson and Grimm, 1980 ; Hoarau et al., 2002). Des échantillons ont été récoltés les 20, 21, 22, 23 janvier 2017, les 7 et 18 décembre 2017, le 15 mars, 11 juin, 14 novembre et 12 décembre 2018, ainsi que le 21 janvier, 20 février et 26 mars 2019.

Pour les 289 individus femelles disséqués, chaque individu a été mesuré (longueur totale au cm inférieur), pesé (masse totale au gramme inférieur) et âgé (année, par otolithométrie). L'observation visuelle des gonades par un agent expérimenté a permis de déterminer la phase de maturité sexuelle, suivant la grille de lecture utilisée en Europe (phases 1, 2A, 2B, 3 et 4 décrites dans le WKMATCH, 2012). Les deux gonades ont ensuite été prélevées et photographiées. Ces photographies standardisées (Annexe 1) permettent après traitement d'obtenir le volume des gonades. La photo prendra le nom de l'identifiant, identifiant qui sera lui-même mis en place selon les critères de l'individu (Annexe 2).

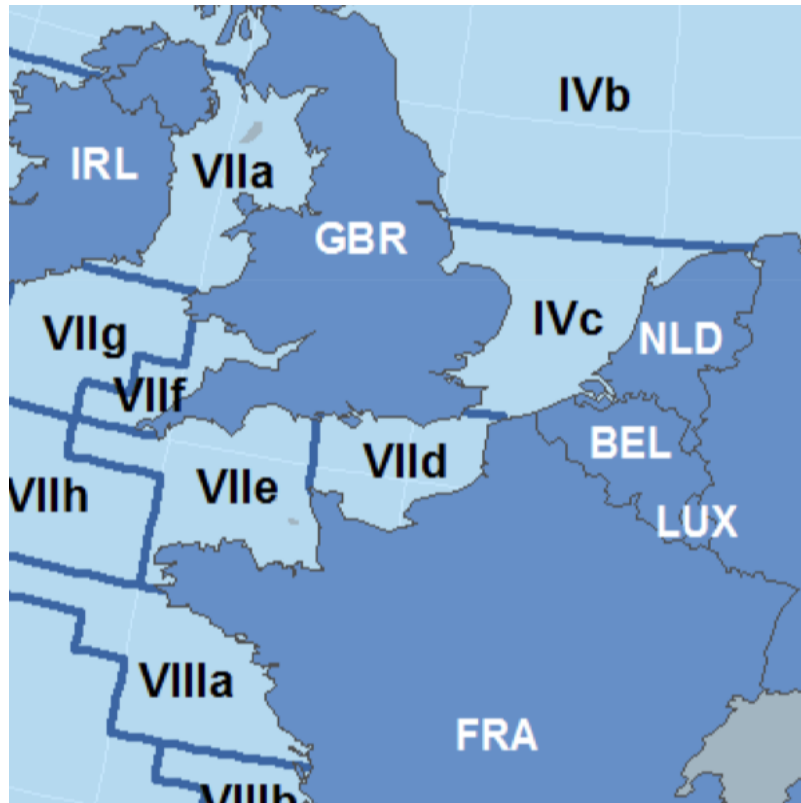


Figure 3 : Sous-régions marines et Divisions ICES et de la FAO pour les zones de pêche 27 et 37 en Atlantique Nord-Est (*European Commission, 2014*)

B. Fixation et préparation des coupes histologiques

Pour les individus dont la longueur des gonades est inférieure à 3 cm, la gonade a été placée dans une cassette histologique dans son intégralité. Pour les individus dont la longueur des gonades dépasse 3 cm, 3 sections de 1 cm de long sont prélevées sur les deux gonades nommées dorsale (codée D) et ventrale (codée V). Ces sections sont situées à l'extrémité antérieure (codée 1), en position médiane (codée 2) et à l'extrémité postérieure (codée 3) de chaque ovaire. Les 6 échantillons sont placés dans six caissettes différentes pour fixation, avec leur étiquette d'identification (Figure 4) à laquelle on rajoute la position de l'échantillon (V1, V2, V3, D1, D2 ou D3) avant d'être fixés au « Davidson » pour être préparés avant la coloration (Annexe 3).

Les lames sont alors colorées au trichrome de Prenant-Gabe (Gabe, 1968 ; Annexe 4) après avoir été préalablement déparaffinées et réhydratées. Cette coloration met en avant les structures cellulaires avec l'utilisation d'hématoxyline pour des noyaux en gris ardoise, l'éosine pour une coloration du cytoplasme en rose et le vert lumière pour que le tissu conjonctif ressorte en vert. Les coupes sont alors montées entre lame et lamelle avec du Roti-Histokitt.

C. Catégorisation des cellules et mise en place d'un lexique

Un lexique a été mis en place avec l'aide d'experts en gamétogenèse du laboratoire Biologique des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (UMR BOREA) de l'Université de Caen Normandie. Afin de suivre au mieux l'étude, il est fortement conseillé de se référer à la publication de Sauger and Kellner (2019). Ce lexique décrit précisément chaque type de cellule, précise leurs tailles moyennes et les différentes structures qui peuvent être observées aux différents stades de l'ovogenèse. De plus, il définit le vocabulaire précis qui sera utilisé pour toute la durée de cette étude et permet l'identification objective des cellules germinales à différents stades de développement chez la plie. Ces différentes phases de maturité et stades des follicules ont été définies en fonction des travaux de l'ICES (2018a, 2014a, 2012) et Brown-Peterson et al. (2011), dans la visée d'une harmonisation du vocabulaire utilisé pour la description de la maturité sexuelle avec l'histologie quantitative. Afin d'harmoniser davantage les lectures des lames histologiques, un protocole de lecture a été mis en place (Sauger et al., 2019).



Figure 4 : Placement des 6 échantillons pour un individu dans des caissettes histologiques, avec leur identifiant. Haut de gauche à droite : D1, D2, D3. Bas de gauche à droite : V1, V2, V3

D. Développement d'un protocole d'analyse histologique par imagerie quantitative

Les lames ont été numérisées avec un scanneur de lame piloté avec le logiciel Scan Scope Console (v.10.2.0.2352, Leica Biosystems), au grossissement x20. Les images ont ensuite été analysées dans le logiciel Aperio ([Aperio Technologies, 2015](#)). La Figure 5 montre l'interface du logiciel avec le contour de la gonade délimitée par un trait rouge et les croix bleues indiquant le plan d'échantillonnage pour l'identification des cellules. Ce comptage en stéréologie est basé sur la méthode de Glagoleff (1934) qui surimpose un réseau de points sur une coupe histologique. Cette méthode permet par la suite d'estimer la fraction de points comptés ramenée à un pourcentage (nombre de points pour une structure donnée/nombre de points totaux * 100). Le plan d'échantillonnage pour le comptage est une grille de 500 à 600 croix équidistantes, avec un point de départ aléatoire. Pour chaque point échantillonné, un seul type de structure est associé (fenêtre avec les cases multicolores de la Figure 5). 20 structures différentes ont été déterminées suite à la mise en place du lexique descriptif.

E. Analyses des données

Les analyses effectuées dans ce rapport ont été réalisées en utilisant le logiciel R ([R Core Team, 2016](#)). Les valeurs moyennes sont données avec leurs écarts types. Pour les boîtes à moustaches, Q1 est le quantile à 25 %, M la médiane et Q3 le quantile à 75 %.

a. Calibration interagents des lectures histologiques

Pour quantifier les erreurs de lectures entre agents, le niveau de différences d'identifications des structures entre plusieurs agents a été évalué. 15 lames ont donc été lues par 3 agents différents. Un indicateur d'erreur de lecture, correspondant à la différence en pourcentage entre la valeur de comptage maximale et la valeur de comptage minimale pour les différentes structures identifiées dans chaque lame, a été élaboré. La première série de lecture a permis de corriger et d'améliorer le protocole de lecture ([Sauger et al., 2019](#)) et d'atteindre un seuil d'erreur inférieur à 3 %. Une deuxième série de lecture a été réalisée et analysée par l'utilisation du pourcentage d'accord entre lecteurs et l'indice kappa de Fleiss, indice statistique basé sur le degré d'accord entre lecteurs pour la classification d'objets ou de personnes ([Conger, 1980](#) ; [Hallgren, 2012](#) ; [McHugh, 2012](#)).

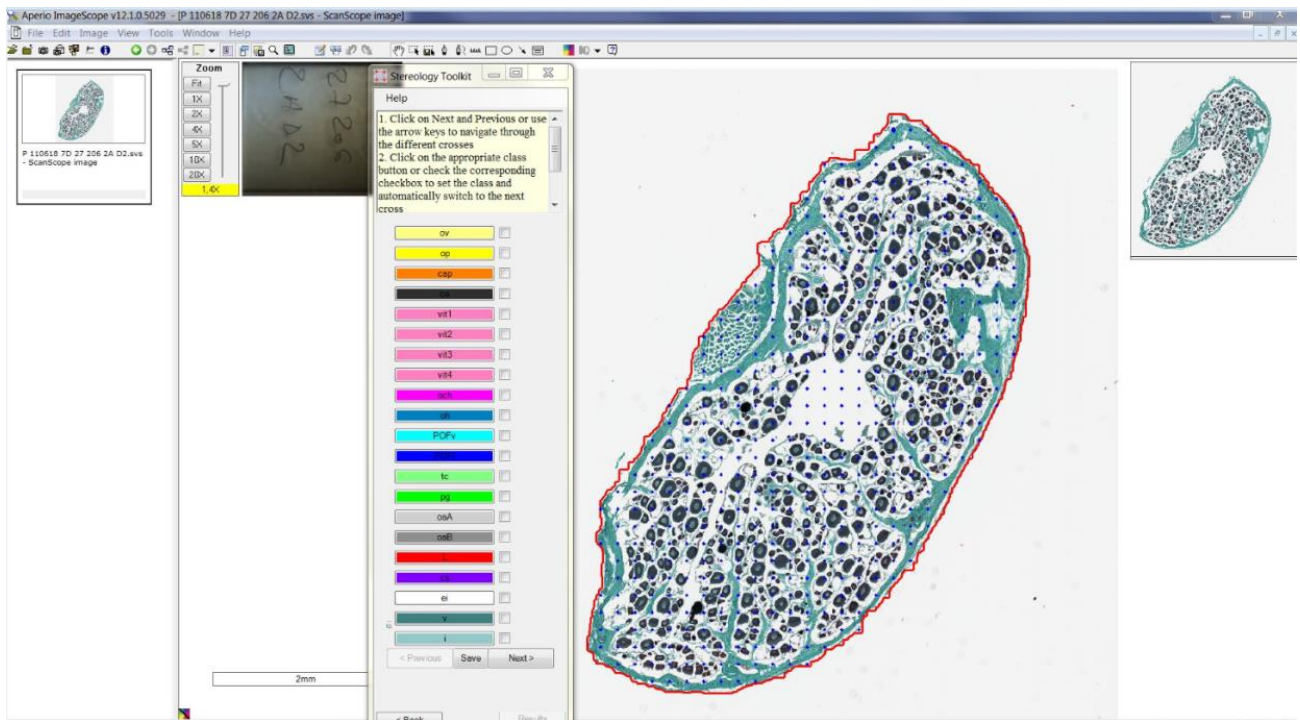


Figure 5 : Interface Aperio avec une image de coupe de gonade délimitée (trait rouge), des croix (bleu) d'échantillonnage et le tableau des différents types de structures cellulaires identifiables tels que : ovogonie (**ov**), ovocyte précoce (**op**), ovocyte à corticale alvéolaire précoce (**cap**), ovocyte à corticale alvéolaire (**ca**), ovocyte au stade 1 de vitellogenèse (**vit1**), ovocyte au stade 2 de vitellogenèse (**vit2**), ovocyte au stade 3 de vitellogenèse (**vit3**), ovocyte au stade 4 de vitellogenèse (**vit4**), ovocyte en cours d'hydratation (**och**), ovocyte hydraté (**oh**), follicule post-ovulatoire (**POF**), tissu conjonctif (**tc**), paroi gonadique (**pg**), ovocyte en atrophie précoce (**oaA**), ovocyte en atrophie tardive (**oaB**), lyse cellulaire (**L**), capillaires sanguins (**cs**), espace intercellulaire (**ei**), vide dû à la coupe (**v**) et cellules indéterminées (**i**)

b. Homogénéité histologique inter et intragonades

Afin d'étudier l'homogénéité du contenu histologique à l'intérieur d'une gonade et entre les deux gonades d'un même individu, 6 lames correspondant aux coupes antérieures, médianes et postérieures des gonades ventrales et dorsales (codées respectivement D1, D2, D3 et V1, V2, V3) pour 15 individus ont été comparées entre elles. Les 15 individus choisis pour cette partie de l'étude ne présentaient pas d'ovocytes en vitellogenèse avancée (**vit4**), en cours d'hydratation (**och**) ou hydratés (**oh**). Ces lectures ont été effectuées par les 3 agents ayant validé la phase d'intercalibration. Pour chaque section d'un même ovaire, soit pour 3 lames, les lames correspondantes ont été attribuées aléatoirement à chacun des agents.

Par la suite, la différence (en %) entre le comptage maximal et le comptage minimal des structures retrouvées à travers les 6 positions, ainsi que des histogrammes de chaque structure comptée, ont été réalisés pour chaque individu afin de visualiser les résultats obtenus. Dans le but d'explicitier objectivement les effets de la position de la coupe et de la gonade sur les fréquences des structures cellulaires au sein des coupes, des modèles linéaires généralisés (GLM) ont été construits. Ces modèles permettent de mettre en évidence les différences entre les 6 lames pour chaque structure cellulaire pour les 15 individus. La variable réponse utilisée est le nombre de fois qu'une structure a été comptée sur la lame en fonction du nombre total de structures comptées sur cette même lame. Pour élaborer les GLM, la distribution du terme d'erreur suit donc une loi binomiale et la fonction de lien utilisée est *logit* (Chessel and Thioulouse, 2013 ; Zuur et al., 2009). Les résultats des modèles sont analysés en utilisant les déviations individuelles des variables testées. Une analyse en composante principale (ACP) des contenus histologiques est réalisée afin de résumer et de représenter l'information des lectures.

c. Analyses des lectures

Après les étapes de validation, 207 lames ont été lues. Pour les individus avec une seule coupe histologique par ovaire, la lecture de la lame histologique de l'ovaire ventral a été effectuée, alors que les lames V2 ont été lues pour les individus dont les ovaires étaient coupés en 3 sections. Sur ces 207 lames, 58 lames se sont révélées trop abîmées pour être représentatives du contenu cellulaire de la gonade (perte importante de vitellus après la coupe, parties de la paroi gonadique manquante, gonade éventrée avec des cellules parsemées sur la lame, etc.).

1. Paramètres histologiques

Les 20 structures cellulaires répertoriées sont celles retrouvées dans le lexique et protocole de lecture (Sauger et al., 2019 ; Sauger and Kellner, 2019), avec **ov** (ovogonie), **op** (ovocyte précoce), **cap** (ovocyte à alvéoles corticales — précoces), **ca** (ovocytes à alvéoles corticales), **vit1** (ovocytes en vitellogenèse 1), **vit2** (ovocytes en vitellogenèse 2), **vit3** (ovocyte en vitellogenèse 3), **vit4** (ovocyte en vitellogenèse 4), **och** (ovocyte en cours d'hydratation), **oh** (ovocyte hydraté), **POF** (Follicule Post-Ovulatoire), **oaA** (ovocyte atrétique alpha), **oaB** (ovocyte atrétique beta), **L** (lyse), **ei** (espace intercellulaire), **i** (structures indéterminées), **pg** (paroi gonadique), **tc** (tissu conjonctif), **v** (vide dû à la coupe), **cs** (capillaire et / ou vaisseau sanguin).

En suivant la description de l'évolution du contenu cellulaire des gonades en fonction de l'état de maturité de l'individu proposé par la littérature (WKASMSF de l'ICES (2018a) ; WKMATCH de l'ICES (2012, 2014a) ; Brown-Peterson et al., 2011) et en intégrant les observations faites pendant la lecture des lames, nous avons pu établir une définition histologique des différentes phases de maturité de la plie. Cela a ensuite permis la catégorisation des individus dans les différentes phases de maturité en fonction de critères histologiques. Des boîtes à moustache, ou *boxplots* (Tukey, 1977), des différentes structures cellulaires illustrent chacune des 5 phases définies.

Une classification ascendante hiérarchique (CAH) est appliquée aux contenus histologiques des individus non classés. Pour cette CAH, le nombre optimal de partitions est défini en utilisant la *gap* statistique (package *cluster* ; Rousseeuw et al., 2019) avec 1000 itérations. Le dendrogramme résultant de la CAH a été réalisé avec la fonction *diana* (20 classes). Finalement, les *boxplots* des contenus cellulaires de ces groupes (ou *clusters*) ont été réalisés pour supporter l'interprétation et la définition de la phase de maturité de ces groupes.

Une fois les phases de maturité objective attribuées à chaque individu, une matrice de confusion entre les catégories de maturité estimées visuellement et les catégories de maturité objective a pu être construite.

2. Paramètres macroscopiques

Parmi les 149 lames exploitables, seules 119 étaient associées à des données enregistrées au moment de la capture : **L_fish** (longueur du poisson (cm)), **W_fish** (masse du poisson (g)), **matu_estim** (phase de maturité estimée à l'œil nu), **matphase** (phase de maturité objective), **age** (âge du poisson (ans)), **W_gond** (masse de l'ovaire (g)), **air_gond** (aire de l'ovaire (mm²)), **L_gond**

(longueur de l'ovaire (mm)), **Width_gond** (largeur de l'ovaire (mm)), **Width_half_L_gond** (largeur maximale à mi-longueur de l'ovaire (mm)), **ID_Col** (couleur moyenne de l'ovaire (index entre 0 et 360)) et **Mod** (couleur médiane de l'ovaire (index entre 0 et 360)). À partir de ces données, les calculs suivants ont pu être réalisés : **rap** (rapport entre la taille de l'ovaire et la taille du poisson), **rapgon** (rapport de la masse de l'ovaire en fonction de la taille) et **rapgonw** (rapport gonado-somatique, soit le rapport de la masse de l'ovaire en fonction de la masse du poisson).

Après ajout de ces variables à la base de données, le logiciel Excel (v. 16.25) a été utilisé pour la création de la figure montrant la distribution des structures histologiques en fonction des mois. Finalement, la construction d'un arbre de classification entre différentes phases de maturité objective et les paramètres macroscopiques des gonades ventrales a été réalisée. Cet arbre prend en compte toutes les données macroscopiques, contient au moins 8 observations, sans contraintes sur la qualité du découpage ($c=1$) et n'a pas été élagué.

3. Taille à la maturité sexuelle de 50 % de la population (L50)

L'ogive de maturation a aussi été calculée pour la maturité estimée et la maturité objective. Elle permet de calculer pour une espèce ou un stock donné, la taille à laquelle 50 % de la population est mature sexuellement, c'est l'indice L50. On estime cette ogive à l'aide d'une régression logistique entre les longueurs et les états matures et immatures. Pour la maturité objective, les phases matures sont B, C, D et E, et la phase immature sont les individus A. Pour la maturité estimée, les matures sont 2A ; 2B, 3 et 4 et la phase immature sont les individus 1. La fonction *gonad_mature* du package *sizeMat* (Torrejon-Magallanes, 2018) a été utilisée pour estimer les L50. Une figure de la longueur (cm) des individus en fonction de leur masse (g) a aussi été réalisée.

III. Résultats

A. Calibration interagents

La première lecture met en évidence une différence maximale de 18.04 % pour une des surfaces d'une structure comptée par les 3 agents (Tableau 2). En prenant en compte les surfaces estimées de toutes les structures au travers des 15 lames lues, seules quatre surfaces ont, en moyenne, une différence de plus de 3 % entre les 3 lecteurs. En effet, pour ces quatre surfaces, les différences moyennes des structures comptées sont les suivantes : **i** est de 5.34 % (± 2.87 %), de 4.90 % (± 2.60 %) pour **cap**, de 4.28 % (± 2.26 %) pour **ei** et de 4.04 % (± 2.07 %) pour **tc**.

La deuxième lecture, après avoir reprecisé le protocole de lecture, met en évidence une différence maximale de 14.14 % pour une des surfaces d'une structure comptée par les 3 agents (Tableau 3). Pour toutes les surfaces des structures cellulaires comptées à travers les 15 lames, en moyenne une différence de plus de 3 % est observée pour trois types de surfaces entre les trois lecteurs. En effet, il est observé une différence moyenne de 4.51 % (± 2.39 %) pour les surfaces de **i**, de 3.93 % (± 2.03 %) pour **ei** et de 3.80 % (± 1.96 %) pour **tc**.

Lors de cette deuxième lecture, certaines grilles de comptages (grille d'échantillonnage de croix bleues du logiciel Aperio) n'étaient pas identiques. Pour la lame n°4, un agent n'avait pas fait de relecture. En enlevant ses données de comptages, le pourcentage d'accord (%Agree) passe de 69 % à 80.2 % et l'indice de kappa de Fleiss (kappa) passe de 71.9 % à 73.7 %. Pour la lame n°5, une grille de lecture était différente des deux autres, suite à une mauvaise manipulation des dossiers. En la retirant de la base de données, le %Agree passe de 58.2 % à 87 % et le kappa passe de 61.2 % à 82.9 %. Pour la lame n°6, si les données de l'agent qui n'a pas relu la lame sont retirées, le %Agree passe de 73.4 % à 82.2 % et le kappa de 76.4 % à 77.3 %. Pour la lame n°11, une des grilles de comptage lors de la deuxième lecture n'était pas identique à celles des deux autres agents. En retirant ces données de comptages, le %Agree passe de 17.6 % à 82.63 % et le kappa passe de 24.1 % à 77.7 %. Finalement, pour la lame n°13, en retirant les données d'un agent qui n'avait pas la même grille de comptage, le %Agree passe de 22.3 % à 84.5 % et le kappa passe de 21.9 % à 79.8 %.

Tableau 2 : Différences des taux de comptage des structures histologiques pour les premières lectures. Lectures de 15 lames identiques par 3 agents différents. Les structures notées dans le tableau sont celles ayant une différence de comptage de plus de 3 % entre les 3 agents. Avec **ca** = ovocyte à alvéoles corticales, **cap** = ovocyte à alvéoles corticales – précoce, **ei** = espace intercellulaire, **i** = structure indéterminée, **L** = lyse cellulaire, **oaB** = ovocyte atrétique beta, **pg** = paroi gonadique, **tc** = tissu conjonctif et **v** = vide dû à la coupe

N° lame	Structures avec plus de 3% différence entre agents				
1	tc (13.48%)	ei (10.18%)	pg (3.19%)		
2	ei (10.32%)	oaB (9.43%)	tc (6.86%)	L (6.64%)	
3	ei (3.97%)	pg (3.77%)	v (3.77%)		
4	ei (8.62%)	tc (8.22%)			
5	pg (6.02%)	v (5.79%)	tc (5.14%)	ei (4.96%)	
6	ei (6.70%)	tc (6.70%)	i (3.45)		
7	v (6.77%)	pg (6.37%)	tc (4.12%)	ei (3.17%)	
8	i (8.81%)	cap (6.90%)	v (3.07%)		
9					
10	v (3.31%)				
11	i (11.00%)	cap (9.60%)	v (5.00%)		
12	i (10.87%)	cap (7.91%)	v (5.61%)	pg (3.23%)	ei (3.15%)
13	i (5.88%)	cap (5.16%)			
14	i (18.04%)	cap (18.01%)	ca (4.60%)	ei (4.09%)	
15	cap (11.39%)	i (8.11%)	ca (3.39%)		

Tableau 3 : Différences des taux de comptage des structures histologiques pour les deuxièmes lectures. Lectures de 15 lames identiques par 3 agents différents. Les structures notées dans le tableau sont celles ayant une différence de comptage de plus de 3 % entre les 3 agents. Les valeurs en rouge sont les pourcentages d'accord en dessous de 60 %. Avec Agreee(%) = le pourcentage d'accord entre les 3 lecteurs, Kappa Fleiss(%) = l'indice kappa de Fleiss (%), **ca** = ovocyte à alvéoles corticales, **cap** = ovocyte à alvéoles corticales – précoce, **ei** = espace intercellulaire, **i** = structure indéterminée, **L** = lyse cellulaire, **oaB** = ovocyte atrétique beta, **pg** = paroi gonadique et **tc** = tissu conjonctif

N° lame	Agreee(%)	Kappa Fleiss(%)	Structures avec plus de 3% différence entre agents				
1	79.8	82	i (5.16%)	tc (3.55%)	cap (3.31%)	pg (3.05%)	
2	81.6	83.6	L (11.74%)	oaB (14.14%)			
3	85.7	86.6					
4	69	71.9	i (9.52%)	cap (7.54%)	tc (5.56%)		
5	58.2	61.2	tc (4.22%)	ei (3.72%)			
6	73.4	76.4	ei (6.90%)	tc (6.70%)	i (3.45%)		
7	87.8	89	tc (3.31%)				
8	76.2	79.1	cap (4.79%)	i (4.60%)	ei (3.64%)	tc (3.11%)	
9	87.2	88.2					
10	83.3	85.2	ei (4.13%)	tc (3.47%)			
11	17.6	24.1	i (9.27%)	ei (8.61%)	cap (6.00%)	tc (4.07%)	pg (3.61%) v (3.27%)
12	77.7	79.9	i (6.53%)	cap (5.90%)	ei (5.37%)	tc (3.45%)	
13	22.3	21.9	i (5.97%)	cap (5.93%)	L (4.19%)		
14	71.9	73.7	ei (9.32%)	i (7.27%)	cap (6.68%)	tc (6.07%)	ca (4.73%)
15	76.6	78.5	cap (6.99%)	i (5.99%)	tc (5.76%)	ei (4.28%)	

Pour toutes les surfaces comptées, à travers les 15 lames, le % Agree entre les 3 agents est de 70.1 % et le kappa est de 73.5 %. En enlevant les données de certains lecteurs suite aux problèmes de non-relectures ou de grilles non identiques, le % Agree et le kappa augmentent à 80.8 % et 83.1 % respectivement.

B. Homogénéité inter et intragonades

La fonction *drop1* résumée dans le Tableau 4 a permis de calculer les déviations de chaque variable en les enlevant alternativement du modèle complet. La variance *scan* (identifiant de l'individu) qui possède la déviance la plus élevée explique au mieux le modèle, cela pour toutes les structures sauf *v*. Toutes les variables *position* (position de la coupe dans la gonade) ont un effet moins important que *scan* sur nos modèles, même quand P est très significatif ($P < 0.001$). De plus, les lames en position V3 et D3 semblent différer des autres.

Seule la présence d'ovogonies (**ov**) n'est pas affectée significativement par l'individu (*scan*) ou la position de la coupe (*position*), mais cela n'est pas à prendre en compte, car les déviations sont très faibles par rapport aux autres modèles. Cela est expliqué par le fait que ces cellules sont de très petite taille et peuvent être présentes sans être comptabilisées sur une lame. Le pourcentage d'**ov** estimé est donc non représentatif de la réalité.

L'ACP sur toutes les lectures (Annexes 5 & 6) confirme ces résultats et souligne le fait que les positions V3 et D3 diffèrent des autres.

C. Résultats des lectures

Le Tableau 5 montre que sur les 149 individus étudiés, en moyenne, ceux de janvier étaient de plus petite taille (**L_fish** = 24.7 cm) et masse (**W_fish** = 139.3 g). Les individus récoltés pour les mois de décembre étaient, en moyenne, les plus gros (**L_fish** = 29.4 cm ; **W_fish** = 297.1 g). Par ailleurs, les individus étaient âgés, en moyenne, de 1.8 an en novembre, de 2.8 ans en décembre et de 3.3 à 3.6 ans pour les autres mois.

Tableau 4 : Résultats de la fonction `drop1` sous R pour les modèles linéaires généralisés (GLM binomial lien logit) de chaque structure histologique retrouvée à travers les 90 lames vues. Avec `scan` = identifiant de l'individu ($n=15$), `position` = la position de la coupe histologique dans l'ovaire ($n=6$), `df` = degrés liberté, `deviance` = la déviance résiduelle du modèle, `AIC` = Critère d'information d'Akaike et `P(Chi)` = valeur-p calculée en fonction d'une distribution de χ^2

		df	deviance	AIC	P (Chi)
cap	Intercept		311.60	804.50	
	scan	14	1211.50	1676.40	<2.2e-16 ***
	position	5	349.00	831.90	4.98e-07 ***
ca	Intercept		221.02	621.95	
	scan	14	1336.66	1709.59	<2.2e-16 ***
	position	5	241.01	631.94	0.001253 **
ov	Intercept		33.09	101.68	
	scan	14	54.82	95.41	0.08418
	position	5	34.70	93.28	0.9007
op	Intercept		158.26	345.67	
	scan	14	191.88	351.30	0.002341 **
	position	5	175.94	353.36	0.003369 **
vit1	Intercept		175.80	404.10	
	scan	14	4552.20	4752.50	<2.2e-16 ***
	position	5	205.20	423.50	1.926e-05 ***
vit2	Intercept		21.02	99.08	
	scan	14	725.41	775.48	<2.2e-16 ***
	position	5	52.85	120.91	6.417e-06 ***
vit3	Intercept		0.00	58.71	
	scan	14	182.15	212.87	<2.2e-16 ***
	position	5	15.34	64.05	0.00905 **
POFl	Intercept		8.68	74.50	
	scan	14	208.86	246.68	<2.2e-16 ***
	position	5	24.87	80.69	0.006322 **
tc	Intercept		425.32	1003.30	
	scan	14	564.02	1114.00	<2.2e-16 ***
	position	5	511.75	1079.70	<2.2e-16 ***
pg	Intercept		679.60	1270.80	
	scan	14	3298.60	3861.80	<2.2e-16 ***
	position	5	947.40	1528.60	<2.2e-16 ***
oaA	Intercept		51.51	124.07	
	scan	14	154.29	198.84	1.391e-15 ***
	position	5	80.29	142.85	2.563e-05 ***
oaB	Intercept		7.11	70.24	
	scan	14	855.47	890.59	<2.2e-16 ***
	position	5	317.76	370.88	<2.2e-16 ***
L	Intercept		440.02	719.54	
	scan	14	668.44	919.95	<2.2e-16 ***
	position	5	591.92	861.44	<2.2e-16 ***
cs	Intercept		141.69	426.45	
	scan	14	290.69	547.45	<2.2e-16 ***
	position	5	156.03	430.79	0.01358 *
ei	Intercept		688.90	1322.50	
	scan	14	1211.63	1817.30	<2.2e-16 ***
	position	5	757.83	1381.50	1.708e-13 ***
v	Intercept		213.55	602.23	
	scan	14	280.82	641.50	6.001e-09 ***
	position	5	282.11	660.79	2.045e-13 ***
i	Intercept		392.09	937.93	
	scan	14	1849.11	2366.96	<2.2e-16 ***
	position	5	417.04	952.88	0.0001425 ***

a. Définition objective des phases de maturité

Les deux premières colonnes du Tableau 6 présentent les définitions des différentes phases de maturité chez les poissons femelles, issues des rapports WKASMSF et WKMATCH de l'ICES (2018a, 2014a, 2012) et des travaux de Brown-Peterson et al. (2011). La troisième colonne présente les critères que nous avons utilisés pour la catégorisation des individus dans les différentes phases de maturité en fonction de critères histologiques. La dernière colonne illustre l'aspect des coupes histologiques correspondantes. Les modèles mis en place (colonne 3) corroborent avec les définitions, tout en restant sur une base présence/absence afin d'éviter au maximum les contraintes de seuils. Les seules contraintes de seuils mises en place sont les 15 % de **oaA** et **oh** afin de pouvoir séparer les lames avec une ou deux structures vagabondes par rapport à des lames remplies de **oaA** et **oh**.

b. Évolution temporelle des structures histologiques

La distribution des 20 structures histologiques retrouvées dans les ovaires des 149 plies est résumée en Annexe 7. De ces données, la Figure 6 montrant la moyenne des différentes structures comptées (%) en fonction de chaque mois a pu être mise en place. Les ovogonies (**ov**) et ovocytes précoces (**op**) sont toujours présents, mais en très petits pourcentages (<2 %). En novembre, le type cellulaire le plus important est les ovocytes à alvéoles corticales — précoces (**cap**) (7 %). Le taux de ces **cap** diminue en décembre (4 %) avant d'augmenter de nouveau en janvier (6 %) et se stabilise autour de 5 % pour les autres mois. Les ovocytes à alvéoles corticales (**ca**) sont généralement toujours présents, entre 2 % et 3 %, pour tous les mois étudiés.

La vitellogenèse recommence en février, avec des **vit1**, **vit2** et **vit3** qui en moyenne vont passer de 1 % à 6 % en juin. Les capillaires sanguins (**cs**) augmentent de décembre à mars avant de diminuer en juin, mais resteront toujours en dessous des 2 %. Le pourcentage des ovocytes en fin de vitellogenèse (**vit4**) double entre novembre (3 %) et décembre (6 %) puis diminue en janvier (1 %). Les ovocytes en cours d'hydratation (**och**) vont succéder aux **vit4** et représentent, en moyenne, la structure cellulaire la plus importante en décembre (10 %) avant de tomber à moins de 1 % en janvier. Des ovocytes hydratés (**oh**) ont aussi été comptés en décembre, avec plus de 36 % des points de comptages pour **oh**, mais sur une seule lame. En moyenne, les structures cellulaires présentes dans les ovaires en janvier sont des **vit4**, **och** et **oh** en très faibles quantités (<2 %), avec l'apparition des follicules post-ovulatoires (**POF**) jusqu'à 3 %. Ces **POF** seront tout aussi présents en février (3 %), leur taux diminue en mars (1 %), ils disparaissent en juin.

Tableau 5 : Moyennes de la longueur en cm (L_{fish}), de la masse en g (W_{fish}) et de l'âge en année des individus en fonction des mois de novembre, décembre, janvier, février, mars et juin. Avec n le nombre plies pêchées

	L_{fish}	W_{fish}	age	n
Novembre	26.0	191.9	1.8	12
Décembre	29.4	297.1	2.8	12
Janvier	24.7	139.3	3.3	49
Février	25.8	174.3	3.2	22
Mars	28.5	237.6	3.6	42
Juin	28.9	254.9	3.5	12

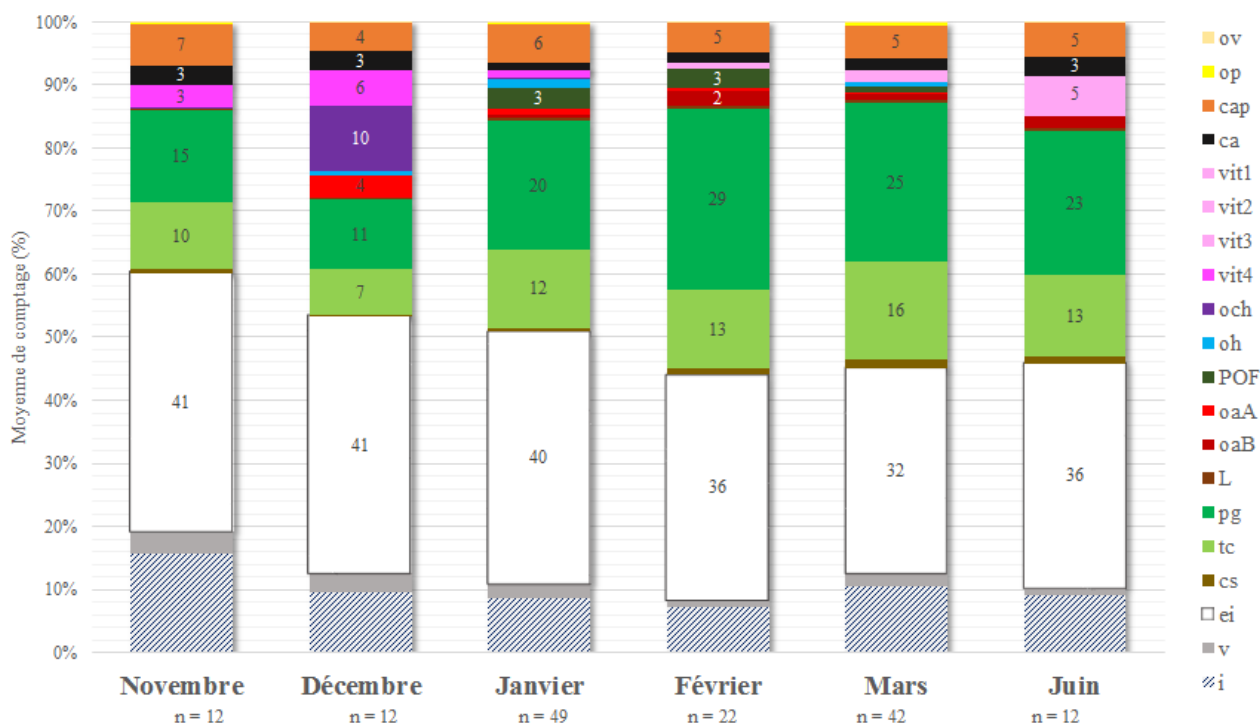
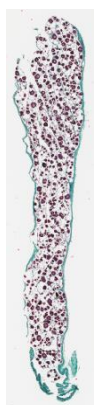
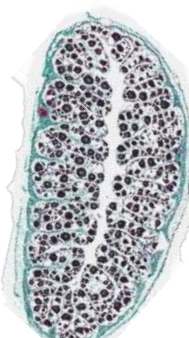
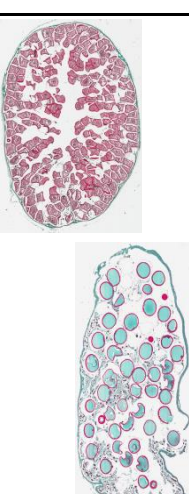
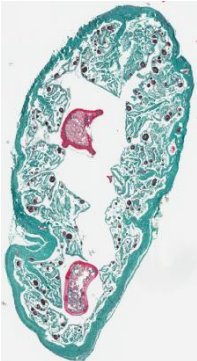

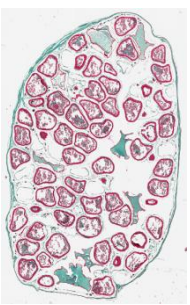


Figure 6 : Moyennes des pourcentages de comptage des différentes structures histologiques dans les ovaires de plies récoltés en novembre, décembre, janvier, février, mars et juin. Avec : ovogonie (*ov*), ovocyte précoce (*op*), ovocyte à corticale alvéolaire précoce (*cap*), ovocyte à corticale alvéolaire (*ca*), ovocyte au stade 1 de vitellogenèse (*vit1*), ovocyte au stade 2 de vitellogenèse (*vit2*), ovocyte au stade 3 de vitellogenèse (*vit3*), ovocyte au stade 4 de vitellogenèse (*vit4*), ovocyte en cours d'hydratation (*och*), ovocyte hydraté (*oh*), follicule post-ovulatoire (*POF*), tissu conjonctif (*tc*), paroi gonadique (*pg*), ovocyte en atrophie précoce (*oaA*), ovocyte en atrophie tardive (*oaB*), lyse cellulaire (*L*), capillaires sanguins (*cs*), espace intercellulaire (*ei*), vide dû à la coupe (*v*) et cellules indéterminées (*i*)

Tableau 6 : Colonnes 1 et 2 : définitions des différentes phases de maturité des ovaires chez les poissons femelles et leurs descriptions macroscopiques et histologiques (ICES, 2012, 2014a, 2018a ; Brown-Peterson et al., 2011). Colonnes 3 : modèles mis en place pour les différentes phases de maturité objective pour cette étude. Colonne 4 : coupes histologiques des ovaires de plie

États	Phases	Modèle objective	Coupe ovarienne
<p>SI (Sexuellement Immature)</p> <p>Pas de développement de la gonade. Individus incapable de produire une descendance, et sera dans l'état SI une seule fois dans sa vie.</p>	<p>A (Immature)</p> <p>Phase initiale du cycle de reproduction, les individus ne se sont jamais reproduits et n'ont pas la capacité de produire des gamètes pour le cycle de reproduction en cours. Ovaires de petite taille, difficilement discernables à l'œil nu, souvent pâles. Capillaires sanguins difficiles à distinguer.</p> <p>Pas de d'ovocytes développés, présence d'ovogonies et d'ovocytes primaires (ov, op et cap). Pas d'atrésie ou amas de muscles, paroi ovarienne fine et peu d'espace entre les ovocytes.</p>	<p>Présence soit de ov soit de op soit de cap</p> <p>Absence de ca, vit1, vit2, vit3, vit4, och, oh, POF</p>	
<p>SM (Sexuellement Mature)</p> <p>Développement de la gonade avec les cellules gonadiques dépendantes de la gonadotrophine, résultant à la production de stéroïdes sexuelles et l'activation de récepteurs hormonaux. L'individu peut entrer régulièrement ou continuellement, dans le cycle de reproduction, mais cela ne veut pas dire qu'il a, ou va, participer à la ponte de l'année en cours. Une fois dans l'état SM, l'animal l'est jusqu'à la fin de sa vie.</p>	<p>B (En développement)</p> <p>Phase allant du début de la période de reproduction jusqu'à avant la période de ponte. Les cellules sexuelles sont dépendantes de la gonadotrophine : production d'hormone stimulatrice des follicules (FSH) et d'estradiol. Augmentation en taille des ovocytes, vaisseaux sanguins plus faciles à distinguer.</p> <p>Début avec la présence d'ovocytes à alvéoles corticales (ca). Se termine quand les ovocytes sont complètement développés.</p> <p>Présence de vitellogénine dans le plasma sanguin ou granules de vitellus dans les ovocytes. Présence de ca, vit1 à vit3. Pas d'évidence de POF ou vit4. Possibilité de présence d'un peu d'atrésie oaA.</p>	<p>Présence soit de ca soit de vit1 soit de vit2 soit de vit3 soit de vit4</p> <p>Absence de POF, och et de oh</p> <p>Un comptage de oaA inférieur ou égale à 15%</p>	
	<p>C (Frai)</p> <p>Maturation finale des ovocytes, et ponte des gamètes (période très courte).</p> <p>Ovaires plus larges, vaisseaux sanguins proéminent, ovocytes hydratés peuvent être vu à l'œil nu. Passage de la production de FSH à l'hormone lutéinique (LH), avec des stéroïdes inducteurs de la maturation (MIS). Les ovocytes vont succinctement entrer dans les stades vit4, och puis oh. Présence éventuelle de POFs. Possibilité d'atrésie sur les cellules en vitellogenèse ou hydratées.</p>	<p>Début de la phase : Présence soit de och soit de oh</p> <p>Absence de POF et de oaB</p> <p>Un comptage de oaA inférieur ou égale à 15%</p> <p>Fin de la phase : Absence de oaB</p> <p>Un comptage de oh supérieur à 15%</p>	

<i>En général, la phase D n'est pas divisée en deux</i>		Classification ascendante sur lames non classées A, B, C, E	
Da (Régression)	Db (Régénération)		
<p>Fin de la période de ponte, les ovaires entrent dans une phase de régression (Da), suivit par une phase de régénération (Db). Phase qui peut être très longue chez la plupart des espèces. Activité métabolique et physiologiques importantes dans l'ovaire. Ovaire flaccide et vaisseaux sanguins prééminent. Ovaires reviennent à un état antérieur avec la réabsorption du matériel présent (oaA, oaB). Évidences de la ponte et présence de POF, mais pas de production d'œufs. Un peu de ca, vit1 et vit2 présents.</p>	<p>L'ovaire se réorganise et se prépare pour le prochain cycle. Le temps de régénération est influencé par les facteurs biologiques ou environnementaux et se termine avec le début de la nouvelle période de reproduction. Entre deux périodes de ponte les ovaires en Db et A peuvent être très semblables à l'œil nu. Ovaires de petite taille, vaisseaux sanguins réduits mais présents. Activités métaboliques et physiologiques importantes pour les ovocytes primaires (ov, op, cap). Possibilité de présence de tissu musculaire, vaisseaux sanguins élargies, paroi ovarienne épaisse et/ou oaA, oaB ou de vieux POF en dégénérescence.</p>		
<p>E (Omission de Frai)</p> <p>Ces individus ne participeront pas à la ponte pour l'année en cours car leur potentiel de reproduction est compromis. Inclus les individus qui développent des ovocytes pour la première fois et qui annulent le développement (ne contribuent donc pas à la production d'œufs), ainsi que les espèces qui viennent de pondre et qui vont donc omettre la période de ponte en cours (ovaires n'ont pas été régénérés à temps pour la prochaine période de ponte, pas de signe de maturation.). Au moins 50% des cellules (normalement en vitellogenèse) sont en train d'être réabsorbées (oaA).</p>		<p>Présence soit de och soit de oh Un comptage de oaA supérieur à 15%</p>	
<p>F (Anormal)</p> <p>Ces individus ne participeront pas à la ponte pour l'année en cours. Atteste d'un problème dans le développement normal de la gonade. Les ovaires présentent de la nécrose, sclérose ou l'individu est intersexué. Les gonades sont en majorité en mauvaise santé. Intersexué : variations anormales des caractéristiques sexuelles qui ne permettent pas d'identifier un individu comme «femelle» ou «mâle». Cette phase n'est pas définie par la présence massive d'atrésie. Ce n'est pas un individus avec une phase de maturité indéterminée ou difficile à classifier.</p>		N/A	

Finalement, les ovocytes en atresie alpha (**oaA**), peu présents en novembre (<1 %), sont à leur maximum (4 %) en décembre puis leur taux diminue de janvier (1 %) à mars (<1 %). En contrepartie, dès janvier, la moyenne des ovocytes en atresie beta (**oaB**) augmente pour atteindre un pic en février (2 %) et diminue de nouveau en mars. Il est intéressant à noter que les pourcentages de lyse (**L**) et d'**oaB** augmentent de nouveau en juin (1 % et 2 % respectivement). La lyse est observée à tous les mois, en faible quantité.

Les pourcentages des structures **pg** et **tc** sont au plus bas en décembre, à 11 % et 7 % respectivement. La paroi gonadique (**pg**) atteint son pourcentage maximal en février (29 %) avant de diminuer jusqu'en juin (23 %). Le tissu conjonctif (**tc**) suit la même tendance avec une moyenne en croissance jusqu'à mars (16 %) et diminue en juin (13 %).

Dans le cas des espaces intercellulaires (**ei**), en moyenne, ils vont diminuer de novembre (41 %) à mars (32 %) pour augmenter légèrement en juin (36 %). Finalement, pour les cellules indéterminées (**i**), et les vides dus à la coupe (**v**), ils vont diminuer pour les individus de novembre à février avant d'augmenter de nouveau en mars et juin.

c. Description histologique des phases de maturité objective

La Figure 7 représente les *boxplots*, en pourcentages de comptages en fonction des 20 structures histologiques, pour les quatre groupes modélisés : A (immatures), B (développement), C (Frai), E (omission de frai) et *unknown* (n=75) les lames non classées après mise en place des modèles de la colonne 3 du Tableau 6. En comparant les individus en A (n=8) par rapport aux autres phases de maturité, il est important de noter une répartition d'ovocytes à alvéoles corticales précoces (**cap**) plus élevée (Q1=9% ; M=13% ; Q3=16%), une paroi gonadique (**pg**) plus petite (Q1=9% ; M=11% ; Q3=12%) et un espace intercellulaire (**ei**) avec les pourcentages les plus élevés (Q1=41% ; M=47% ; Q3=49%).

Pour le groupe B (n=55), le pourcentage d'ovocytes à alvéoles corticales (**ca**) est le plus important par rapport aux autres groupes (Q1=2% ; M=3% ; Q3=5%), le pourcentage d'ovocytes en début de vitellogenèse (**vit1**) est variable (2 % à 15 %) et très peu de **vit2**, **vit3** et **oaA** sont observés. Pour la **pg**, les pourcentages de comptage sont très variables (min=4% ; Q1=11% ; M=14% ; Q3=21% ; max=44%).

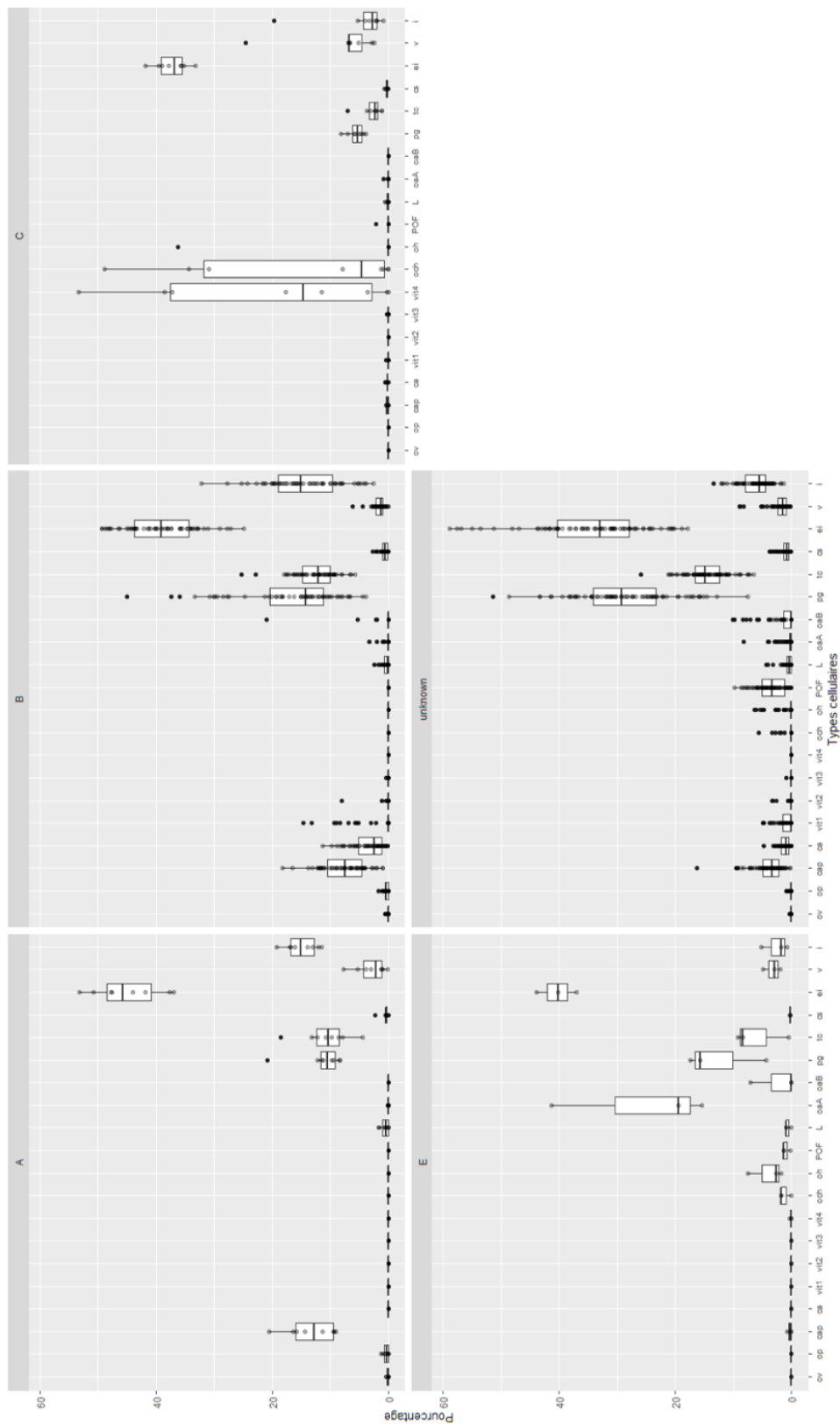


Figure 7 : Boîtes à moustaches des pourcentages de comptage des 20 structures histologiques retrouvées dans les ovaires de la plie pour les 4 groupes de maturité objective modélisés. Avec A = phase immature, B = phase développement, C = phase frais, E = phase omission de frais, unknown, = les lames non classées, **ca** = ovocyte à vésicules corticales alvéolaires, **cap** = ovocyte à vésicules corticales alvéolaires précoces, **cs** = capillaires sanguins, **ei** = espace intercellulaire, **i** = structures indéterminées, **L** = lyse, **oaA** = ovocyte atrétique alpha, **oaB** = ovocyte atrétique beta, **och** = ovocyte en cours d'hydratation, **oh** = ovocyte hydraté, **op** = ovocyte précoce, **ov** = ovogonie, **pg** = paroi gonadique, **POF** = follicule post-ovulatoire, **tc** = tissu conjonctif, **v** = vide dû à la coupe, **vit1** = ovocyte en début de vitellogenèse, **vit2** = ovocyte en vitellogenèse avec la migration du noyau, **vit3** = ovocyte ne vitellogenèse avec le noyau qui a migré et **vit4** = ovocyte en fin de vitellogenèse

Les individus du groupe C (n=8) ont des ovaires contenant essentiellement des ovocytes **vit4** (Q1=4% ; M=15% ; Q3=38%), en cours d'hydratation (**och**) (Q1=1% ; M=5% ; Q3=32%) et hydratés (**oh**) (36 %), une **pg** fine (Q1=4% ; M=5% ; Q3=6%), très peu de **tc** (Q1=1.5% ; M=2% ; Q3=3%) et un **ei** le plus faible par rapport aux trois autres phases (Q1=35% ; M=37% ; Q3=39%). Autre que **v** et **i**, toutes les autres structures sont en dessous de 2 %.

Finalement, pour les individus en phase E (n=3), la présence de certaines structures telles que des **cap**, **och** et **oh** est à noter (<10 %). Des éléments de lyse sont présents dans toutes les phases (≤ 5 %).

Les lames non classées sont, par élimination, les individus en phase de maturité D (Figure 8), cette phase présentant une ambiguïté inhérente au statut transitionnel auquel elle correspond. Afin de distinguer les sous-phases Da et Db, la CAH a été effectuée, donnant ainsi 4 groupements. Les ovocytes primaires (**ov**, **op**, **cap**), les stades de vitellogénèse (**vit1** à **vit4**), des **och** et **oh**, les ovocytes en atresie alpha et beta (**oaA** et **oaB**), la lyse cellulaire et des **POF** sont retrouvés partout à des taux inférieurs à 10 %. Les groupes mis en place par la CAH sont différenciés essentiellement par leurs pourcentages en **pg** et **ei**. Le groupe 2 a les pourcentages de **pg** les plus bas (Q1=17% ; M=18% ; Q3=20%) et les pourcentages de **ei** les plus élevés (Q1=53% ; M=56% ; Q3=58%). À l'opposé, le groupe 4 a les pourcentages de **pg** les plus élevés (Q1=37% ; M=38% ; Q3=42%) et ceux de **ei** les plus bas (Q1=21% ; M=26% ; Q3=28%).

La matrice de confusion (Tableau 7) mise en place après avoir classé les individus dans les différentes phases de maturité objective permet de montrer les erreurs d'une estimation visuelle. Sur les 37 individus estimés comme des immatures (1), l'histologie objective en classe seulement 5 dans A, 28 en B et 4 en D. Pour les 42 individus estimés en développement (2B et 2A), 17 restent en B, mais 2 se retrouvent en A, 6 en C, 23 en D et 1 en E. Deux des trois individus estimés en frai (3A et 3B) sont correctement évalués, alors qu'un serait en phase E. Finalement, sur les 60 individus estimés être en régression/régénération (4, 4A et 4B), 48 étaient correctement classés, 1 a été reclassé en A, 10 en B et 1 en E.

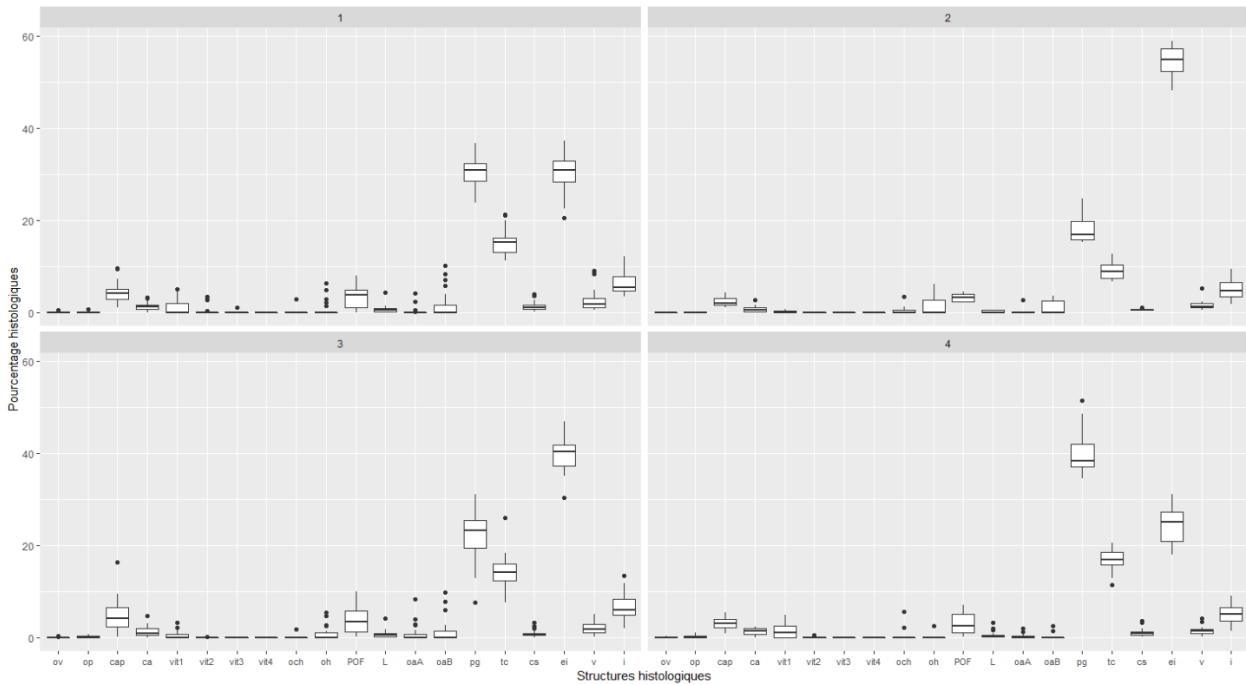


Figure 8 : Boîtes à moustaches des pourcentages de comptage des 20 structures histologiques retrouvées dans les ovaires de la plie, pour la phase de maturité objective D. Les 4 groupes sont ceux mis en place par la CAH, avec **ca** = ovocyte à vésicules corticales alvéolaires, **cap** = ovocyte à vésicules corticales alvéolaires précoces, **cs** = capillaires sanguins, **ei** = espace intercellulaire, **i** = structures indéterminées, **L** = lyse, **oaA** = ovocyte atrétique alpha, **oaB** = ovocyte atrétique beta, **och** = ovocyte en cours d'hydratation, **oh** = ovocyte hydraté, **op** = ovocyte précoce, **ov** = ovogonie, **pg** = paroi gonadique, **POF** = follicule post-ovulatoire, **tc** = tissu conjonctif, **v** = vide dû à la coupe, **vit1** = ovocyte en début de vitellogenèse, **vit2** = ovocyte en vitellogenèse avec la migration du noyau, **vit3** = ovocyte ne vitellogenèse avec le noyau qui a migré et **vit4** = ovocyte en fin de vitellogenèse

Tableau 7 : Matrice de confusion entre les phases de maturité estimées visuellement (1, 2A, 2B, 3A, 3B, 4, 4A et 4B) et les phases de maturité objective (A, B, C, D et E)

	1	2A	2B	3A	3B	4	4A	4B
A	5	2	0	0	0	1	0	0
B	28	17	0	0	0	9	0	1
C	0	0	6	1	1	0	0	0
D	4	22	1	0	0	31	10	7
E	0	1	0	1	0	0	0	1

d. Paramètres macroscopiques

L'arbre de classification des phases de maturité objective en fonction des différentes structures macroscopiques (Figure 9) classe les phases avec une erreur relative de 13 % et une erreur de validation croisée de 45 %. Il prend pour racine le rapport gonado-somatique (**rapgonw** < 0.0035) et permet d'identifier 100 % des individus A, 75 % des individus B et 1 individu D. Cette branche sépare les individus A de la majorité des individus B en utilisant la masse du poisson (**W_fish** ≥ 135 g). Le deuxième nœud sépare 83 % des individus C et 100 % des individus E des autres phases grâce au rapport gonado-somatique (**rapgonw** > 0.014). À partir de cette branche, 100 % des individus E sont identifiés par la longueur du poisson (**L_fish** ≥ 26 cm). La branche la plus ramifiée identifie les individus B restant et 100 % des individus D, avec des ramifications séparées par des critères tels que la couleur moyenne de l'ovaire (**ID_Col**), le rapport entre la taille de l'ovaire et la taille du poisson (**rap**), la masse de la gonade en grammes (**W_gond**) et la couleur médiane de l'ovaire (**Mod**).

e. Taille à la maturité sexuelle de 50 % de la population (L50)

La taille pour laquelle 50 % de la population est sexuellement mature est estimée à 19.6 cm ($R^2 = 0.27$) d'après l'analyse de maturité objective, et 20 cm ($R^2 = 0.08$) d'après l'analyse de maturité visuelle. La Figure 10 montre la longueur (cm) des individus en fonction de leur masse (g). Les individus en phase A restent en dessous de 25 cm pour 150 g, mais des individus en phases B, C, D et E sont aussi retrouvés à ces tailles.

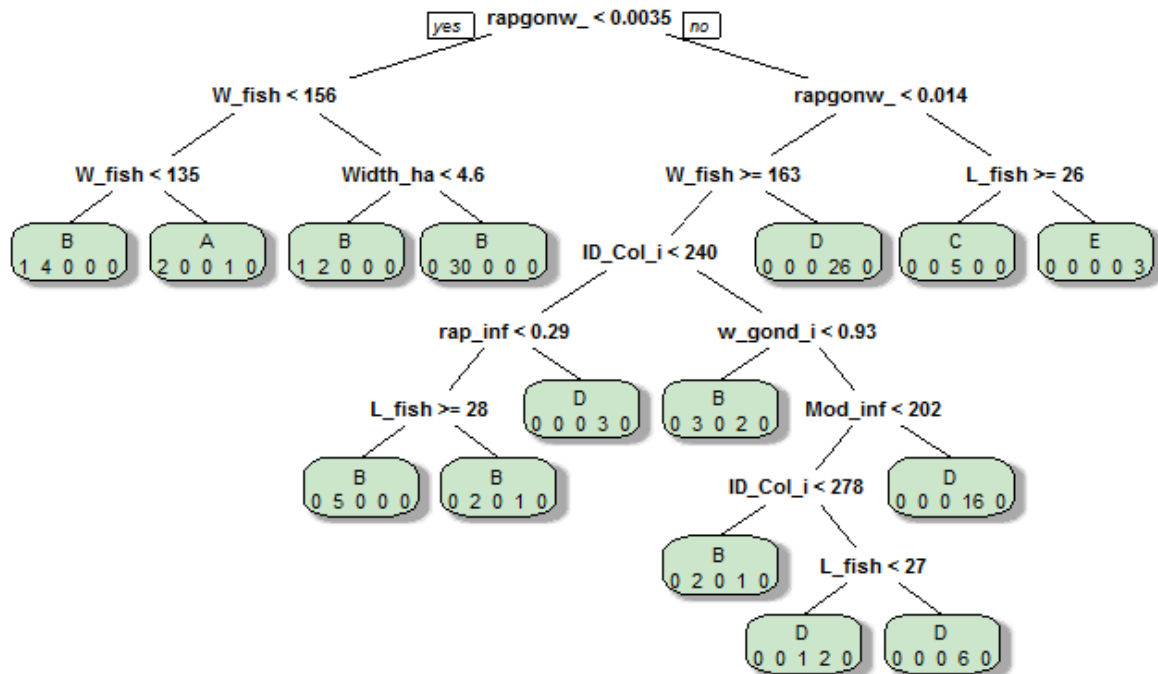


Figure 9 : Arbre de classification des phases de maturité objective en fonction des différents paramètres macroscopiques. Arbre avec un minimum de 8 individus par nœuds, sans élagage. Avec les individus en phase Immature A (n=4), en phase Développement B (n=48), en phase de Frai C (n=6), en Régression/Régénération D (n=57), en Omission de frai (n=3), **rapgonw** = le rapport gonado-somatique, **W_fish** = le poids du poisson (g), **Width_ha** = la largeur à mi-longueur de l'ovaire (mm), **L_fish** = la longueur du poisson (cm), **ID_Col** = la couleur moyenne de l'ovaire, **rap** = le rapport entre la taille de l'ovaire et la taille du poisson et **Mod** = la couleur médiane de l'ovaire

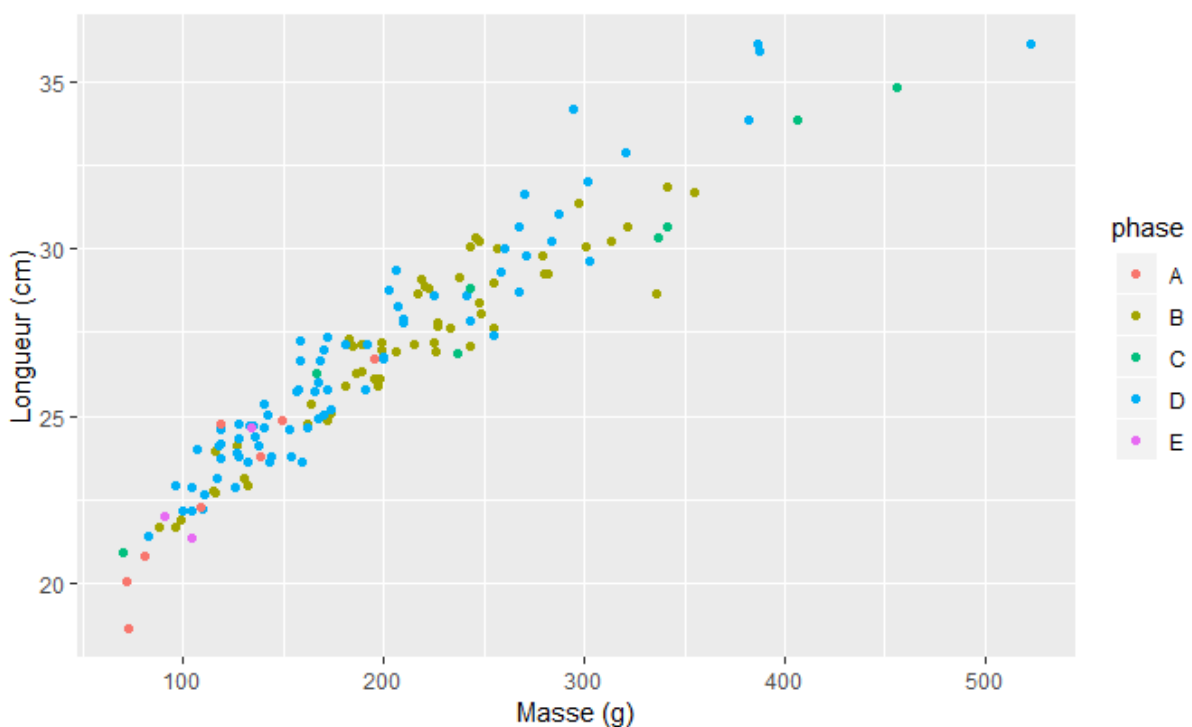


Figure 10 : Taille des 149 individus en cm en fonction de leur masse en g. Avec phase = les phases de maturité objective

IV. Discussion

A. Description de l'ovogenèse chez *Pleuronectes platessa*

À notre connaissance, seule la publication de Barr (1963) décrit l'ovogenèse de *Pleuronectes platessa* en détail, et ce pour des individus en bonne santé.

Le premier stade des follicules ovariens est l'ovogonie (Figure 11). Ces cellules peuvent être retrouvées seules ou dans des niches germinatives au niveau de l'épithélium lamellaire. Elles sont présentes toute l'année dans l'ovaire, mais sont en plus grand nombre en fin de printemps début de l'été où il est possible d'observer la division mitotique. Les ovogonies sont identifiables par un noyau de grande taille par rapport à la cellule et sont toujours associées à une ou plusieurs cellules folliculaires. Tous ces critères ont été observés lors de cette étude, avec des ovogonies d'une taille moyenne de 14.30 μm ($\pm 4.57 \mu\text{m}$) au lieu de 4-5 μm d'après Barr (1963). De par leurs petites tailles, ces cellules n'ont pas toujours été détectées par la stéréologie malgré leurs présences sur la coupe histologique.

Barr (1963) décrit alors les ovocytes primaires (Figure 12) comme ayant un diamètre légèrement plus important qu'une ovogonie, avec un noyau plus large caractérisé par des chromosomes en prophase méiotique (les chromosomes deviennent des filaments — « *lamp brush* ») et sont diplotènes dans un nucléoplasme granuleux. Le cytoplasme augmente aussi en volume et devient basophile. Dans le lexique descriptif mis en place lors de ce travail (Sauger and Kellner, 2019), ce stade regroupe nos stades ovocytes précoces (**op**) et ovocytes à alvéoles corticales – précoces (**cap**). Ces stades ont été séparés afin de suivre aux mieux les définitions de l'ICES (2018a, 2014a, 2012) et Brown-Peterson et al. (2011).

Pour la vitellogenèse, Barr (1963) définit trois stades. Le premier stade de développement de vitellogenèse est caractérisé, dans un premier temps, par un anneau de vacuoles dans le cytoplasme juste à l'intérieure de la membrane cellulaire et dans un deuxième temps par l'apparition de la zona pellucida entre le cytoplasme et la granulosa. Dans le lexique de Sauger and Kellner (2019), ce stade est nommé ovocyte cortical alvéolaire (**oca**) (Figure 13), en correspondance avec les définitions de l'ICES (2018a, 2014a, 2012) et Brown-Peterson et al. (2011).

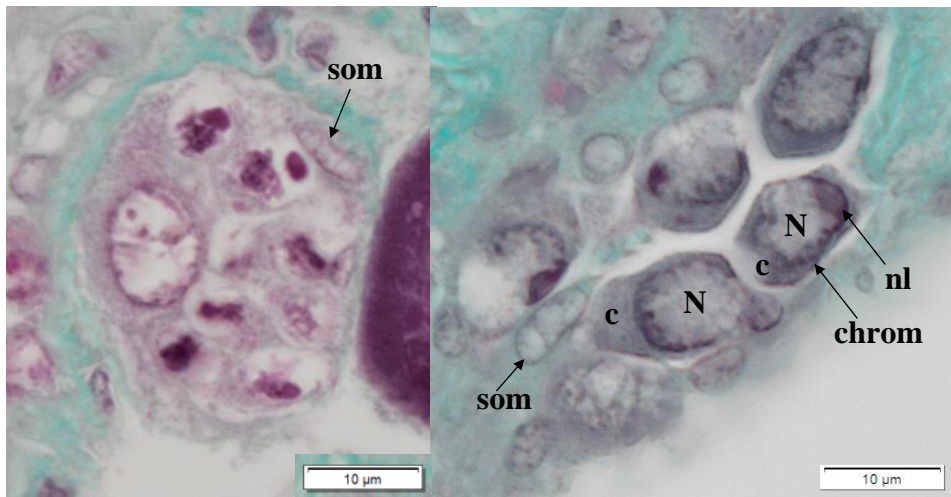


Figure 11 : Ovogonies (ov). Gauche : des cellules en division mitotique dans une niche germinale associées à des cellules somatiques (som). Droite : Ovogonies (ov) avec un noyau (N) décondensé contenant un seul nucléole (nl) et des amas de chromatine (chrom). Le cytoplasme (c) est peu coloré. Présence de cellules somatiques (som)

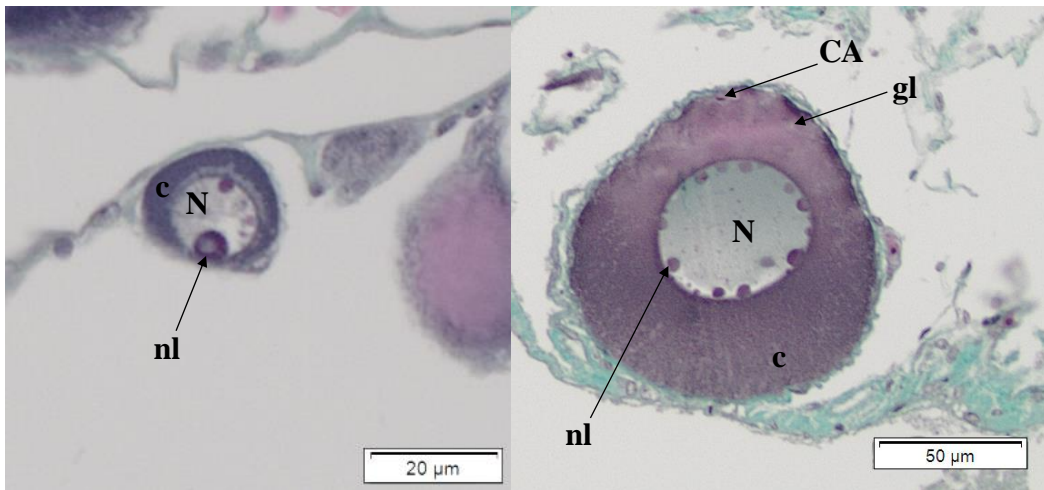


Figure 12 : Ovocyte précoce (op) et ovocyte à alvéoles corticales – précoce (cap). Gauche : Ovocyte précoce (op) avec un noyau (N) sphérique et lisse contenant deux nucléoles (nl). Le cytoplasme (c) est plus foncé que pour une ovogonie (ov). Droite : Un cap, avec le noyau (N) sphérique et lisse contenant de nombreux nucléoles (nl). Quelques gouttelettes lipidiques (gl) dans le cytoplasme (c) et des alvéoles corticales (CA)

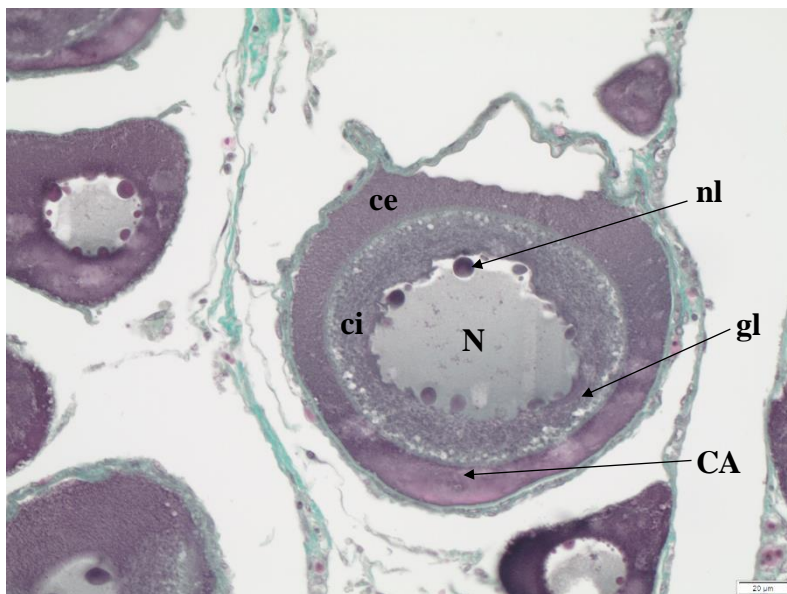


Figure 13 : Ovocyte avec alvéoles corticales (ca). Avec le noyau (N) festonné contenant de nombreux nucléoles (nl). Accumulation de gouttelettes lipidiques (gl) entre la zone des cytoplasmes interne (ci) et externe (ce) et des alvéoles corticales (CA)

Il est à noter que les alvéoles corticales, structures permettant de différencier les individus entre l'état sexuellement immature (**SI**) et l'état sexuellement mature (**SM**) (Brown-Peterson et al. 2011) ressemblent beaucoup aux gouttelettes lipidiques déjà présentes dans le cytoplasme et sont donc difficiles à identifier chez la plie. Le critère de détermination principal est donc basé sur la présence d'un noyau festonné (Sauger et al., 2019). Une évolution du protocole d'élaboration des lames prévoit l'utilisation d'un marqueur à base de bleu alcian afin de pouvoir identifier plus aisément cette structure.

Le second stade de vitellogenèse décrit par Barr (1963) est caractérisé par des ovocytes ayant des gouttelettes de vitellus associées à l'anneau de vacuoles du stade précédent. À la fin de ce stade, les gouttelettes de vitellus sont présentes à travers tout le cytoplasme, sauf une zone étroite en périphérie. Ces critères ont aussi été observés pour cette étude (Figure 14), mais le stade **vit1** (présence de l'anneau de gouttelettes de vitellus) est séparé des stades **vit2** et **vit3** pour marquer la migration du noyau. La détermination du stade **vit4** permet de prendre en compte la croissance de la zona pellucida, toujours dans un souci de suivre les définitions de l'ICES (2018a, 2014a, 2012) et de Brown-Peterson et al. (2011).

Dans deuxième stade de vitellogenèse proposé par Barr (1963), l'ovocyte est enveloppé par deux couches unicellulaires de granulosa pavimenteuse et de thèque, avec absence de division de cette granulosa en granulosa interne et externe chez cette espèce. Ce stade correspond aux ovocytes en cours d'hydratation (**och**) défini par cette étude (Figure 15). Pour le dernier stade défini par Barr (1963), soit le stade de maturation, le vitellus est une masse homogène qui remplit tout l'ovocyte, avec une zona pellucida qui devient alors plus fine suite à l'augmentation rapide du diamètre de la cellule (1400 μm). La rupture des membranes (thèque et granulosa) permet la libération de l'ovocyte dans le lumen ovarien. Des critères similaires ont été observés pour le stade d'ovocytes hydratés (**oh**), avec un diamètre plus petit (958.66 $\mu\text{m} \pm 75.40 \mu\text{m}$) et une zona pellucida qui passe de 53.81 μm ($\pm 6.23 \mu\text{m}$) en **vit4** à 40.38 μm ($\pm 6.36 \mu\text{m}$) en **oh** (Figure 16). Ces mesures n'ont pu être effectuées que sur 20 ovocytes, car ce stade a été observé sur une seule des coupes histologiques élaborées pendant cette étude.

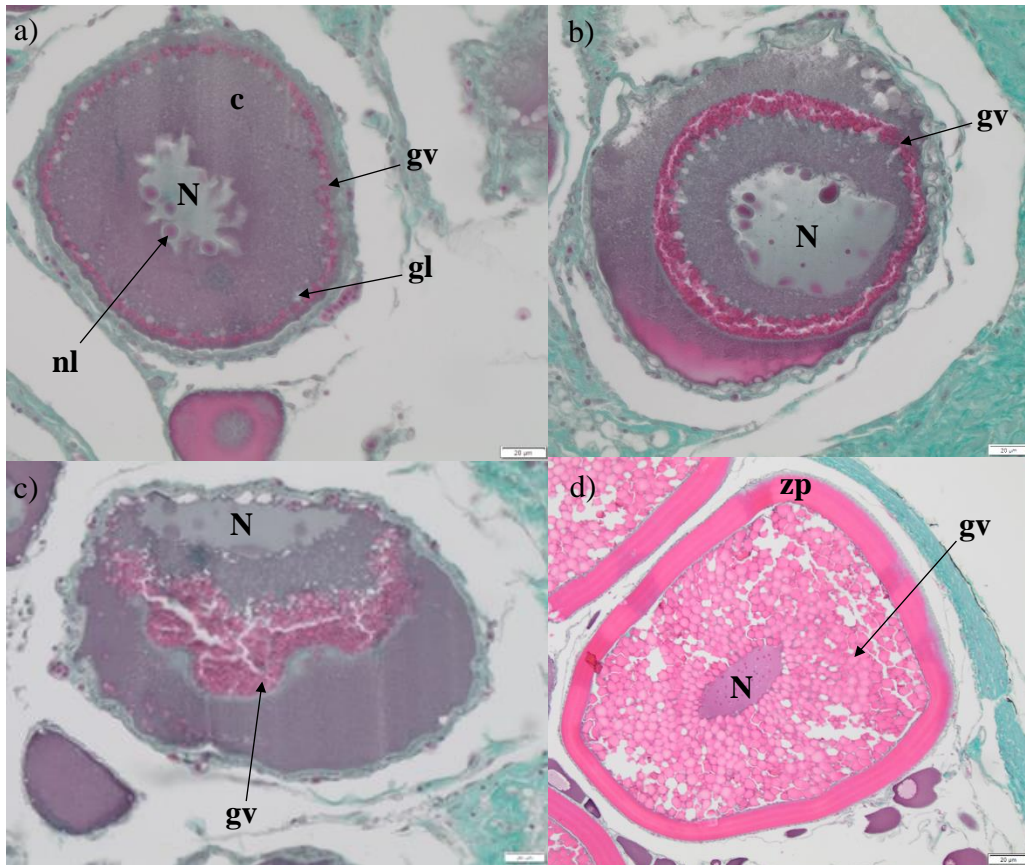


Figure 14 : Ovocyte en vitellogénèse (**vit1** à **vit4**). a) Ovocyte au stade **vit1**, avec le noyau (N) festonné, de nombreux nucléoles (nl), une couronne de gouttelettes de vitellus (gv) en périphérie du cytoplasme (c) et des gouttelettes lipidiques (gl). b) Ovocyte au stade **vit2**, avec le noyau (N) qui a commencé sa migration vers la couronne de gouttelettes de vitellus (gv). c) Ovocyte au stade **vit3**, avec le noyau (N) qui a fini sa migration en dehors de la masse de gouttelettes de vitellus (gv) et est polarisé. d) Ovocyte au stade **vit4**, avec une zona pellucida (zp) épaisse, un noyau (N) et de nombreuses gouttelettes de vitellus (gv)

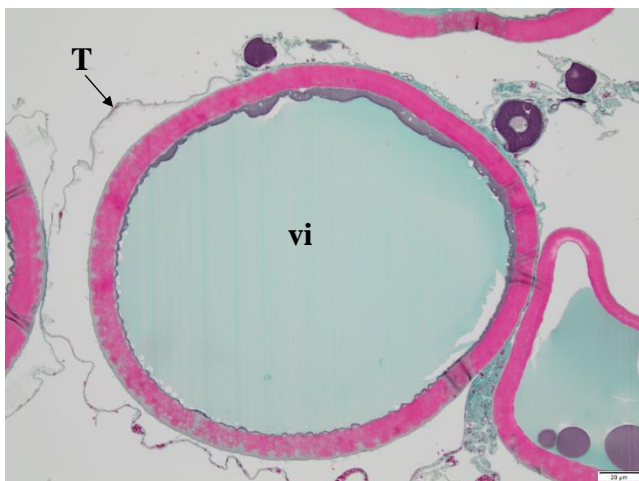


Figure 16 : Ovocyte hydraté (**oh**), non émis, avec sa thèque (T) avec son vitellus homogène (vi)

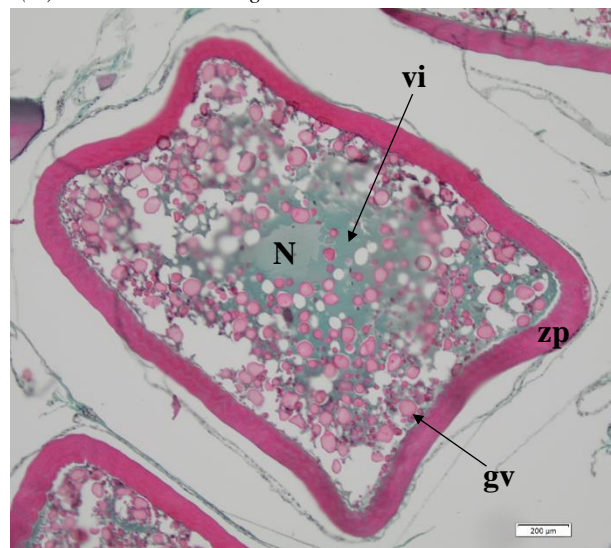


Figure 15 : Ovocyte en cours d'hydratation (**och**) avec une épaisse zona pellucida (zp), un noyau (N), des gouttelettes de vitellus (gv), un début de zone de vitellus homogène (vi)

Le lexique histologique complète et met à jour les connaissances sur l'ovogenèse de la plie. Ce document est publié sur ARCHIMER, le site d'archive institutionnel de l'IFREMER, et devra être mis à jour régulièrement avec la réalisation de nouvelles coupes histologiques pour cette espèce. En effet, à la fin de la période de lecture des lames histologiques, un stade intermédiaire entre **vit3** et **vit4** a été observé (Figure 17). Ce stade intermédiaire est important, car il marque la transition entre une cellule avec une zona pellucida fine et l'épaisse zona pellucida striée retrouvée au stade **vit4**. Ce stade intermédiaire se trouvant dans très peu de lames (n=3), les follicules ont alors été classés en **vit3**. Le faible nombre de lames montrant cette structure pourrait être dû au fait que cette étape dans la vitellogenèse est très rapide et donc difficile à obtenir sur coupe histologique (Gerritsen and McGrath, 2006). Cet exemple souligne la nécessité de (1) maintenir à jour un corpus commun de connaissance sur la maturité de la plie et (2) d'assurer sa diffusion au fil du temps. Les lames histologiques et leurs lectures seront donc publiées en même temps que la mise à jour du lexique sur les plates-formes appropriées dans le courant du mois de juillet 2019 (e.g. ARCHIMER et Zenodo).

B. Calibration et qualité des lectures

Un des enjeux majeurs de cette étude fut aussi la mise en place de la calibration interagents. Peu d'études en histologie font état de cet effort d'intercalibration quand plusieurs agents effectuent des lectures dans un même domaine. Grâce à la mise en place d'un protocole de lecture des lames histologiques, et à deux exercices de relecture entre 3 agents, les pourcentages d'accords de lectures des structures ont dépassé 80 %.

Pour quantifier les différences de lecture, il a été fait usage du pourcentage d'accord et de l'indice kappa de Fleiss, des métriques issues de la psychologie quantitative (Conger, 1980 ; Hallgren, 2012 ; McHugh, 2012). Ces indices ont montré une sensibilité élevée aux structures rares (les structures identifiées quelques fois par un lecteur et pas du tout par un autre lecteur). Ces structures rares, ou de très petites tailles (**ov**, **op**), sont associées à une probabilité de détection faible, ce qui peut mener à l'absence de ces structures à l'issue du comptage alors que leurs présences sur la lame histologique sont avérées. Ceci souligne l'importance de définir une grille commune de lecture et atteste du fait que si la taille de la grille fixée à 500 points lus est suffisante pour la majorité des structures, il conviendrait d'augmenter ce nombre pour estimer plus précisément la présence de structures rares.

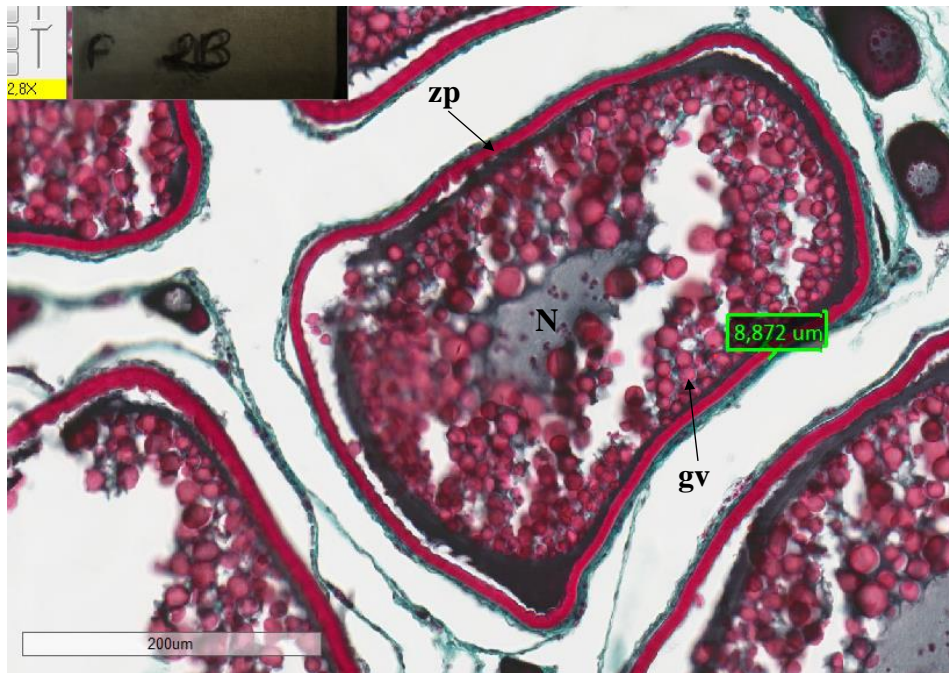


Figure 17 : Ovocyte entre le stade vit3 et vit4, avec un noyau (N), des gouttelettes de vitellus (gv) et une zona pellucida (zp) en train de croître qui mesure 8,872 μm

Lors des lectures d'intercalibration, les éléments qui montraient le plus de désaccord entre les lecteurs étaient les structures générales telles que les espaces intercellulaires (**ei**), le tissu conjonctif (**tc**) et les structures indéterminées (**i**). Une recalibration du protocole de lecture a permis de diminuer les désaccords pour **ei** et **tc**. Il est à noter que l'identification des structures indéterminées restait très variable en fonction de l'agent et de son expérience en lecture: un lecteur inexpérimenté a logiquement tendance à identifier plus de structures indéterminées qu'un lecteur expérimenté. À l'opposé de cette tendance, ce même lecteur inexpérimenté sera moins sujet à un éventuel biais cognitif dans la détection de certaines structures: suivant l'état d'une lame supposée affectée à une phase donnée, le lecteur expérimenté pourra classer certaines structures intermédiaires dans la classe correspondante au stade attendu par le lecteur. De plus, l'application stricte du protocole permet de classer 100 % des structures cellulaires sans ambiguïté, et augmente donc la qualité des lectures histologiques. En contrepartie, cela diminue le pourcentage de comptage de certaines structures abîmées, décolorées ou floues (donc interprétée plus ou moins objectivement par le lecteur) en faveur de plus de structures indéterminées.

Finalement, le GLM pour l'analyse inter et intragonades a permis de mettre en évidence un développement cellulaire homogène dans toute la gonade, ainsi qu'une différence des coupes V3 et D3 par rapport aux autres positions de lames. Les lames V3 et D3 sont les extrémités postérieures de l'ovaire ventral et dorsal respectivement. Cette différence peut être expliquée par le fait que ces échantillons étaient de plus petite taille (morphologie de l'ovaire) et se retrouvaient le plus souvent abîmés lors des préparations (coupe dévaginée, paroi gonadique manquante... etc.). Afin de limiter la présence de ces artefacts de préparation, la coupe centrale (codée 2) a été choisie. Le choix de l'ovaire ventral était aléatoire étant donné qu'aucune différence entre l'ovaire dorsal et l'ovaire ventral ne ressortait. Il est à noter qu'en général, dans la littérature, l'homogénéité de la gonade est estimée en fonction de la taille des follicules ovariens et de leur densité aux positions antérieures, postérieures et médianes des gonades (Kennedy et al., 2007). Cette méthode ne prend donc pas en compte les stades d'ovocytes présents, mais des gammes de tailles et densités de follicules, ce qui mène à une perte d'information.

C. Cycle reproductif chez *Pleuronectes platessa*

Afin de répondre à la demande d'harmonisation des pratiques de l'ICES, suite à la problématique de disparité des résultats (30 % à 50 % de désaccord) pour la détermination des phases de maturités (ICES, 2018a, 2013 ; IFREMER, 2018b), les modèles mis en place reflètent les descriptions histologiques du WKMATCH (ICES, 2018a) et de Brown-Peterson et al. (2011) du

Tableau 6. Cela permet une description du cycle de reproduction de la plie en fonction de l'histologie, selon les critères de l'ICES.

Les individus dans l'état sexuellement mature (**SM**) se développent en même temps, avec une progression nette dans leur cycle de reproduction en fonction des mois ([Bromley, 2000](#) ; [Rijnsdorp, 1991, 1989](#)). En effet, la majorité des individus en novembre (9/12) sont en phase Développement (B), les individus de décembre sont en phase B (7/12) et en phase de Frai (C) (4/12), les individus de janvier et février sont majoritairement en Régression/Régénération (D) (30/49 et 20/22 respectivement), ceux de mars sont essentiellement en phase B (16/42) ou en phase C (25/42) et ceux de juin sont en phase B (12/12). Ces résultats corroborent avec ceux de la littérature : début de vitellogenèse vers octobre, la fin de la vitellogenèse en décembre, la ponte en janvier et une majorité de femelles ayant pondu en mars qui sont en régression/régénération de mai à juillet ([Bromley, 2000](#)).

En phase A (Figure 18), soit les individus immatures qui ne participeront pas au cycle de reproduction en cours, ont leurs critères histologiques qui suivent ceux du modèle mis en place dans le Tableau 6. Les critères les plus importants étant la paroi gonadique (**pg**) fine, critère qui n'était pas pris en compte dans le modèle, mais qui ressortait dans les résultats, la présence uniquement d'ovogonies (**ov**), d'ovocytes précoces (**op**) et d'ovocytes à alvéoles corticales – précoces (**cap**) et absence de follicules post-ovulatoires (**POF**). L'espace intercellulaire (**ei**) devrait être le moins élevé, mais cela peut être dû à un étirement des gonades lors des préparations histologiques.

En phase B (Figure 19), soit les individus avec des gonades en développement, les critères histologiques suivent ceux du modèle mis en place dans le Tableau 6. Ces individus auront des ovocytes à alvéoles corticales (**ca**) ou en début de vitellogenèse (stades **vit1** à **vit3**), pas de **POF** et une **pg** de taille variable.

En phase C (Figure 20), soit les individus en frai, les critères histologiques suivent ceux du modèle mis en place dans le Tableau 6. L'ovaire est étiré, la **pg** devient alors très fine, présence d'ovocytes en fin de vitellogenèse (**vit4**) et en cours d'hydratation (**och**), ou encore présence d'ovocytes hydratés (**oh**) qui vont prendre la quasi-totalité du volume dans l'ovaire.

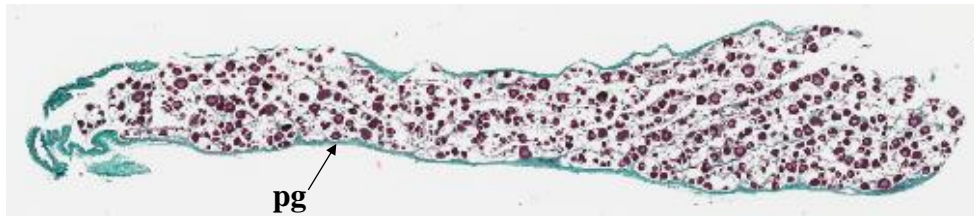


Figure 18 : Coupe histologique d'un ovaire de plie en phase A (immature). Avec une paroi gonadique (**pg**) fine

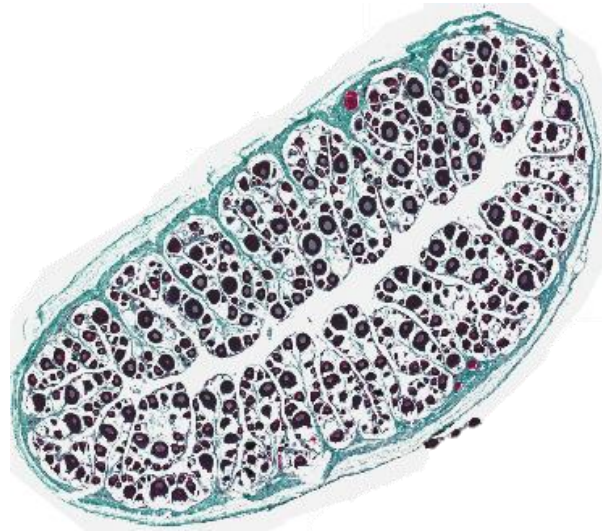


Figure 19 : Coupe histologique d'un ovaire de plie en phase B (développement)

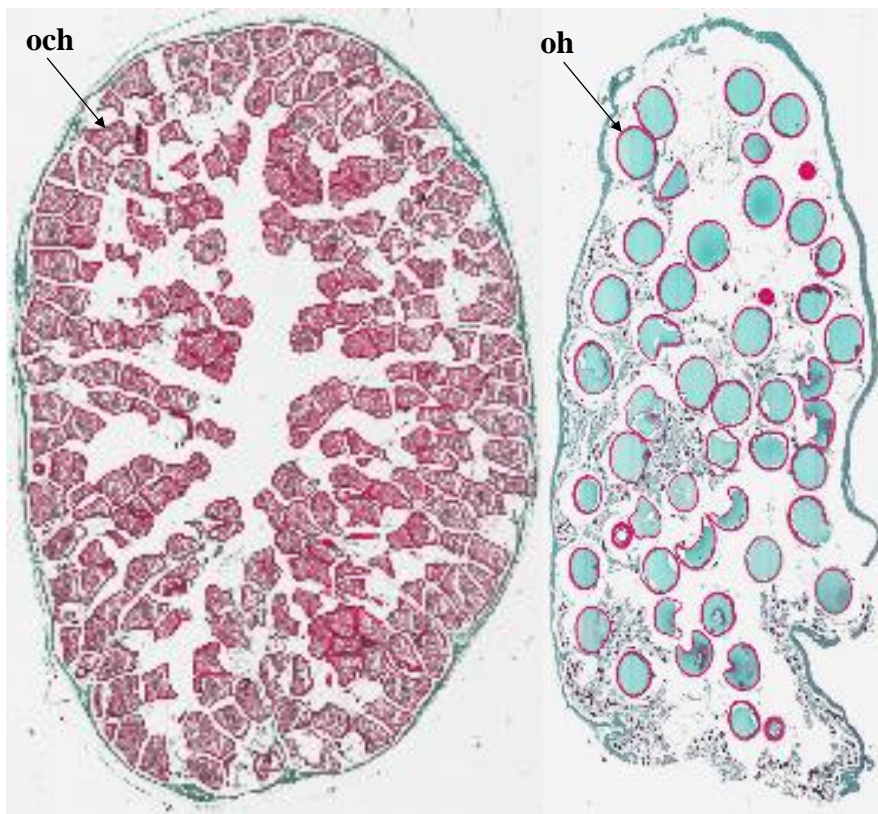


Figure 20 : Coupes histologiques d'ovaires de plie en phase C (frais). Gauche : ovaire rempli d'ovocytes au stade **och**. Droite : ovaire rempli d'ovocytes au stade **oh**

Les lames avec des stades **vit4** et **och** sont mal représentées suite à une perte importante de vitellus lors de la préparation des lames histologiques. Ces ovocytes peuvent perdre jusqu'à 80 % de leur masse de vitellus, rendant ces lames inexploitablement et menant au retrait de plus de 30 lames de la base de données. Pour les **oh**, ces derniers sont aussi sous représentés, car une seule lame en contenait.

En phase D (Figure 21), soit les individus en Régression/Régénération, les critères histologiques suivent ceux du modèle mis en place dans le Tableau 6. La phase D, malgré la CAH, est difficilement séparée en phase Régression (Da) et Régénération (Db) pour la simple raison que ces phases semblent très courtes. En effet, juste après la ponte l'ovaire montre une forte présence de **POF**, des ovocytes dans le lumen qui sont en lyse (**oaB**), des ovocytes non émis en atresie (**oaA**) vont rétrécir avant de disparaître (Barr, 1963) et les taux de **ov**, **op** et **cap** augmentent de nouveau, mais ne ressortent pas dans nos résultats suite à la petite taille de ces follicules. Cela marque la phase de renouvellement des ovocytes après la ponte (Db) (Barr, 1963). Pour les **POF**, nos observations ainsi que la littérature corroborent. Les **POF** restent environ 2 mois (janvier et février) dans l'ovaire avant de disparaître éventuellement (Barr, 1963). Dans la continuité, la paroi gonadique (**pg**) va alors augmenter en taille pendant que les taux de **ca**, puis les taux d'ovocytes en début de vitellogenèse (**vit1** et **vit2**) suivront cette croissance. Malheureusement, les individus en phase D sont majoritairement ceux récoltés en février et mars. Les prélèvements étant terminés, il est impossible de savoir si ce début de vitellogenèse mènera à une deuxième ponte ou si ces individus entreront en phase E.

Finalement, en phase E (Figure 22), phase définie par les critères histologiques du modèle mis en place dans le Tableau 6, montre des ovaires avec un fort taux d'**oaA**, soit des ovocytes qui sont encore entourés de leur thèque, mais qui sont en lyse. Les individus entrent en phase E notamment quand les ressources dans l'environnement de l'individu ne sont pas assez abondantes pour répondre à la demande énergétique importante de la gamétogenèse (Bromley et al., 2000 ; Hunter and Macewicz, 1985). En effet, l'atresie va permettre l'individu de réabsorber l'énergie allouée précédemment à l'ovogenèse sous forme de protéines et glucides (Hunter and Macewicz, 1985 ; Torres-Martínez et al., 2017).

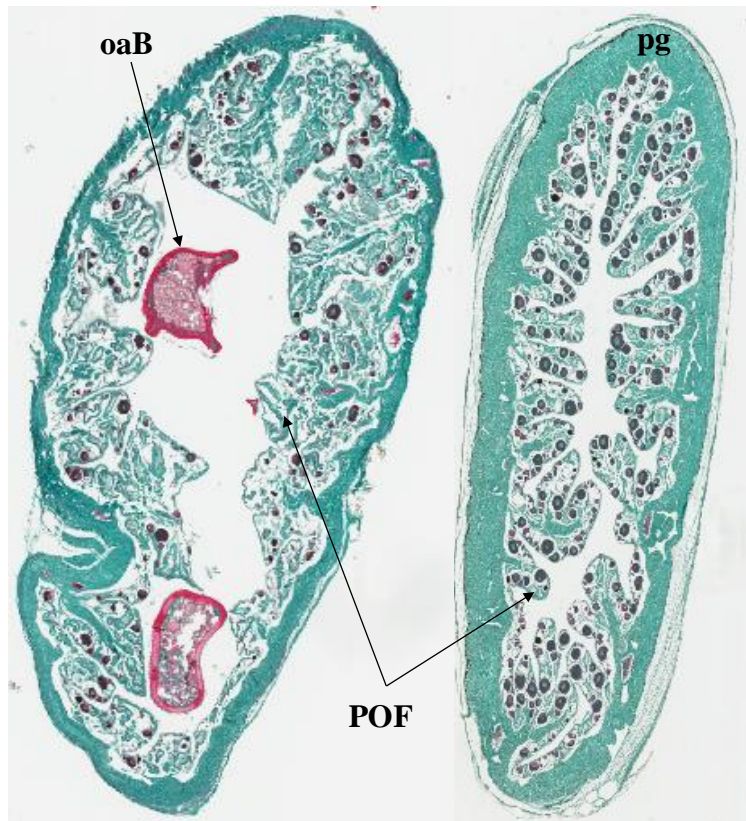


Figure 21 : Coupes histologiques d'ovaire de plie en phase D (régénération/régression). Gauche : individu qui vient de pondre, avec des résidus d'ovocyte émis en atrésie (**oaB**) et des **POF**. Droite : individus qui ont pondue (présence de **POF**) avec une paroi gonadique (**pg**) épaisse.

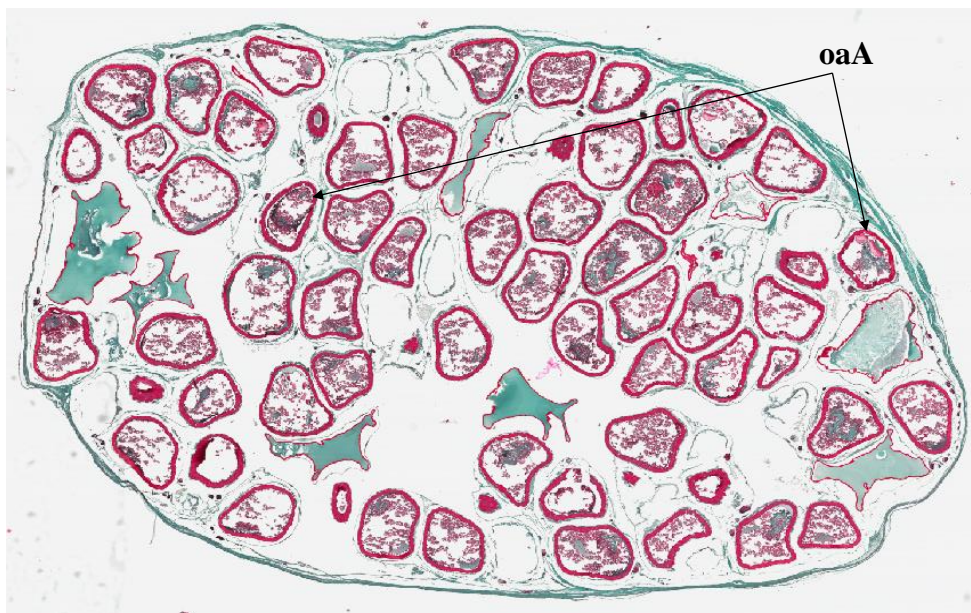


Figure 22 : Coupe histologique d'un ovaire de plie au stade E (omission de frai). Ovaire avec des ovocytes non émis en atrésie (**oaA**) en grand nombre

D. Maturité objective vs Maturité estimée visuellement

De tous les individus estimés visuellement comme étant en phase immature (A), seuls 13 % étaient réellement en phase A d'un point de vue histologique. Il en est de même pour les individus en Développement (B), avec seulement 35 % bien estimés, les individus en Frai (C) avec 67 % bien estimés et les individus en Régression/Régénération (D) estimés correctement de manière visuelle à 80 %. Les individus en Omission de frai (E) n'ont pas été repérés. Cet exercice montre la difficulté de séparer les individus de la phase A de ceux de la phase B (76 % des individus estimés comme immatures étaient en fait en B) et les individus de la phase D de ceux de la phase B (16 % des individus estimés en D étaient en fait des B). Cette difficulté est aussi reflétée dans les rapports de l'ICES (2018a, 2014a) et la publication de Gerritsen and McGrath (2006).

Pour la comparaison de la taille de la plie quand 50 % de la population arrive à maturité sexuelle (L50), les individus estimés matures visuellement ont une L50 à 19.6 cm ($R^2 = 0.27$) et ceux estimés de manière objective ont une L50 à 20 cm ($R^2 = 0.08$). Dans la littérature, la taille de la première maturité sexuelle moyenne des plies en Manche est de 31-33 cm pour les femelles (Mahé et al., 2007). Le modèle mis en place ici semble mal ajusté, avec des R^2 très faibles et une densité d'individus immatures très petite (seulement 8 individus).

E. Maturité objective en fonction des paramètres macroscopiques

L'arbre de classification des individus en différentes phases de maturité objectives en fonction des paramètres macroscopiques montre les limites de l'utilisation d'une maturité estimée visuellement. Le paramètre macroscopique qui ressort est le rapport gonado-somatique (**rapgonw**) qui permet de séparer en trois branches tous les individus A et une majorité des individus B, tous les individus D avec une minorité des individus B, et tous les individus C et E. Lors de l'estimation visuelle de la phase de maturité des individus, ce paramètre n'avait pas été utilisé. De plus, ce résultat montre une fois de plus que l'utilisation des paramètres macroscopiques pour séparer précisément les phases A et B ainsi que les phases B et D n'est pas simple (Gerritsen and McGrath, 2006 ; ICES, 2018a, 2014a).

Un arbre encore plus simplifié avec des paramètres choisis dans le cadre de récolte de données sur le terrain (les trois longueurs de la gonade, l'âge et la masse et taille du poisson) n'a pas permis de classer davantage les individus des différentes phases en fonction des paramètres

macroscopiques. L'arbre omet même certaines phases quand il est soit simplifié soit élagué, ce qui a été reflété dans la réalité avec l'absence d'individus classés en phase E (Omission de frai) et la difficulté de l'algorithme à classer E avec si peu de critères macroscopiques.

Finalement, il ne semble pas avoir de tendance claire pour différencier les phases de maturité quand les critères tels que la taille en fonction de l'âge ou la taille en fonction du poids sont pris en compte. Malgré notre faible échantillon en individus immatures ($n=8$), sur les 12 individus de janvier, qui étaient en moyenne les plus petits ($L_{\text{fish}} = 24.7 \text{ cm}$; $W_{\text{fish}} = 139.3 \text{ g}$), 6 individus immatures ont été pêchés à cette date-là. Or, la L_{50} est entre 31 et 33 cm chez les femelles de cette espèce (Mahé et al., 2007). Il en est de même pour les estimations de la maturité en fonction de l'âge avec des individus en novembre qui étaient, en moyenne, âgés de 1.8 an, ceux de décembre 2.8 ans et les plies des autres mois étaient, en moyenne, âgées d'environ 3.3 à 3.6 ans. Tous ces individus étaient généralement matures à des âges en dessous de 4 ans alors que la maturité en fonction de l'âge est estimée à 4-5 ans (ICES, 2014b ; IFREMER, 2011). De plus, la littérature cite que les individus peuvent atteindre la maturité sexuelle entre 2 et 7 ans (Mahé et al., 2007 ; Rijnsdorp, 1991, 1989), ce qui reflète une grande variabilité à prendre en compte.

Chez cette espèce en Manche mer du nord, des variations régionales de la taille en fonction de l'âge, surtout chez les femelles, ont déjà été observées (Bromley, 2000 ; Rijnsdorp, 1989). Des variations de l'âge à maturité et de la taille à maturité depuis le début du 20^{ème} siècle ont aussi été étudiées, que cela soit pour les mâles ou les femelles *Pleuronectes platessa* de la Manche (Horwood, 1990 ; Kell and Bromley, 2004 ; Rijnsdorp, 1989). Parmi les explications quant à ce phénomène, la pression de pêche sur cette espèce revient souvent dans la littérature (Rijnsdorp et al., 2005 ; van Walraven et al., 2010).

V. Conclusion

Ce travail a permis de mettre à jour et d'améliorer, grâce à l'histologie quantitative, les connaissances sur le cycle de développement des gonades des femelles de la plie en Manche. De plus, les différentes phases de maturité ont été reliées objectivement aux caractéristiques histologiques des gonades en s'appuyant sur la littérature scientifique et en suivant les recommandations des groupes de travail européens dédiés à l'étude de la maturité des poissons (ICES, 2018a, 2014a, 2012a). Les connaissances acquises durant ce travail ont été mises à disposition de la communauté (Sauger et al., 2019 ; Sauger and Kellner, 2019) et elles seront présentées les 26, 27 et 28 juin à Caen lors de la conférence de l'Association Française en

Haliéutique 2019 (présentation d'un poster). Au-delà de la diffusion de ces connaissances, l'objectivité de ces résultats s'appuie sur des exercices de calibration et sur la mise en place d'un protocole de lecture des lames histologiques. Ainsi, les pourcentages d'accord entre différents agents atteignent des taux élevés (+80 % d'accord) en regard des taux reportés par le passé (40 % à 60 % (ICES, 2018 b, 2013, 2012 b)).

Finalement, concernant l'utilisation des paramètres macroscopiques pour la détermination des phases de maturité, il a été démontré qu'il reste difficile de différencier certaines phases en utilisant ces paramètres. De plus, la littérature atteste du fait que les critères morphométriques sur lesquels sont basés certains calculs pour l'évaluation des stocks sont variables dans le temps et dans l'espace. Ces valeurs de références changeantes, ainsi que les mauvaises lectures visuelles des maturités sexuelles, peuvent impacter les modèles d'évaluation des stocks, notamment les estimations de la biomasse de reproducteurs (*spawning stock biomass* ou *SSB*) qui sont basées sur l'hypothèse que la moitié de la population mature en taille ou en âge (L50 ou A50) ne varie pas sur le temps (Kell and Bromley, 2004). Afin de pallier à cela, les points de référence devraient être mis à jour au moins tous les 5 ans (Kell and Bromley, 2004).

L'utilisation de l'âge, la taille ou d'autres paramètres macroscopiques comme indicateurs pour estimer la maturité est donc remise en cause pour cette espèce. Les L50 calculées dans cette étude (19 cm environ) montre que la taille commerciale de capture pour cette espèce dans cette zone (27 cm) permet d'éviter les captures des individus avant qu'ils ne se soient reproduits au moins une fois. Si dans ce particulier les objectifs de préservation du stock sont bien respectés, probablement due à une surestimation de la taille à première maturité, on peut se poser la question de la qualité de ces estimations pour d'autres espèces et de leurs impacts sur l'état des stocks correspondants, en particulier si les erreurs dans l'identification des phases de maturité conduisent à une sous-estimation de la L50.

Les travaux présentés dans ce rapport s'inscrivent dans une thématique de recherche plus large portée par l'IFREMER. Ainsi le lexique, le protocole de lecture et les lectures des lames histologiques effectuées pendant ce stage vont permettre de tester d'autres méthodes pour évaluer la maturité de la plie. La lecture des lames histologiques étant un processus long et fastidieux, et le lien avec les paramètres macroscopiques ténu, les liens entre les phases de maturité et les mesures d'impédancemétrie et de colorimétrie effectuées pendant ce stage pourront être évalués en suivant la même démarche analytique. Enfin, l'automatisation de la lecture des lames sera abordée dans le courant du mois de juillet par la mise en place de méthodes d'apprentissage supervisé (*deep*

learning dans notre cas) pouvant faire le lien entre les caractéristiques géométriques des structures lues et leurs identifications et simplifier, si les résultats le permettent, la lecture des lames histologiques.

Références

- 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.
- 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.
- 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., Elsevier* 44, 27–43. [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(00\)00043-5](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(00)00043-5)
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb02105.x>
- 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. 38 pp. <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., Wiley Periodicals* 277, 1219–1230. <https://doi.org/10.1002/jmor.20570>
- European Commission, 2014. Map of the fishing areas in the EU. https://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/fishing_areas_fr.pdf
- 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.
- Gabe, M., 1968. Techniques Histologiques, 2eme édition. ed. Masson et C., Paris. ISBN : 875369929
- 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., Elsevier* 77, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2005.08.007>
- Glagoleff, 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., Blackwell Science Ltd* 11, 1165–1176. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01515.x>
- Horwood, J.W., 1990. Fecundity and maturity of plaice (*Pleuronectes platessa*) from Cardigan Bay. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 70, 515–529. <https://doi.org/10.1017/S0025315400036559>
- 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, 2018a. Report of the Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF) (No. 38). International Council for the Exploration of the Sea, 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, 2018c. ICES Advice on fishing opportunities, catch, and effort. Greater North Sea Ecoregion - Plaice (*Pleuronectes platessa*) in Subarea 4 (North Sea) and Subdivision 20 (Skagerrak). 11pp. <http://www.ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Advice/2018/2018/ple.27.420.pdf>
- ICES, 2015. Manual for the International Bottom Trawl Surveys, SISP. International Council for the Exploration of the Sea. Series of ICES Survey Protocols SISP 10 - IBTS IX. 86 pp.
- 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/explore-us/projects/EU-RFP/EU%20Repository/ICES%20FishMap/ICES%20FishMap%20species%20factsheet-plaice.pdf>
- 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, 2012a. 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, 2012b. Report of the Workshop 2 on Sexual Maturity Staging of sole, plaice, dab and flounder (Workshop). International Council for the Exploration of the Sea, Oostende, Belgium. ICES CM 2012/ACOM:50. 64 pp.
- 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.
- IFREMER, 2019. Les ressources halieutiques françaises : bilan 2018. Dossier de Presse. Service Presse Ifremer. 8pp.
- IFREMER, 2018a. Qu'est-ce qu'un stock ? Pour Une Pêche Durable. Consulté le 07/06/2019 en ligne : <https://wwz.ifremer.fr/peche/Le-role-de-l-Ifremer/Expertise/Diagnostics/Notions-de-base/Definition-d-un-stock>
- IFREMER, 2018b. Appel à projets Politique de site 2018. 6pp.
- IFREMER, 2011. Biologie de la Plie commune (*Pleuronectes platessa*). 1pp. <https://wwz.ifremer.fr/peche/Le-monde-de-la-peche/Les-ressources/Lesquelles/Poissons/Osseux/Plies>
- Kell, L.T., Bromley, P.J., 2004. Implications for current management advice for North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.): Part II. Increased biological realism in recruitment, growth, density-dependent sexual maturation and the impact of sexual dimorphism and fishery discards. J. Sea Res., Elsevier 51, 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2003.11.001>
- Kennedy, J., Witthames, P.R., Nash, R.D.M., 2007. The concept of fecundity regulation in plaice (*Pleuronectes platessa*) tested on three Irish Sea spawning populations. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 64, 587–601. <https://doi.org/10.1139/f07-034>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1981.tb03818.x>
- Mahé, K., Delpech, J.P., Carpentier, A., 2007. Synthèse bibliographique des principales espèces de Manche orientale et du golfe de Gascogne. Conv. IFREMER 167pp. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/6643/>
- Marty, L., Rochet, M.J., Emande, B., 2014. Temporal trends in age and size at maturation of four North Sea gadid species: cod, haddock, whiting and Norway pout. Mar. Ecol. Prog. Ser. 497, 179–197. <https://doi.org/10.3354/meps10580>
- McHugh, M.L., 2012. Interrater reliability: the kappa statistic. Biochem. Medica 22, 276–282.
- Microsoft Corporation, 2019. Microsoft Excel for Mac. ENI édition, Paris.
- 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. Pêch. Marit. 46, 195–207.

- 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'œil nu. 21pp. <http://sih.ifremer.fr/>
- 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., 1991. Changes in fecundity of female North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.) between three periods since 1900. ICES J. Mar. Sci. 48, 253–280. <https://doi.org/10.1093/icesjms/48.3.253>
- Rijnsdorp, A.D., 1989. Maturation of male and female North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.). ICES J. Mar. Sci. 46, 35–51. <https://doi.org/10.1093/icesjms/46.1.35>
- Rijnsdorp, A.D., Grift, R.E., Kraak, S.B.M., 2005. Fisheries-induced adaptive change in reproductive investment in North Sea plaice (*Pleuronectes platessa*)? Can. J. Fish. Aquat. Sci. 62, 833–843. <https://doi.org/10.1139/f05-039>
- Rousseeuw, P., Hubert, M., Struyf, A., 2019. Finding Groups in Data: Cluster Analysis Extended. R documentation. <https://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/cluster/html/00Index.html>
- Sauger, C., Kellner, K., 2019. Lexique des structures histologiques des ovaires et de l'ovogenèse de la plie, *Pleuronectes platessa* (Linné, 1758). 26pp. <https://doi.org/10.13155/61234>
- 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'ovogenèse de la plie, *Pleuronectes platessa* (Linné, 1758). 39pp. <https://doi.org/10.13155/61235>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis”, Nature Methods 9, 671-675. PMID 22930834
- Società Italiana di biologia marina, 2015. Atlas of species maturity stages in data collection framework italian context. Research Project 8, Topic A2, Working group on maturity stages. 250 pp.
- 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>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jmor.20740>
- Tukey, J.W., 1977. Some thoughts on clinical trials, especially problems of multiplicity. Science 198, 679–684. <https://doi.org/10.1126/science.333584>
- van Walraven, L., Mollet, F.M., van Damme, C.J.G., Rijnsdorp, A.D., 2010. Fisheries-induced evolution in growth, maturation and reproductive investment of the sexually dimorphic North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.). J. Sea Res., Elsevier 64, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2009.07.003>
- 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, New York, NY. 574 pp.

Maturité objective d'une espèce de poisson plat, la plie (*Pleuronectes platessa*), par l'histologie quantitative

Annexes

Annexe 1 : Protocole de photographie des gonades

Les deux gonades d'un même individu sont disposées sur un fond vert uniforme et photographiées avec un marqueur de taille constant (une pièce de monnaie de 50 centimes d'euros sur fond bleu) et l'identifiant de l'individu. Le logiciel Image J ([Schneider et al., 2012](#)) permet l'analyse des photographies des gonades en détournant ces dernières, estimant leur volume et en corrigeant l'angle par rapport à la prise de vue. Les photographies ont été prises toujours par le même opérateur, avec le même appareil photo (Nixon D3200) et dans les mêmes conditions afin de diminuer les différences d'angles de vues et de luminosité. La photo prendra le nom de l'identifiant. L'identifiant de l'individu est présent sur chaque photo de gonade. Chaque individu a été identifié par les caractéristiques suivantes : code de l'espèce, date de prélèvement, zone de prélèvement, taille, masse, sexe, phase de maturité visuelle.

Figure Annexe 1: Gonade ventrale (bas) et gonade dorsale (haut) sur fond vert, numéro d'identification de l'individu (bas) et une pièce sur fond bleu pour la calibration de la photo



Annexe 2 : *Protocole pour le nom et identifiant des individus*

Chaque individu a été identifié par les caractéristiques suivantes : code de l'espèce, date de prélèvement, zone de prélèvement, taille, masse, sexe, phase de maturité visuelle.

Exemple : une plie, femelle, prélevée le 2 janvier 2018 dans la zone de pêche 7D, d'une longueur totale de 26 cm pour une masse de 196 g et une maturité visuelle estimée à la phase 2A.

Identifiant : *P 02012018 7D 26 196 F 2A*

Annexe 3 : Protocole de préparation pour la déshydratation des lames via le fixateur Davidson

Les échantillons dans les caissettes histologiques seront plongés dans le fixateur Davidson qui va fixer les tissus. Les échantillons seront ensuite recoupés afin de mettre en place un bord de coupe droit. Dans un automate Leica TP1020, les échantillons sont ensuite déshydratés : plongés dans plusieurs bains d'éthanol à 70 %, 95 % et 100 % sur des durées allant de 24 à 48 h, puis mis dans un bain de butanol à 100 % pendant 24 à 48 h. Toujours dans l'automate, les échantillons ont été immergés plusieurs fois en paraffine liquide pendant 24 heures à 60 °C. Les échantillons dans la paraffine sont ensuite coulés dans des barres de Leuckart. Une fois les cubes de paraffine refroidis, la coupe des gonades a été effectuée sur un microtome HM330. Trois coupes histologiques de 5 microns d'épaisseur ont été déposées par lames.

Protocole histologie déshydratation mode automatique

Les échantillons sont placés dans les caissettes histologiques et le fixateur (Davidson) pendant 12 à 24 h, à 4 °C, puis déshydratés dans un automate Leica TP 1020 selon le programme suivant :

P3 grosses pièces sur 48 h

- 1- Éthanol 70 % : 1 h
- 2- Éthanol 70 % : 3 h
- 3- Éthanol 95 % : 3 h
- 4- Éthanol 95 % : 4 h
- 5- Éthanol 100 % : 3 h
- 6- Éthanol 100 % : 4 h
- 7- Éthanol 100 % : 6 h
- 8- Butanol 100 % : 2 h
- 9- Butanol 100 % : 4 h
- 10- Butanol 100 % : 6 h
- 11- Paraffine : 4 h
- 12- Paraffine : 8 h

Les prélèvements sont ensuite inclus en blocs à l'aide des barres de leuckart.

Davidson (fixation)

Mettre dans l'ordre les produits suivants :

- 400 ml de glycérol (soit 1 volume)
- 800 ml de formol à 37 % (soit 2 volumes)
- 1200 ml d'éthanol 95 % (soit 3 volumes)
- 1200 ml d'eau de mer filtrée (soit 3 volumes) ou eau du robinet

Conserver cette solution à 4 °C puis rajouter extemporanément 10 % d'acide acétique concentré (soit 1 volume pour 9 volumes de solution mère).

Annexe 4 : Protocole de coloration des lames histologiques au trichrome de Gabe (1968) et montage des lames au Roti-histol

Coloration trichrome de Prenant Gabe

1) Matériel

- Hématoxyline de Groat:

<u>Solution A:</u>	E Dist	500ml
	Acide sulfurique concentré (H ₂ SO ₄)	8ml
	Ammonium Fer III sulfate (H ₄ NO ₆ S ₂ Fe, 12H ₂ O – MW=482,19)	10g
<u>Solution B:</u>	Ethanol 95°	500ml
	Hématoxyline	5g

Mélanger A + B. Attendre 30min (dépôt) et filtrer avant usage. Couleur violette.

Stockage 2 à 3 mois à l'obscurité. A changer quand couleur brune.

- Eosine 1% :

Eosine Y (ou B)	10g
E Dist	qsp 1L

Filtrer avant usage. Couleur rouge.

Stockage indéfiniment à l'obscurité. Récupérable après usage.

- Acide phosphomolybdique 1% :

Acide phosphomolybdique (H ₃ [P(MO ₃ O ₁₀) ₄], 10H ₂ O – MW=1824,96)	10g
E Dist	qsp 1L

Couleur jaune.

Stockage à l'obscurité. A changer après quelques passages.

- Vert lumière 0,2% :

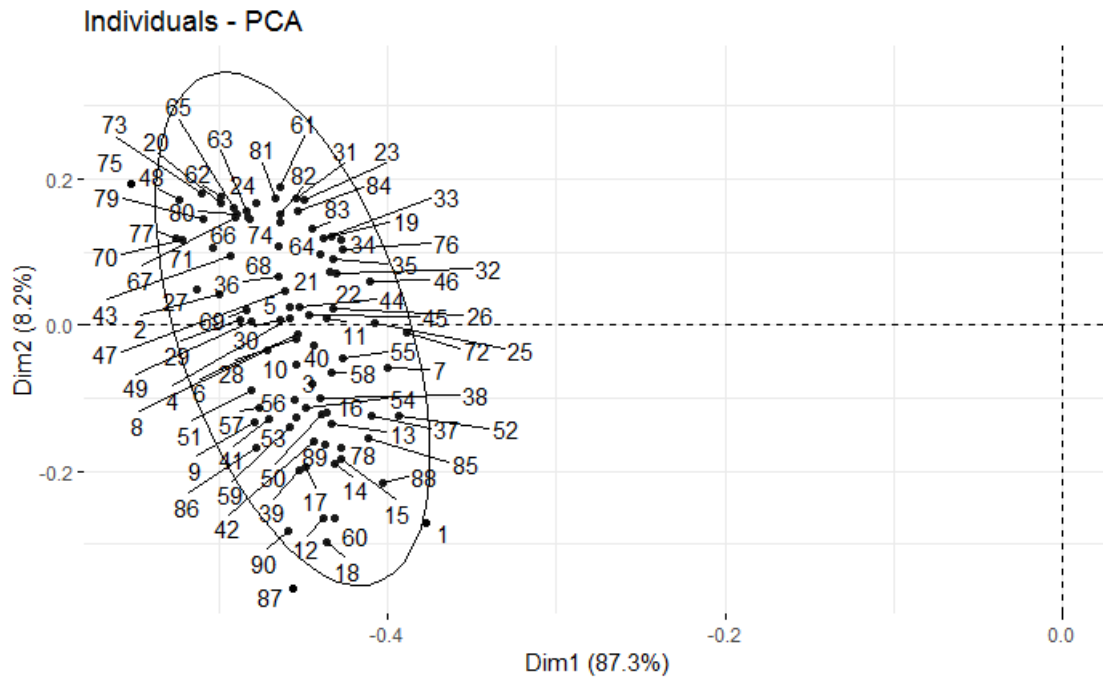
Vert lumière	2g
Acide acétique (C ₂ H ₄ O ₂)	quelques gouttes
E Dist	qsp 1L

Filtrer avant usage. Couleur verte.

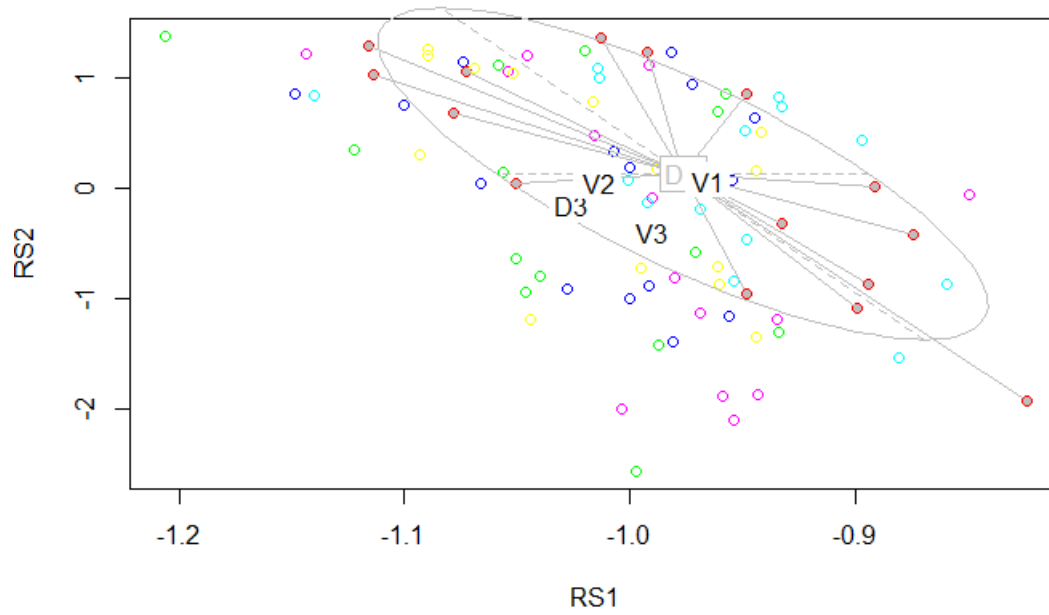
Stockage indéfiniment à l'obscurité. Récupérable après usage.

- Ethanol 100%
- Ethanol 95%
- Ethanol 70%
- Roti-histol

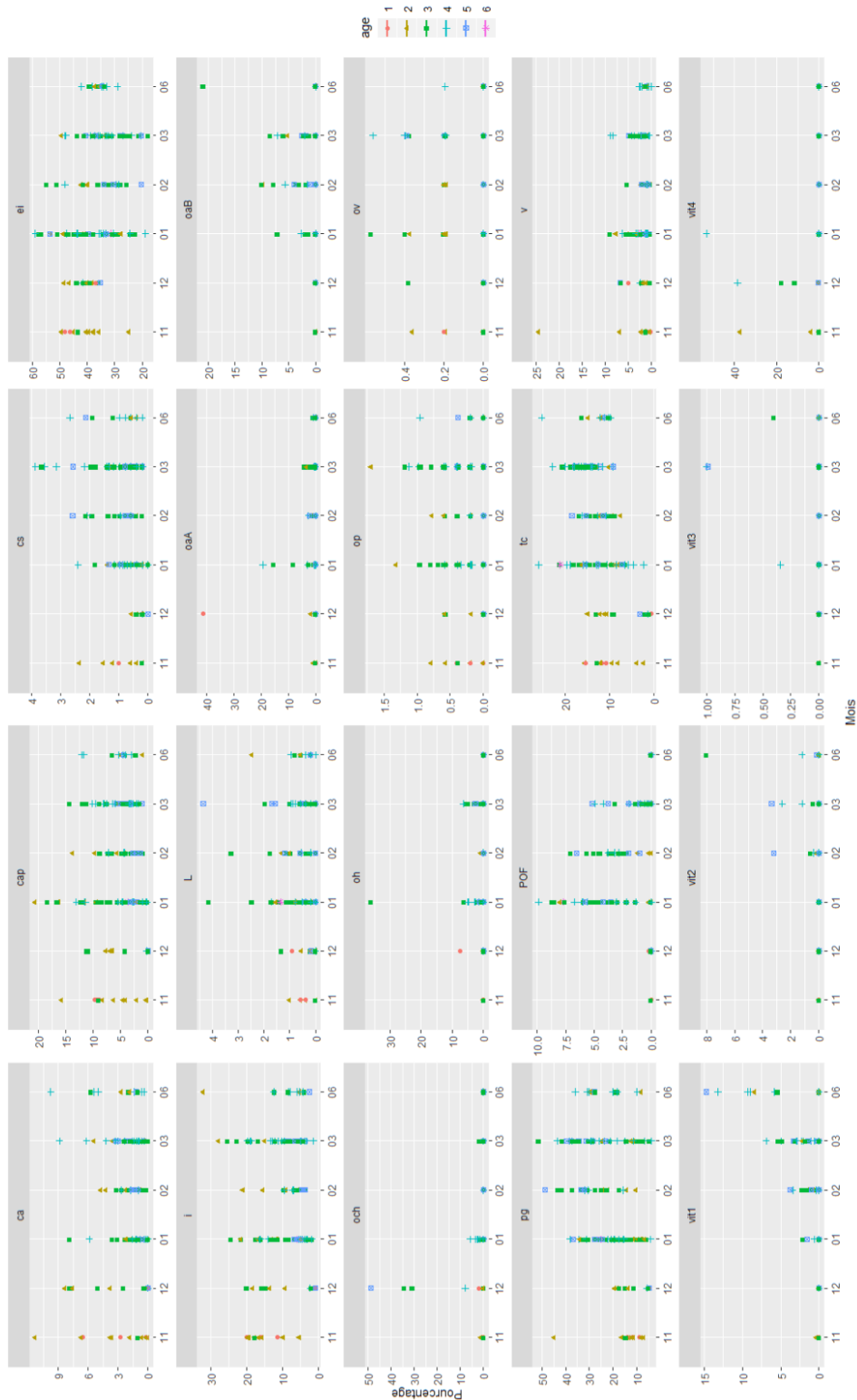
Annexe 5 : Représentation graphique de l'analyse en composantes principales des 90 lames histologiques lues pour les 15 individus. 95.95 % de la variation est exprimée sur les 2 axes



Annexe 6 : Représentation graphique de l'analyse en composantes principales des 90 lames histologiques lues pour les 15 individus, en faisant apparaître les différentes positions des lames (D1, D2, D3, V1, V2, V3). 95.95 % de la variation est exprimée sur les 2 axes



*Annexe 7: Distribution des 20 structures histologiques retrouvées à travers les 149 lames lues. Pour chaque structure, un point représente le pourcentage compté sur une lame, en fonction du mois de capture. L'âge (en années) de l'individu est signalé en code couleur. Avec **ca** = ovocyte à vésicules corticales alvéolaires, **cap** = ovocyte à vésicules corticales alvéolaires précoces, **cs** = capillaires sanguins, **ei** = espace intercellulaire, **i** = structures indéterminées, **L** = lyse, **oaA** = ovocyte atrétique alpha, **oaB** = ovocyte atrétique beta, **och** = ovocyte en cours d'hydratation, **oh** = ovocyte hydraté, **op** = ovocyte précoce, **ov** = ovogonie, **pg** = paroi gonadique, **POF** = follicule post-ovulatoire, **tc** = tissu conjonctif, **v** = vide dû à la coupe, **vit1** = ovocyte en début de vitellogenèse, **vit2** = ovocyte en vitellogenèse avec la migration du noyau, **vit3** = ovocyte ne vitellogenèse avec le noyau qui a migré et **vit4** = ovocyte en fin de vitellogenèse*



La plie en Manche mer du Nord, *Pleuronectes platessa*, est un poisson commercial bien étudié, mais dont on possède peu de connaissances quant à son histologie ovarienne. L'estimation de la maturité sexuelle chez les poissons est primordiale pour les estimations des stocks. Or, cette maturité est estimée en fonction de critères tels que la texture, la couleur et la taille de la gonade, qui sont le plus souvent très subjectives. De cela en découle des problématiques quant à la qualité de ces lectures de maturité, ainsi que de nombreuses confusions face aux multiples terminologies et grilles de déterminations pour ces différentes phases de maturité. L'ICES a soulevé ce problème depuis le début des années 2000. Afin de répondre à cette demande d'harmonisation des pratiques par l'ICES, et dans un souci d'améliorer cette lecture des phases de maturité, un lexique des structures histologiques de la plie, ainsi qu'un protocole de lecture des lames histologiques, ont été mis en place. Une méthode de calibration entre agents a permis d'obtenir des pourcentages d'accords (indice kappa de Fleiss) de lecture de lames histologiques de plus de 80 %. En suivant les échelles de maturité mises en place par l'ICES, il a été possible de déterminer les phases de maturité de manière objective en fonction de critères histologiques. De ces résultats, il a été observé que les individus avec une maturité estimée visuellement en Immature (A) ont 13 % de chance d'avoir été bien catégorisés, les individus en Développement (B) ont 35 % de chance, les individus en Frai (C) ont 67 %, les individus ayant fini de pondre (D) 80 % et 0 % pour les individus en Omission de frai (E). Finalement, avec un arbre de classification, seul le rapport gonado-somatique a pu séparer les individus A, C et E des autres groupes, tout en faisant apparaître des groupes mixtes entre les A et B ainsi que les D et B.

Mots clés : *Pleuronectes platessa*, histologie ovarienne, maturité objective, cycle de reproduction, terminologie

The north sea plaice, *Pleuronectes platessa*, is a commonly studied commercial fish, but whose ovarian histology is poorly known. The estimation of sexual maturity in fish is fundamental for stock assessments. However, this maturity is often estimated through very subjective criteria such as the texture, color or size of the ovary. Moreover, there is a lot of confusion with the different terminologies, definitions and scales that exist to define said sexual maturity. From this stems the difficulty of obtaining high quality maturity estimates from such readings. The ICES has been facing these problems since the early 2000's. In order to answer to this desire to harmonize the reading policy, as well as wanting to improve these sexual maturity estimates, a lexicon depicting the different histological structures of the plaice, as well as a reading protocol for the histological slides, have been put in place. A calibration method between agents has shown an 80% agreement (kappa Fleiss index) for the readings of the histological slides. While following the ICES maturity scales, the maturity phase of each individual has been established in a completely objective way all the while using histological criteria. From these results, it has been observed that the individuals that have been visually estimated to be in the Immature phase (A) had a 13% chance of having been correctly classified, fish from the Developing phase (B) had a 35% chance, those from the Spawning phase (C) had a 67% chance, those from the post-spawning phase (D) had an 80% chance and 0% from those in the Omitted spawning phase (E). Finally, a classification tree showed that the gonadosomatic index could be used to separate the individuals A, B and E from the other phases, with mixed groupings between A and B, as well as between B and D.

Key words : *Pleuronectes platessa*, ovarian histology, objective maturity, reproductive cycle, terminology