



Thèse de Doctorat

Mention Sciences agronomiques et écologiques
Spécialité Biologie des organismes, biotechnologie animale, végétale et microbienne

présentée à l'École Doctorale en Sciences, Technologie et Santé (ED 585)

de l'Université du Littoral Côte d'Opale

par

Nicolas ANDRIALOVANIRINA

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale

***Formes 2D et 3D des otolithes :
de la structuration à la classification des poissons***

Soutenue prévue le 05 novembre 2024, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. Dominique Ponton, Directeur de Recherche, UMR Entropie - IRD	Rapporteur
M ^{me} Françoise Daverat, Chercheuse HDR, INRAE	Rapporteur
M ^{me} Audrey Darnaude, Chargée de Recherche HDR, UMR Marbec	Examineur
M. Rachid Amara, Professeur, Université du Littoral Côte d'Opale	Examineur
M. Philippe Béarez, Directeur de Recherche CNRS, UMR AASPE - MNHN Paris	Examineur
M. Mathias Vignon, Maître de Conférences, UMR EcoBIOP - INRAE, Univ. Pau	Examineur
M. Sébastien Couette, Maître de Conférences HDR, UMR BGS EPHE - Univ. Bourgogne	Encadrant invité
M. Kélig Mahé, Cadre de Recherche, IFREMER Boulogne-sur-mer	Co-Directeur de thèse
M ^{me} Émilie Poisson Caillault, Professeure, Université du Littoral Côte d'Opale	Co-Directrice de thèse



Résumé

Les ressources halieutiques sont indispensables pour l'alimentation humaine et forment un maillon essentiel des écosystèmes marins. Sa gestion est réalisée en évaluant des unités de gestion appelées « stocks halieutiques ». Ces stocks sont souvent identifiés par la forme externe de l'otolithe, une pièce calcifiée présente dans l'oreille interne des poissons. En effet, sa forme varie selon l'héritage génétique, l'adaptation à l'environnement et l'évolution morphologique de l'individu au cours de sa vie. Jusqu'à présent, l'analyse de la forme externe des otolithes est analysée à partir d'images 2D issue en grande partie d'acquisitions par loupe binoculaire, microscope et scanner optique. Ces images 2D utilisent seulement la forme externe et donc partielle de l'information contenue dans l'otolithe. Ainsi, la thèse contribuera dans un premier temps à (i) extraire les informations de façon automatique et standardisée contenues dans la forme de l'otolithe à partir d'approches traditionnelles 2D mais aussi plus novatrices en 3D, pour avoir les informations non biaisées de la forme. Dans un second temps, à partir de ces informations de forme, des méthodes de machine learning ont été appliquées pour : (ii) analyser l'asymétrie entre les oreilles gauche et droite sur la forme des otolithes ; (iii) identifier les stocks halieutiques avec micro (île de la Réunion) et macro (mer Méditerranée) échelles spatiales ; (iv) identifier les espèces de poissons au sein d'un écosystème (Manche mer du Nord) à partir des otolithes en 3D en relation leur phylogénie et leur écomorphologie. Deux méthodes (2D et 3D) ont été développées pour standardiser les otolithes en termes de positionnement, de rotation et d'échelle de taille. Des paramètres univariés (mesures et caractéristiques) et multivariés (descripteurs elliptiques et sphériques de Fourier) ont été extraits automatiquement pour pouvoir analyser la forme. L'analyse comparable de la forme 2D de l'espèce de rouget barbet de vase (*Mullus barbatus*) en mer Méditerranée n'a pas montré de différence significative d'asymétrie liée à la zone géographique. Cette analyse a été complétée par la même approche en 3D qui elle à l'inverse a montré un effet géographique significatif sur la distinction des otolithes gauches et droits. La classification des données 2D et 3D du rouget barbet de vase ont permis de discriminer 2 unités de stocks en mer Méditerranée comparés aux écorégions obtenues par classification des données environnementales modélisées. Les résultats obtenus à partir du 3D ont été plus optimaux que ce soit en utilisant une classification non supervisée ou supervisée. Une étude à micro-échelle spatiale réalisée autour de l'île de la Réunion sur plusieurs espèces démersales à partir d'images 2D a montré que parmi les 9 espèces testées, 2 espèces (*Etelis carbunculus* et *Pristipomoides filamentosus*) présenteraient une structuration spatiale en deux stocks. Au niveau interspécifique, l'analyse de forme 3D a été appliquée sur les 22 espèces principales de l'écosystème Manche mer du Nord et a permis de montrer des relations significatives entre la forme 3D de l'otolithe et les caractéristiques phylogénétiques ainsi qu'écomorphologiques des poissons. La thèse a permis à la fois de standardiser automatiquement les données 2D et 3D des otolithes pour exploiter ses informations de forme. La forme 3D permet une augmentation de la précision et du nombre d'informations contenues dans l'otolithe. Ceci a été démontré pour plusieurs méthodes de machine learning pour identifier les stocks ou les espèces en lien avec la physiologie et l'environnement dans lequel elles évoluent. Ces données permettront de prédire l'évolution des structures de stock en fonction des changements globaux.

Mots clés : Otolithe des poissons, analyse de forme, 3D, identification de stock, asymétrie, identification d'espèces, machine learning

Abstract

Fishery resources are essential for human food and form a crucial link in marine ecosystems. Their management is conducted by assessing management units called "fishery stocks". These stocks are often distinguished by the external shape of the otolith, a calcified piece present in the inner ear of fish. Otolith shape varies according to genetic heritage, adaptation to the environment, and the morphological evolution of the individual during its life. Until now, the external shape of otoliths has been analyzed using 2D images, largely acquired through microscopes, and optical scanners. These 2D images only utilize the external and thus partial shape information contained in the otolith. This thesis initially contributes to : (i) automatically and standardly extracting the information contained in the otolith shape using traditional 2D approaches as well as more innovative 3D approaches, to obtain unbiased shape information. Subsequently, based on this shape information, machine learning methods have been applied to : (ii) analyze the asymmetry between the left and right otolith shapes ; (iii) identify fishery stocks at micro (Réunion Island) and macro (Mediterranean Sea) spatial scales ; and (iv) identify fish species within an ecosystem (English Channel/North Sea) from 3D otolith shapes in relation to their phylogeny and ecomorphology. Two methods (2D and 3D) have been developed to standardize otoliths in terms of positioning, rotation, and size scale. Univariate (measurements and characteristics) and multivariate (elliptic and spherical Fourier descriptors) parameters have been automatically extracted to analyze shape. A comparable 2D shape analysis of red mullet (*Mullus barbatus*) in the Mediterranean Sea did not show significant asymmetry differences related to the geographical area. This analysis was supplemented by the 3D approach, which, conversely, showed a significant geographical effect on the distinction between left and right otoliths. Classification of 2D and 3D red mullet data allowed the discrimination of two stock units in the Mediterranean Sea compared to the classification obtained by classifying modeled environmental data. The results obtained from the 3D analysis showed greater accuracy over the 2D, whether using unsupervised or supervised classification. A micro-scale spatial study conducted around Réunion Island on several demersal species using 2D images showed that, among the nine species tested, two species (*Etelis carbunculus* and *Pristipomoides filamentosus*) exhibited spatial structuring into two stocks. At the interspecific level, 3D shape analysis was applied to the 22 main species of the English Channel/North Sea ecosystem and demonstrated significant relationships between the 3D otolith shape and both phylogenetic and ecomorphological characteristics of the fish. This thesis allowed the automatic standardization of 2D and 3D otolith data to exploit their shape information. The 3D shape allows an increase in precision and the exploitation of the amount of information contained in the otolith. This technique has been demonstrated for several machine learning methods to identify stocks or species related to their physiology and the environment in which they evolve. These data will help predict the evolution of stock structures based on global changes.

Key words : Fish otolith, shape analysis, 3D, stock identification, asymmetry, species identification, machine learning

Remerciements

‘On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres : mais une accumulation de faits n’est pas plus une science qu’un tas de pierres n’est une maison.’

Henri Poincaré, 1902.

Tout comme cette citation, ce travail n’aurait pas pu voir le jour et être mené à terme sans les aides, les idées, les contributions et les cohésions entre quelques personnes et structures auxquelles je tiens profondément à exprimer ma grande gratitude.

J’aimerais apporter ma considérable reconnaissance à mes co-directeurs de thèse : Émilie Poisson Caillault et Kélig Mahé de m’avoir fait confiance pour réaliser ce projet de thèse. Merci pour tous vos encadrements, vos conseils, votre temps et surtout les grandes contributions que vous avez apportées lors de ces 3 années de thèse. Ça a été un très grand plaisir de travailler avec vous entre notre bonne cohésion d’équipe et tous nos sourires partagés. Ce travail n’aurait pas eu la même allure sans la contribution de mon encadrant Sébastien Couette également, qui nous a grandement aidé grâce à ses expertises scientifiques et sa grande connaissance en analyse 3D. Merci pour tout ce temps que tu as donné pour ces travaux malgré tes nombreuses préoccupations et la distance.

Je remercie l’EUR-IFSEA graduate school grant « ANR-21-EXES-00 11 », l’Université Littoral Côte d’Opale (ULCO) et l’Ifremer d’avoir financé ce projet de thèse. Je remercie également tous les structures et projets qui ont contribué à la réalisation de nos projets de recherche et de nos articles : la Structure Fédérative de Recherche dédiée à la mer et au littoral dans la région Hauts-de-France (SFR Campus de la mer, projet No. 2022.7); le e-Col+ (financé par le Programme d’Investissements d’Avenir, (ANR 21 ESRE 0053); le projet européen MED_UNITS financé par l’Union Européenne (Contrat No. 03_EASME/EMFF/2017/1.3.2.3/01/SI2.793201). Cette thèse a aussi bénéficié du soutien du CPER Cornelia, CO-construction RespoNsable Et durabLe à partir de l’IA.

Un grand merci au Laboratoire des Ressources Halieutiques de l’Ifremer de Boulogne-sur-Mer, au Laboratoire d’Informatique Signal et Image de la Côte d’Opale (LISIC), ainsi qu’à l’Université Littoral Côte d’Opale (ULCO) et l’École Doctorale Sciences, Technologie, Santé (ED 585) pour m’avoir accueilli dans ce parcours de thèse. Ma reconnaissance va également au Pôle de Sclérochronologie de l’Ifremer Manche Mer du Nord pour leur précieuse formation sur l’extraction et le traitement des otolithes, et leur disponibilité tout au long de ce travail. Un clin d’œil tout particulier aux plateformes GISMO du laboratoire Biogéosciences de Dijon et à l’équipe Artoise de l’UMR BioEcoAgro pour leur aide sur l’acquisition des images 3D. Merci, Rémi Laffont, Lauriane Poloni, et Aurélie Mateos, pour votre soutien technique et vos précieux conseils. Je remercie aussi Madel Floriane Adjibayo Houeto, David Roos, et toutes les personnes avec qui j’ai collaboré pendant ma thèse. De plus, je remercie toutes les personnes qui ont préalablement échantillonné toutes ces otolithes dans beaucoup d’endroits du globe, ce qui m’a permis de les utiliser dans ma thèse. Je tiens à remercier donc, les équipes du Bénin particulièrement Floriane Adjibayo Houeto Madel pour nos collaborations et les équipes de l’Ifremer de la Réunion particulièrement David Roos.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres de mon jury de thèse : Rachid Amara, Dominique Ponton, Françoise Daverat, Matthias Vignon, Audrey Darnaude et Philippe Béarez. Merci

d'avoir pris le temps d'évaluer ce travail malgré vos occupations multiples. J'adresse également mes sincères remerciements aux membres de mon comité de suivi de thèse : Bruno Ernande et Sébastien Verel tous leurs conseils et recommandations pour le bon déroulement de cette thèse.

Mes remerciements vont aussi aux équipes du FROM NORD, où j'ai eu la chance de réaliser un stage de M2. Une mention spéciale à Delphine Roncin et Bruno Leduc pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser mon stage d'embarquement sur un navire professionnel sans cela je n'aurais pas pu commencer ma thèse.

Je remercie également le Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (Cefas) pour m'avoir permis de faire des échanges scientifiques sur les recherches sur l'otolithe en Angleterre. J'adresse un grand merci à Valerio Visconti, David Maxwell et à Ikram Choudhury.

Je tiens également à remercier Marc Léopold pour son soutien constant au cours de mes études en France et ses précieux conseils concernant mon parcours de recherche et professionnel. Un grand merci à mon frerot Amadou Sow, qui m'a épaulé durant mes études, notamment lors des périodes difficiles du COVID-19.

Merci à tous mes collègues de l'Ifremer, à mes amis, ainsi qu'à la communauté Malagasy de Boulogne-sur-mer et des Hauts-de-France pour leur soutien professionnel, matériel et moral. Vous avez tous contribué à rendre ces années plus douces et bien moins solitaires.

Enfin, je n'oublierai jamais le soutien indéfectible de ma famille, que ce soit à Ambatondrazaka, Madagascar, ou ailleurs. Merci pour tout, de près ou de loin. Un merci tout particulier à toi, Maman, et à toi, Kevin, pour votre amour et votre soutien sans faille. Vous avez été mes pierres angulaires dans cette aventure, et je vous en suis éternellement reconnaissant.

À toutes et à tous merci !
Nicolas

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Remerciements	5
Table des matières	7
Introduction générale	9
Concept de stock halieutique	11
Définition d'un otolithe	15
Facteurs potentiels pouvant influencer la formation de l'otolithe au cours de la vie du poisson	19
Comment extraire les informations de la forme de l'otolithe ?	23
Comment traiter les informations de la forme de l'otolithe ?	29
Objectifs de la thèse	32
Présentation des cas d'études	34
1 Structuration des données : Standardisation des images 2D et 3D	41
1.1 Introduction du chapitre 1	41
1.2 Méthode automatique de transformation des images d'otolithes de routine en une base de données standardisée d'otolithes avec R	44
1.3 Méthode d'acquisition d'images 3D d'otolithes sagittal	57
1.4 Reconstruction des otolithes sagittal en 3D à partir de descripteurs sphériques de Fourier	65
1.5 Synthèse du chapitre 1	69
2 Effet de l'asymétrie directionnelle entre otolithes gauche et droit observé et comparé en 2D et en 3D	77
2.1 Introduction du chapitre 2	77
2.2 Asymétrie de la forme de l'otolithe sagittal en fonction du côté de l'oreille interne testée sur le rouget barbet de vase en Méditerranée (<i>Mullus barbatus</i>)	79
2.3 Synthèse du chapitre 2	95
3 Identification et comparaison de la structuration des stocks de poissons à partir des formes 2D et 3D des otolithes et des paramètres physico-chimiques environnementaux	98
3.1 Introduction du chapitre 3	98
3.2 Structuration spatiale des principaux poissons démersaux autour de l'île de la Réunion (Océan Indien Ouest) à partir de la forme externe de leurs otolithes	100

3.3	Identification du stock de rougets barbet de vase sans référence en utilisant la forme de leurs otolithes	116
3.4	Synthèse du chapitre 3	127
4	Variations de la forme des otolithes entre espèces selon leur stade de développement, leur phylogénie et leur écomorphologie	132
4.1	Introduction du chapitre 4	132
4.2	Identification d'espèces et de leur écomorphologie en Manche Mer Du Nord en utilisant la forme de leurs otolithes en 3D	133
4.2.1	Contexte et problématiques	133
4.2.2	Méthodologie	134
4.2.3	Résultats et discussion	137
4.3	Synthèse du chapitre 4	152
5	Discussion et perspectives	154
	Références bibliographiques	169
	Table des figures	191
	Liste des tableaux	195
	Liste des acronymes	196
6	Annexes	198
6.1	Annexe 1 : Asymétrie des otolithes de l' <i>Elops lacerta</i>	199
6.2	Annexe 2 : Asymétrie des otolithes du <i>Pseudotolithus senegalensis</i>	222
6.3	Annexe 3 : Bibliographie personnelle	242
6.4	Annexe 4 : Posters associés à la thèse	245

Introduction générale

Les ressources halieutiques, comprenant toutes les espèces aquatiques exploitées (poissons, crustacés, mollusques, ...) par les activités humaines (pêche commerciale, pêche de loisir, ...). Ces ressources naturelles jouent un rôle crucial pour les humains avec différents aspects à prendre en compte qu'ils soient sociaux, économiques et écologiques. Sur le plan social, elles contribuent de manière significative à la sécurité alimentaire, à l'emploi et à l'économie globale, notamment dans les communautés côtières et insulaires (FAO, 2020). Elles fournissent des protéines essentielles et des micronutriments vitaux, comme les vitamines A, B et D, ainsi que des minéraux tels que le calcium et le fer, indispensables à la santé humaine. La consommation de poissons est associée à une réduction des risques de maladies cardiovasculaires (BURR, 1992; HOLUB et HOLUB, 2004; SAREMI et ARORA, 2009) et à une amélioration de la santé maternelle et infantile (VOLLET *et al.*, 2017; SPILLER *et al.*, 2023), en particulier grâce aux acides gras oméga-3 présents en grande quantité chez les poissons (première source mondiale de production d'oméga-3; BENNETT *et al.*, 2018). La consommation des produits halieutiques est estimée à 20,2 kg par an et par habitant (FAO, 2020). Le secteur de la pêche - composé non seulement des pêcheurs, mais aussi des entreprises de la transformation jusqu'à la distribution - emploie directement environ 38 millions de personnes dans le monde (FAO, 2020). De ce fait, il est une source majeure de subsistance pour de nombreuses populations, surtout dans les pays en voie de développement. La figure 1 illustre ces données chiffrées. Environ 600 millions de personnes dépendent directement ou indirectement des ressources halieutiques pour leur subsistance (FAO, 2020; WORLD BANK, 2024). D'un point de vue écologique, les ressources halieutiques forment une part très importante des écosystèmes marins et participent à l'équilibre des habitats aquatiques en occupant un grand nombre des niveaux trophiques (relation proies/prédateurs, compétition alimentaire) (BAILEY *et al.*, 2010; HUNSICKER *et al.*, 2011; MADIN *et al.*, 2015).

Ainsi, les ressources halieutiques sont indispensables pour l'alimentation humaine, l'économie et la stabilité écologique. Leur gestion durable est essentielle à la fois pour les préserver pour les générations futures mais également pour assurer la bonne santé des écosystèmes marins. La gestion durable de la pêche vise à optimiser/réguler les activités humaines liées, sans pour autant compromettre la capacité des populations de poissons ciblées et non-ciblées à se reproduire et à se maintenir dans le temps (FAO, 2020; ONU FRANCE, 2024).

Les politiques de gestion des pêches s'appuient sur des estimations de divers paramètres tels que l'abondance, la biomasse, la productivité et la structure en âge des populations de poissons, en tenant compte de la dynamique propre à chaque espèce et de leur zone géographique (PATTERSON *et al.*, 2001). Ces paramètres sont estimés pour des unités de gestion appelées « stocks halieutiques » ayant des limites géographiques précises. L'un des principaux outils de gestion visant à promouvoir une pêche durable et optimiser les retombées économiques est l'exploitation de ces stocks selon le Rendement Maximum Durable (RMD, défini par les Nations Unies), qui représente la quantité maximale de captures prélevées d'un stock halieutique donné sans compromettre sa capacité de renouvellement à long terme, tout en tenant compte des conditions environnementales existantes ou pouvant évoluer avec le changement climatique qui ne cesse de changer l'environnement.

Beaucoup d'efforts ont déjà été réalisés pour améliorer la gestion des ressources halieutiques. Parmi les stocks halieutiques connus, 26% sont exploités de manière durable, soit plus de 10% de plus qu'en 1975 (FAO, 2020). Toutefois, 13% des stocks restent en situation de surexploitation et 57% des stocks n'ont pas encore été évalués, illustrés dans la figure 1). Cela signifie que la pression de pêche sur la majorité des ressources halieutiques demeure encore mal estimée, rendant les conséquences incertaines de la pêche et des autres activités humaines pour ces stocks et les écosystèmes associés. En plus de la pêche, le changement climatique modifie les écosystèmes et donc les réponses des espèces à ces évolutions. Ces changements se traduisent par un grand nombre de facteurs environnementaux. Notamment l'augmentation de la température de surface des océans de 1 à 5°C et de l'acidification des océans allant jusqu'à des valeurs de pH de 7.6 (actuellement près de 8.0) d'ici 2100 (selon les modèles utilisés de projection climatique; GIEC, 2021) sont au centre de ce changement climatique.

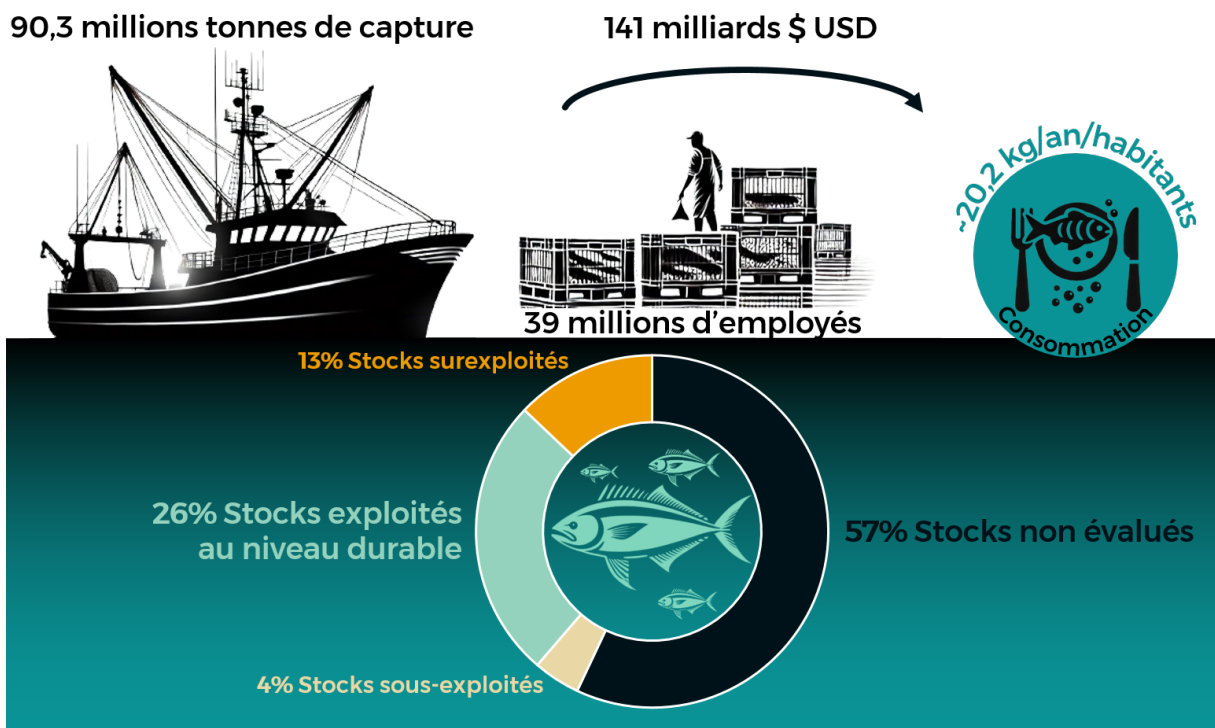


FIGURE 1 – Panorama de la pêche mondiale en 2020 (sur les chiffres de la FAO, 2020). Les données sur les stocks sont issues uniquement des débarquements déclarés. Les chiffres sur la consommation des ressources halieutiques combinent à la fois la pêche et l'aquaculture.

En conséquence, il reste plusieurs défis à la gestion durable la pêche. L'un des enjeux de la gestion des pêches est d'augmenter et d'optimiser la part des stocks évalués qui sont considérés comme l'unité de base pour l'évaluation des ressources halieutiques et de leur niveau d'exploitation durable (SHERMAN *et al.*, 2005; SPALDING *et al.*, 2007; PALOMARES *et al.*, 2020; FAO, 2020). L'efficacité de la gestion des pêches commence par une identification et une délimitation correctes des stocks, condition préalable à l'étude de la dynamique et de la structure des stocks ou unités de gestion (CADRIN *et al.*, 2014; MAHÉ, 2019; CADRIN, 2020). Chaque stock halieutique réagit différemment à la pression de pêche et aux mesures de gestion. Une mauvaise identification des unités de gestion (taille de l'unité de gestion représentant qu'une partie ou à l'inverse plusieurs

unités) pourrait conduire à des décisions de gestion non cohérentes avec la réalité, augmentant ainsi les risques de surpêche (BEGG et WALDMAN, 1999 ; BERG *et al.*, 2021).

Concept de stock halieutique

La connaissance des unités de gestion ou stocks halieutiques et de leurs limites géographiques sont des informations primordiales pour la gestion des pêcheries particulièrement dans un contexte de changement climatique qui peut engendrer des modifications des limites de ces unités de gestion. Ainsi, l'ensemble des acteurs ont besoin d'évaluer ces informations et de les mettre à jour, surtout lorsque les ressources ne sont pas dans des conditions optimales de croissance.

Dans ce manuscrit, le stock halieutique, nommé simplement stock par la suite, est défini comme l'unité de gestion qui est la partie exploitée des ressources halieutiques par les activités de pêche. C'est bien la notion d'unité utilisée dans la gestion des ressources marines et la mise en place des quotas de pêche, et non celle de population. Une population est définie comme un ensemble d'individus vivant dans un écosystème déterminé et possédant des caractères communs transmissibles par hérédité, utilisée en écologie (DAGET et LE GUEN, 1975). Le stock est la partie exploitable de la population c'est-à-dire généralement tous les individus adultes pouvant se reproduire.

Le stock présente une réponse indépendante à la pression de pêche par rapport aux autres groupes proches géographiquement (GAULDIE, 1988). Dans cette thèse, les recherches ont été ciblées sur les limites et la taille de cette unité de gestion ainsi que sur les paramètres permettant de définir précisément cette unité de stock. Ils peuvent être très différents en fonction de la biologie de l'espèce et des caractéristiques physico-chimiques de l'environnement dans lequel se développe cette espèce (figure 2).

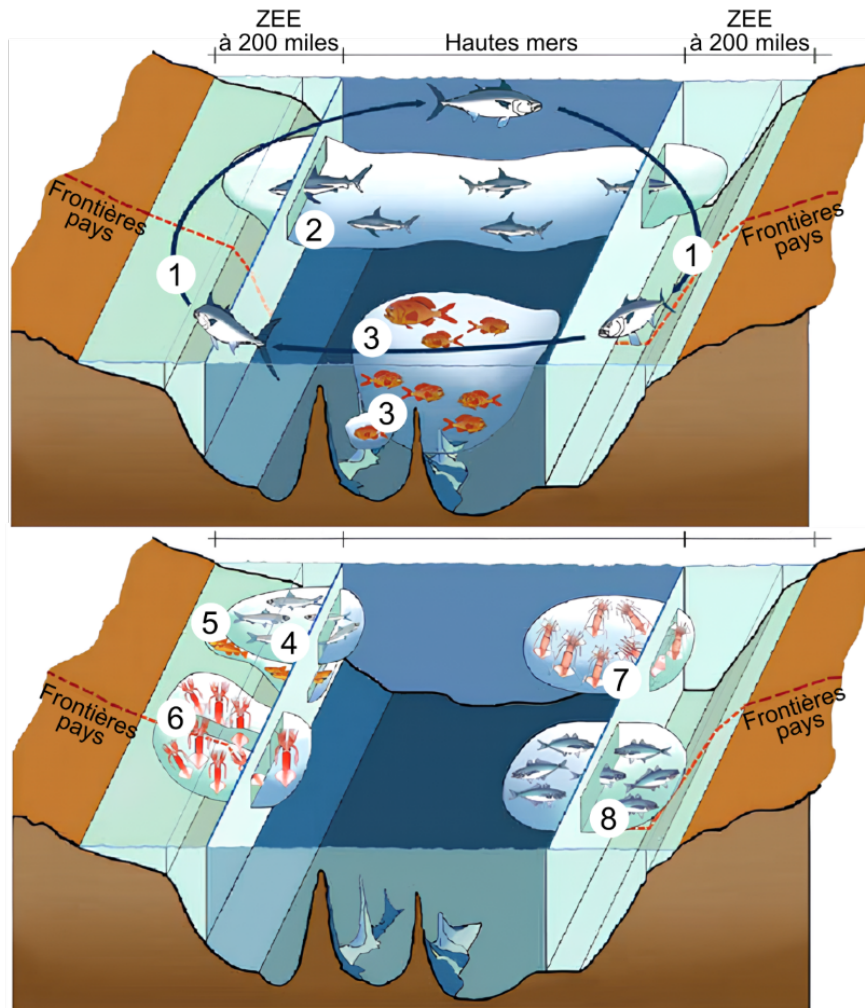


FIGURE 2 – Différents types de stocks halieutiques (modifié de The state of world highly migratory, straddling and other high seas fishery resources and associated species, <https://www.fao.org/4/a0653e/a0653e04.htm>). Les numéros représentent des tailles de stocks différentes réparties sur les ZEE et les Hautes mers.

D'autres définitions de stocks existent comme :

- le stock génétique (ensemble des individus d'une même espèce qui ne se reproduisent qu'entre eux et donc distinct d'autres stocks en termes de composition génétique qui se base sur la variance des fréquences alléliques entre stocks ; CARVALHO *et al.*, 1994 ; WARD, 2000)
- ou le stock phénotypique (ou environnemental, ensemble des individus d'une même espèce adapté à son environnement de sorte à avoir des caractéristiques phénotypiques communes dépendant de son environnement distinctes d'autres stocks qui se développent dans d'autres habitats ; BOOKE, 1981).

Le concept de stock halieutique a été initialement défini sans nécessairement prendre en compte les différences phénotypiques ou génétiques (CARVALHO et HAUSER, 1995). REISS *et al.*, 2009 ont montré que certaines limites de stocks ne reposent pas sur des bases biologiques solides en dépit des études disponibles. L'abondance des poissons dans un stock halieutique est principale-

ment influencée par le recrutement, la mortalité naturelle et la mortalité par pêche, plutôt que par l'immigration et l'émigration (LAUREC et LE GUEN, 1981). Cette définition a été adoptée essentiellement pour des raisons opérationnelles. Elle permet d'évaluer quantitativement les individus (nombre et biomasse) qui composent le stock, de comparer ces valeurs à des seuils de référence pour estimer l'état de santé du stock et de projeter son évolution future (HILBORN et WALTERS, 2001). L'absence de variation génétique détectable entre stocks ne signifie pas nécessairement un stock unique. Un stock génétique peut comprendre plusieurs stocks halieutiques ou phénotypiques, échangeant suffisamment d'individus pour masquer les différences génétiques tout en montrant des variations en termes de recrutement et de mortalité. Par exemple, des populations le long de gradients environnementaux peuvent présenter une variation génétique difficile à détecter, malgré une différenciation phénotypique perceptible (GAULDIE et CRAMPTON, 2002). Les études actuelles intègrent les composantes phénotypiques et génétiques pour définir les limites des stocks halieutiques (TAILLEBOIS *et al.*, 2017; ULRICH *et al.*, 2017; IZZO *et al.*, 2018). Les mécanismes régissant la distribution des populations au sein d'une espèce sont complexes et comprennent les effets de l'environnement, les interactions entre espèces et les pressions anthropiques tels que la pêche, la pollution, la perturbation des habitats et le changement climatique, conformément à l'approche écosystémique des pêches. Sans évaluations précises des stocks et une gestion adaptée, les populations de poissons peuvent s'effondrer, avec des conséquences économiques, sociales et écologiques graves (SINCLAIR, 1987; SINCLAIR et SMITH, 2002). Il est donc crucial de progresser dans la recherche sur l'évaluation des stocks pour garantir la durabilité des pêches. La première étape de ce processus d'évaluation consiste à caractériser les limites géographiques de ces stocks.

Méthodes d'identification de stock

L'identification des stocks halieutiques repose sur une variété de méthodes, chacune offrant des perspectives complémentaires pour déterminer la structure des populations de poissons. En reconnaissance de l'importance de cette discipline, un groupe d'experts appelé SIMWG (Stock Identification Methods Working Group) a été établi en 1997 au sein du Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM). Selon le dernier rapport de ce groupe, dix méthodes principales sont actuellement utilisées pour identifier les stocks : les marqueurs génétiques (notamment les microsatellites), les marqueurs de croissance dans les structures calcifiées, la forme des otolithes, la chimie des otolithes, les paramètres de l'histoire de vie, la morphométrie, le marquage et suivi, l'étude des parasites, les approches de simulation, et les approches interdisciplinaires (ICES, 2024).

La génétique est la méthode la plus utilisée (figure 3) en utilisant des marqueurs génétiques, tels que les microsatellites (BEACHAM *et al.*, 2008; HESS *et al.*, 2014; ARAUJO *et al.*, 2014; GILBEY *et al.*, 2017, les SNPs (single nucleotide polymorphisms) (CLEMENTO *et al.*, 2014; JORDE *et al.*, 2018; BEACHAM *et al.*, 2022) et les CNVs (Copy Number Variations) (ZHU *et al.*, 2016). Toutefois, cette méthode demeure très coûteuse et exige des équipements spécialisés. En outre, l'analyse et l'interprétation des données sont complexes, en raison du continuum génétique¹ lié à l'hérédité, qui rend la distinction entre les stocks difficile (ICES, 2024). La forme externe de l'otolithe est la seconde méthode la plus utilisée pour identifier les stocks et le nombre de publications sur le sujet augmente fortement depuis les années 2000 (figure 3). L'otolithe est également utilisé pour délimi-

1. Un continuum génétique est un concept qui décrit une situation où il existe une transition progressive et continue entre des populations ou des groupes génétiques, sans frontières nettes ou discontinuités majeures. Cela reflète une variation graduelle des caractéristiques génétiques à travers l'espace ou le temps.

ter ces stocks à partir de sa microchimie et des marqueurs de croissance présents sur ce dernier.

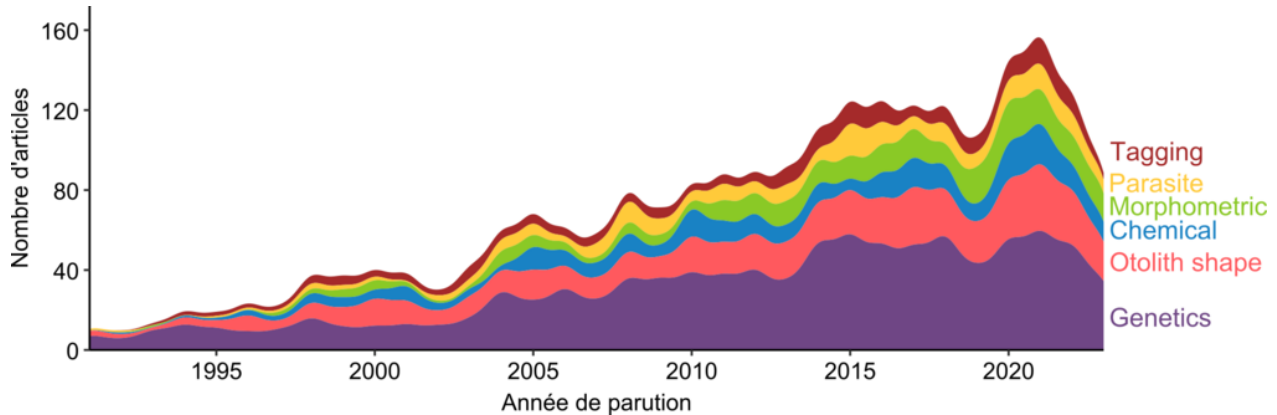


FIGURE 3 – Nombre d’articles scientifiques parus chaque année selon différents mots-clés après avoir préalablement sélectionné le mot-clé « fish stock identification » puis « genetic » ou « parasite » ou « chemical » ou « otolith shape » (source Web of Science, données extraites en juin 2024).

Depuis quelques années, une approche pour améliorer la délimitation des stocks de poissons consiste à utiliser une analyse multi-traceurs appliqués sur les même individus (ICES, 2024; HIDALGO *et al.*, 2024). Cette méthode intégrée combine différentes sources de données multi-disciplinaires, telles que la forme des otolithes, la microchimie des otolithes, la composition des parasites, et la génétique des poissons par exemple (HIDALGO *et al.*, 2024). Une telle approche permettrait de recueillir des informations complémentaires sur la structure des stocks, offrant ainsi une vision plus globale et précise de la variabilité au sein des populations de poissons. La morphométrie des otolithes, qui étudie la forme des otolithes, fournit des informations sur les différences morphologiques entre les populations. Ces variations peuvent être le reflet de pressions environnementales ou de différences génétiques, et ainsi aider à distinguer des stocks qui pourraient être confondus autrement. Toutefois, l’efficacité de cette méthode peut être limitée lorsqu’elle est utilisée isolément, car elle ne capture pas toute la complexité des interactions environnementales auxquelles les poissons sont soumis (CAMPANA et CASSELMAN, 1993). En intégrant la microchimie des otolithes, qui analyse la composition élémentaire des otolithes, il est possible de retracer les environnements spécifiques dans lesquels les poissons ont vécu au cours de leur cycle de vie. Cette technique offre un aperçu précieux des mouvements migratoires des poissons et de leurs interactions avec différents habitats. Par exemple, une étude combinant la forme en 2D des otolithes avec la microchimie a démontré que cette approche intégrée était plus efficace pour la délimitation des stocks que l’analyse de la forme seule, car elle permet de capturer des informations à la fois sur la morphologie et l’environnement de vie des poissons (MORALES-NIN *et al.*, 2022). En outre, l’utilisation de données génétiques permet de détecter des différences héréditaires entre les populations, renforçant ainsi la capacité à identifier des stocks distincts même lorsque les caractéristiques morphologiques ou environnementales ne suffisent pas à elles seules. L’utilisation des données génétiques et formes des otolithes permet d’optimiser la précision des analyses (RANDON *et al.*, 2020). L’ajout de données sur les parasites, qui peuvent être spécifiques à certains habitats ou populations, complète cette approche en offrant un autre niveau de différenciation des stocks. Cependant cette approche parasitaire est peu développée car il est nécessaire d’avoir au préalable des cartographies du taux d’infestation des individus et ce type de donnée n’est souvent pas connu ou

très parcellaire. L'intégration de ces différentes sources d'information à travers une analyse multi-traceurs permet non seulement d'améliorer la précision des classifications des stocks, mais aussi de mieux comprendre les dynamiques sous-jacentes aux populations de poissons.

Dans cette thèse, la forme des otolithes a été choisie comme méthode pour identifier les stocks de poissons. Cette approche présente plusieurs avantages. Contrairement aux analyses génétiques, elle ne se heurte pas au problème des continuums, ce qui facilite la distinction entre les groupes. De plus, la forme des otolithes varie en fonction de l'environnement dans lequel évolue le poisson. Par conséquent, cette méthode permet d'identifier des stocks liés directement à leur environnement, autrement dit, des stocks phénotypiques. Cependant, il est important de noter qu'un stock identifié par une seule méthode ne constitue qu'une hypothèse. Pour qu'un stock soit officiellement reconnu comme une unité de gestion, il doit être validé par des groupes d'experts, tels que le SIMWG, qui se concentre sur les stocks de poissons européens. Ces experts confrontent les hypothèses formulées avec d'autres approches et des données complémentaires, notamment des informations environnementales, afin d'assurer la robustesse et la pertinence des résultats.

Définition d'un otolithe

Les oreilles droites et gauches, puisqu'il s'agit de structures paires situées de part et d'autre sous le cerveau, sont constituées d'un réseau de canaux qui relie trois cavités (appelées sacs otiques) (figure 4).

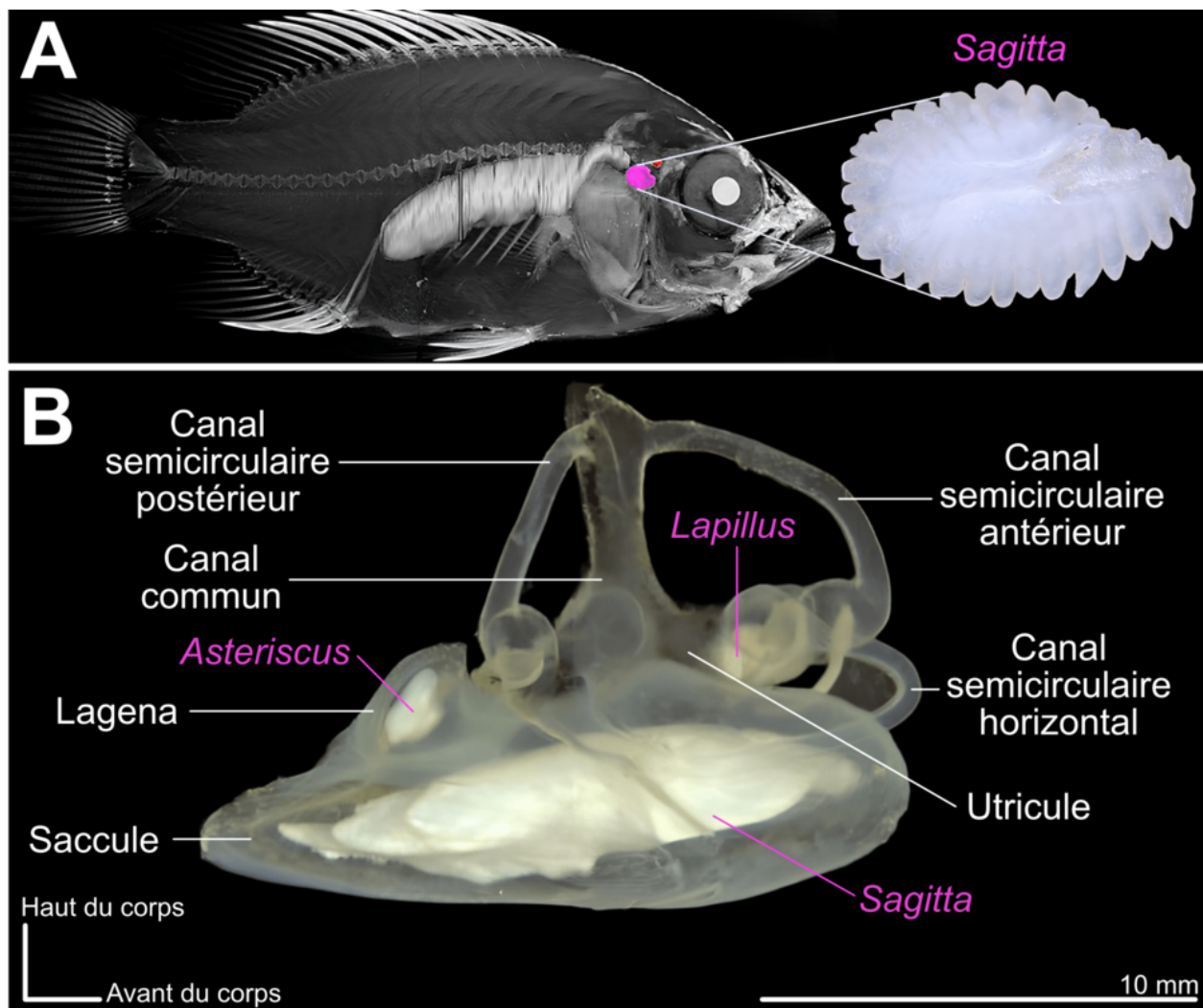


FIGURE 4 – Positionnement des otolithes dans le poisson et son oreille interne. A : structure interne du tilapia *Oreochromis niloticus* montrant la position de ces otolithes en couleur vive (figure modifiée de HUET, 2024). B : Vue latérale d’une oreille interne droite du *Antimora rostrata*, avec les trois otolithes clairement présents dans leurs sacs otiques (utricule pour le *lapillus*, lagena pour l’*asteriscus* et saccule pour le *Sagitta*) (figure modifiée de DENG *et al.*, 2011).

Chaque sac contient un otolithe et est rempli d'un liquide appelé endolymphe (PANFILI *et al.*, 2002) (figure 5). Les otolithes sont des concrétions formées en grande partie de carbonate de calcium qui sont présentes dans chaque cavité. La plus grande des cavités contient le plus grand otolithe, appelé *Sagitta* (figure 4). Ce dernier est utilisé dans presque toutes les études, car la variation de la forme des otolithes y est plus marquée (CAMPANA et CASSELMAN, 1993). Ainsi, dans toutes les études de cette thèse, l'otolithe *Sagitta* sera nommé de manière générale otolithe.

L'otolithe baigne dans la cavité otique, mais est relié à l'encéphale par une membrane appelée macula (PANFILI *et al.*, 2002, figure 5). Les otolithes permettent la transduction d'informations mécaniques telles que les mouvements (principalement les *asteriscus*) et les ondes sonores (principalement les *sagitta* et *lapillus*) en signaux nerveux (GRASSE, 1958).

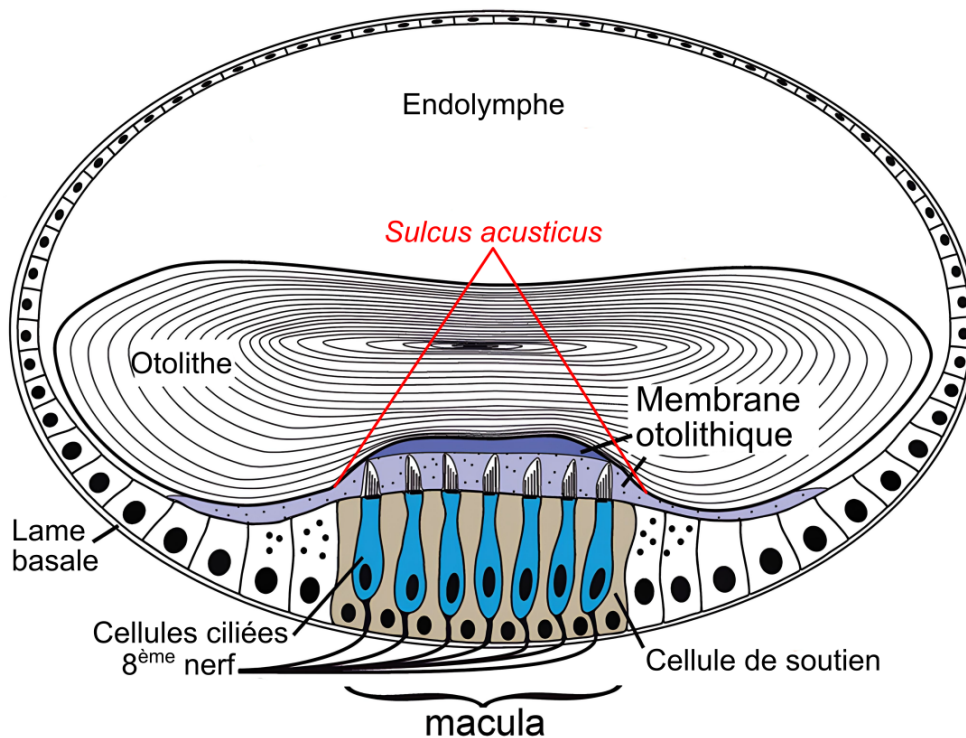


FIGURE 5 – Structure des sacs otiques contenant les otolithes (figure modifiée de SCHULZ-MIRBACH *et al.*, 2019).

Cette membrane (macula) est en contact avec l'otolithe sur sa face proximale (face interne) au niveau d'une gouttière nommée *sulcus acusticus* (figures 5 et 6). Cette membrane se répartit en trois parties selon un axe antéro-postérieur avec l'*excisura* (zone délimitée par le rostre et l'antirostre), l'*ostium* et la *cauda*, illustrées figure 6. Les caractéristiques de cette zone sont en lien étroit avec le développement acoustique (détection des ondes sonores) et angulaire (détection des accélérations permettant l'équilibre de l'individu). La forme de l'otolithe montre généralement une face interne proximale convexe et une face externe distale concave. En se positionnant sur la face interne, le développement de l'otolithe est souvent plus important sur l'axe antéro-postérieur (zone de mesure de la longueur de l'otolithe) par rapport à l'axe dorso-ventral (zone de mesure de la largeur de l'otolithe) (figure 6).

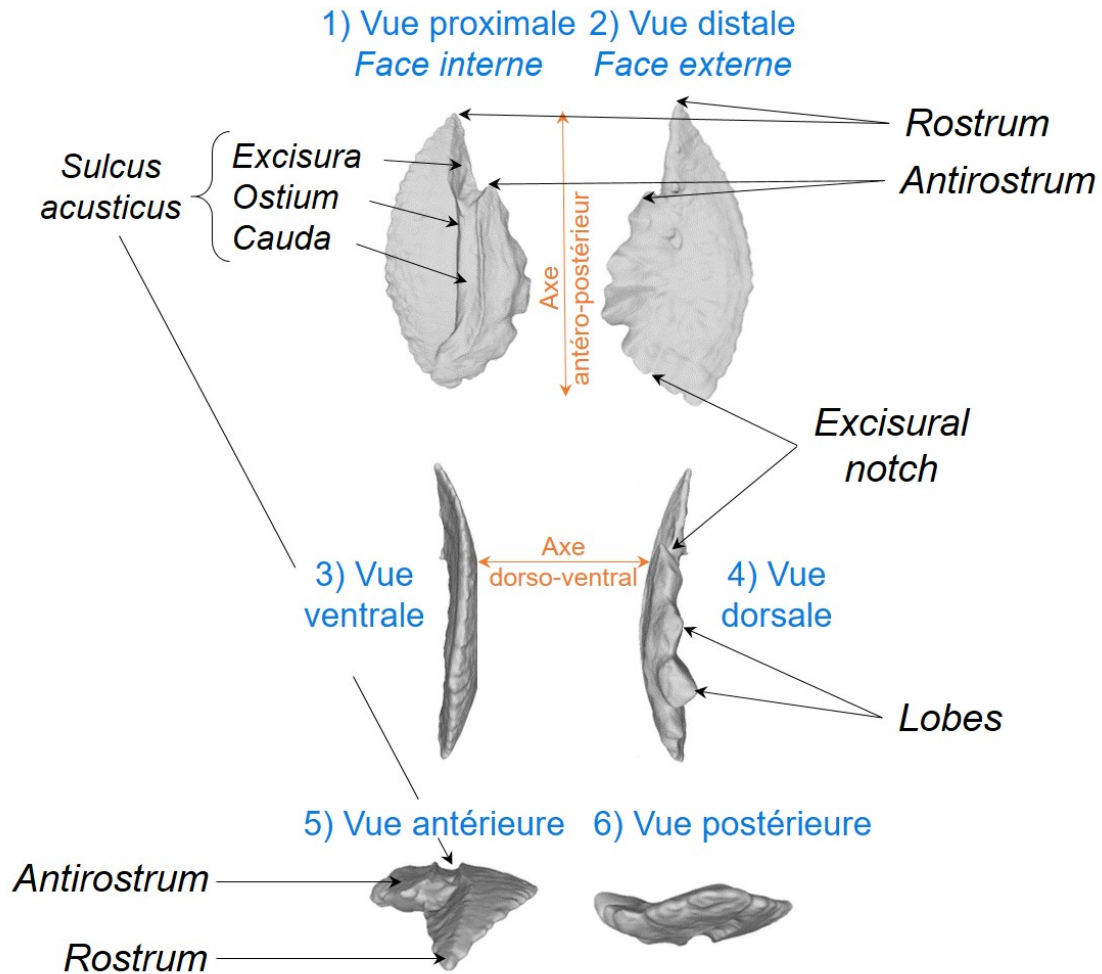


FIGURE 6 – Présentation d'un otolithe gauche du chinchard (*Trachurus trachurus*) à partir des différentes vues extraites de l'image en 3 dimensions.

Les otolithes, qui évoluent pendant toute la vie des poissons, présentent des signatures chimiques et physiques qui correspondent aux conditions biologiques et environnementales que le poisson a subies (CASSELMAN, 1987). Il a fallu attendre la fin du XIX^e siècle pour que des scientifiques observent ces otolithes et comptent sur leur surface externe des accroissements présentant une périodicité et donc permettant d'estimer l'âge des poissons (REIBISCH, 1899). Depuis cette date, l'utilisation scientifique des otolithes n'a cessé de croître. Si l'âge et la croissance sont les premières informations extraites de ces otolithes, beaucoup d'autres recherches scientifiques utilisent la forme et la composition chimique de l'otolithe pour discriminer les stocks au sein d'une espèce ou retracer les déplacements géographiques des individus. De même, il existe une relation significative entre la croissance du poisson et celle de ses otolithes (LAGARDÈRE et TROADEC, 1997, FOSSEN, 2003 ; MAHÉ *et al.*, 2017). En mesurant un otolithe d'une espèce, il est donc possible d'estimer la taille du poisson auquel il appartenait. CAMPANA et THORROLD, 2001 ont estimé que près de 800 000 otolithes furent utilisés au niveau mondial durant la seule année 1999, pour connaître les structures en âge des espèces de poissons commerciaux, ce qui représentait une somme de l'ordre de 8 millions de dollars canadiens. De même, en 2010, un bilan européen des

pièces calcifiées fournies par les différents pays pour suivre les stocks des eaux européennes était de 759 403 (ICES, 2011). Ainsi, chaque année dans le monde, le nombre de pièces calcifiées récoltées, essentiellement des otolithes, est supérieur au million.

Facteurs potentiels pouvant influencer la formation de l’otolithe au cours de la vie du poisson

L’étude de la forme externe de l’otolithe s’est fortement développée dans la recherche pour mieux comprendre les populations de poissons et leurs limites géographiques. Cette forme intègre toutes les variations de conditions environnementales et de forçage climatique durant la vie du poisson et les caractéristiques génétiques des parents (VIGNON et MORAT, 2010; WEI et ZHU, 2022; JAWAD *et al.*, 2023; REIS *et al.*, 2023). Ces différences de forme de l’otolithe peuvent être attribuées à des différences géographiques liées à l’activité métabolique des organismes. Cette dernière est elle-même le résultat des facteurs environnementaux et de la composante génétique propre à chaque individu (GAULDIE et NELSON, 1990; SMITH, 1992; BEGG et BROWN, 2000). La forme de l’otolithe du poisson évolue depuis le stade embryonnaire jusqu’à l’âge adulte. Cette transformation, connue sous le nom d’ontogénie, décrit le développement morphologique au fil de la vie d’un poisson. Bien que les influences génétiques et environnementales soient essentielles pour comprendre la forme des otolithes, le principe d’ontogénie est également crucial (SOGARD, 1991; HÜSSY, 2008; MORAT *et al.*, 2012; VIGNON, 2012; MAHÉ, 2019; LOEPPKY *et al.*, 2021; WEI et ZHU, 2022). Par conséquent, la forme de l’otolithe d’un individu donné se modifie tout au long de son existence. La figure 7 illustre cette différence pour 3 stades de vie.

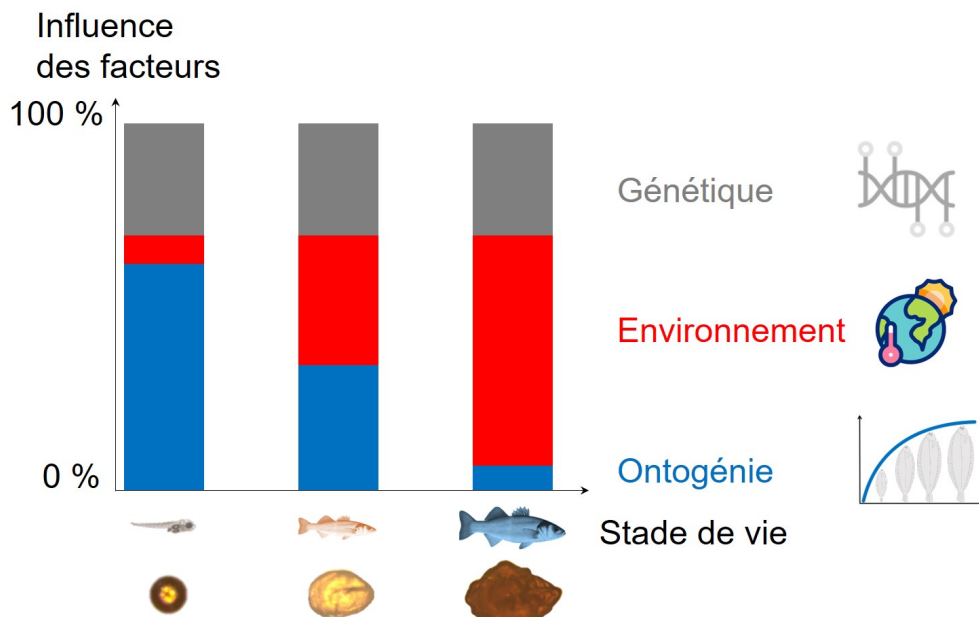


FIGURE 7 – Influence des facteurs potentiels (ontogénie, environnement, hérédité génétique) sur la forme du poisson et de son otolithe à chaque stade de vie.

L’utilisation de la forme de l’otolithe comme méthode pour discriminer les stocks s’est déve-

loppée depuis les années 1990 avec en particulier les études de DE PONTUAL et PROUZET, 1988 et CAMPANA et CASSELMAN, 1993. Depuis les années 1990, les scientifiques ont développé un engouement certain à utiliser la forme de l'otolithe comme méthode de discrimination de stocks de poissons avec près de 50 articles scientifiques par an lors de ces dernières années. Le suivi réalisé chaque année par un groupe d'experts internationaux (Groupe de travail sur les méthodes d'évaluation des stocks SIMWG, mis en place par le CIEM) montre que l'analyse de forme des otolithes devient la principale méthode employée pour définir et valider les limites des stocks. Ceci peut s'expliquer par les avancées récentes en matière d'analyse d'images et de traitement des données, en particulier avec le développement des outils statistiques tels que R (R CORE TEAM, 2024) qui permettent de réaliser des études par un plus grand nombre et à faible coût en comparaison avec l'approche des traceurs génétiques, en montrant des résultats généralement comparables.

La morphologie externe des otolithes contribue également à distinguer les diverses espèces de poissons auxquelles ils appartiennent, offrant ainsi une méthode de reconnaissance au niveau interspécifique. De ce fait, ces analyses sont employées dans le cadre de recherches archéologiques (DISSPAIN *et al.*, 2016 ; AGIADI, 2022) ou dans des études portant sur les interactions entre proies et prédateurs au sein des réseaux trophiques (LOWRY, 2011 ; STOCK *et al.*, 2021 ; QUIGLEY *et al.*, 2023). Il a été constaté que chez différentes espèces, la taille des individus n'est pas nécessairement proportionnelle à celle de leurs otolithes (CAMPANA, 2005). Ainsi, des espèces pélagiques² comme le thon ou l'espadon peuvent avoir des otolithes relativement petits ; tandis que certaines espèces récifales plus petites peuvent posséder des otolithes plus grands (CAMPANA, 2005). Par ailleurs, les espèces de poissons adeptes de la nage rapide ont tendance à posséder des otolithes plus élancés comparativement à ceux des espèces benthodémersales³.

En plus de ces 3 classes de facteurs pouvant potentiellement affecter la forme de l'otolithe, il y a un autre facteur à prendre en compte, car les otolithes étant des structures paires présentes dans les oreilles internes droite et gauche (figure 8), une asymétrie de forme entre les deux otolithes peut être observée de façon plus ou moins marquée selon l'espèce considérée et son environnement.

2. Les poissons pélagiques évoluent essentiellement en haut de la colonne d'eau, c'est-à-dire à proximité de la surface.

3. Les espèces benthiques vivent en bas de la colonne d'eau, c'est-à-dire à proximité du fond, et se nourrissent principalement d'animaux dans ou sur le fond. Les espèces benthodémersales vivent à proximité du fond, mais peuvent également être une partie du temps au milieu de la colonne d'eau (VOLPEDO *et al.*, 2008 ; TUSET *et al.*, 2014).

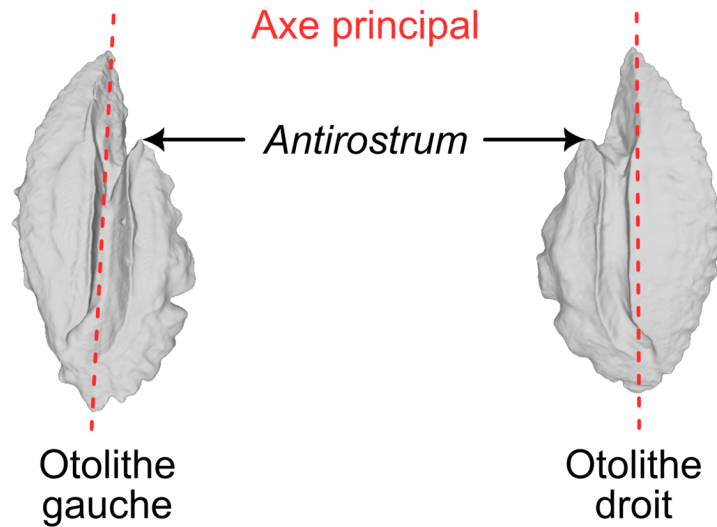


FIGURE 8 – Présentation de l’otolithe gauche et droit du chinchard (*Trachurus trachurus*) et de la complexité de forme variant selon la partie divisée par l’axe principal ou la présence de l’*antirostrum*

L’asymétrie individuelle entre les otolithes droit et gauche d’un même individu est l’un des effets physiologiques qui peut biaiser l’identification des stocks réalisée à partir de la forme des otolithes (MAHÉ *et al.*, 2021). En effet, de nombreuses études de la forme des otolithes utilisent l’otolithe gauche ou droit ou les mélanges des deux sans pour autant tester leurs effets sur l’analyse (MAHÉ *et al.*, 2021 ; MUÑOZ-LECHUGA *et al.*, 2023). L’asymétrie entre les otolithes droit et gauche chez les poissons peut se manifester sous différentes formes et être influencée par plusieurs facteurs. Trois types d’asymétrie sont principalement identifiés : l’asymétrie fluctuante, l’asymétrie directionnelle (AD), et l’antisymétrie. L’asymétrie fluctuante, caractérisée par une déviation aléatoire de la symétrie parfaite, est souvent utilisée comme indicateur de la stabilité développementale, reflétant la capacité d’un organisme à développer une symétrie idéale malgré les perturbations environnementales et génétiques. Cette forme d’asymétrie est généralement associée au bien-être physique (fitness) de l’individu, où une augmentation de l’asymétrie fluctuante peut indiquer un stress accru ou une diminution des performances (PALMER, 1994 ; PALMER *et al.*, 2010 ; DÍAZ-GIL *et al.*, 2015). L’asymétrie de la forme de l’otolithe, qu’elle soit fluctuante ou directionnelle, peut entraîner un dysfonctionnement du système de détection vestibulaire (HILBIG *et al.*, 2011). Elle peut également avoir un impact sur la capacité du poisson à traiter les sons et à s’auto-orienter (LYCHAKOV *et al.*, 2008), et influencer ses schémas de nage (BEIER *et al.*, 2002 ; LYCHAKOV *et al.*, 2008 ; HILBIG *et al.*, 2011). Chez les poissons plats, l’asymétrie de la tête, incluant la migration de l’œil et du système nerveux pendant la métamorphose, est principalement déterminée génétiquement (GRAF et BAKER, 1983 ; FRIEDMAN, 2008 ; BAO *et al.*, 2011 ; COMPAGNUCCI *et al.*, 2014). Cette asymétrie se traduit par des otolithes plus larges et plus longs du côté aveugle, indépendamment de l’espèce qu’elle soit à gauche ou à droite (SOGARD, 1991 ; FISCHER et THOMPSON, 2004 ; HELLING *et al.*, 2005 ; MÉRIGOT *et al.*, 2007 ; MILLE *et al.*, 2015). Cette asymétrie directionnelle est une adaptation fonctionnelle au mode de vie benthique des espèces appartenant à la famille des pleuronectiformes. La gravité terrestre, influençant la croissance accréctionnelle, peut être une des sources qui contribue à cette asymétrie chez les poissons plats contrairement

aux poissons ronds (SCHREIBER, 2006 ; MILLE *et al.*, 2015). Le niveaux d'asymétrie de l'otolithe chez les poissons ronds (tête symétrique) peut varier selon les espèces et plus particulièrement entre stocks d'une même espèce, suggérant une influence environnementale sur cette caractéristique morphologique (KLINGENBERG, 2015 ; MAHÉ *et al.*, 2021). En général, pour les poissons ronds, les formes des otolithes gauche et droit sont symétriques dans l'espace 2D (CASTONGUAY *et al.*, 1991 ; CARDINALE *et al.*, 2004 ; PETURSDOTTIR *et al.*, 2006 ; DUARTE-NETO *et al.*, 2008 ; MILLE *et al.*, 2015 ; MAHÉ *et al.*, 2016b). L'asymétrie est souvent liée au stress et/ou aux variations de l'environnement. Elle est souvent considérée comme un marqueur de l'instabilité développementale (GREEN *et al.*, 2017 ; MAHÉ *et al.*, 2021). La plupart des espèces de poissons ronds analysés montrant une asymétrie significative des otolithes est située dans des régions tempérées où la variation de la température est très fluctuant avec une gamme de valeurs très étendue (PALMER et STROBECK, 1986). C'est le cas chez le hareng (*Clupea harengus*) (BIRD *et al.*, 1986) et le merlan (*Merlangius merlangus* MILLE *et al.*, 2015) en Manche mer du Nord ; chez le sparailon (*Diplodus annularis*) (TROJETTE *et al.*, 2015) et le mullet porc (*Liza ramada*) (REBAYA *et al.*, 2017) en Tunisie ; chez le sar à museau pointu (*Diplodus puntazzo*) en mer Égée (BOSTANCI *et al.*, 2016) ; chez le thazard oriental (*Scomberomorus niphonius*) dans la mer Jaune et la mer de Chine orientale (ZHANG *et al.*, 2016) ; ainsi que chez le bogue (*Boops boops*) en Méditerranée (MAHÉ *et al.*, 2018). Mais qu'en est-il pour les poissons vivant dans des milieux tropicaux où la température est élevée mais avec une étendue peu variable (c'est-à-dire avec une gamme de températures très restreinte par rapport aux milieux tempérés) ?

Dans cette thèse, de nouvelles recherches sur cette thématique ont été menées sur l'asymétrie en 2D des otolithes chez des espèces tropicales, puis à la fois en 2D et en 3D en milieu tempéré. Cet effet est quantifié de plus en plus depuis 2019 (figure 9). Chez les poissons, seulement une étude au niveau interspécifique a montré que les espèces présentaient des sensibilités auditives différentes et que cela pourrait être dû à leur adaptation fonctionnelle différente des oreilles internes droite et gauche en fonction de l'habitat rencontré (SCHULZ-MIRBACH *et al.*, 2012). De même, une étude au niveau intra-spécifique a renforcé cette conclusion en montrant qu'au sein d'une espèce, il peut y avoir des niveaux d'asymétrie significativement différents selon l'habitat (MAHÉ, 2019).

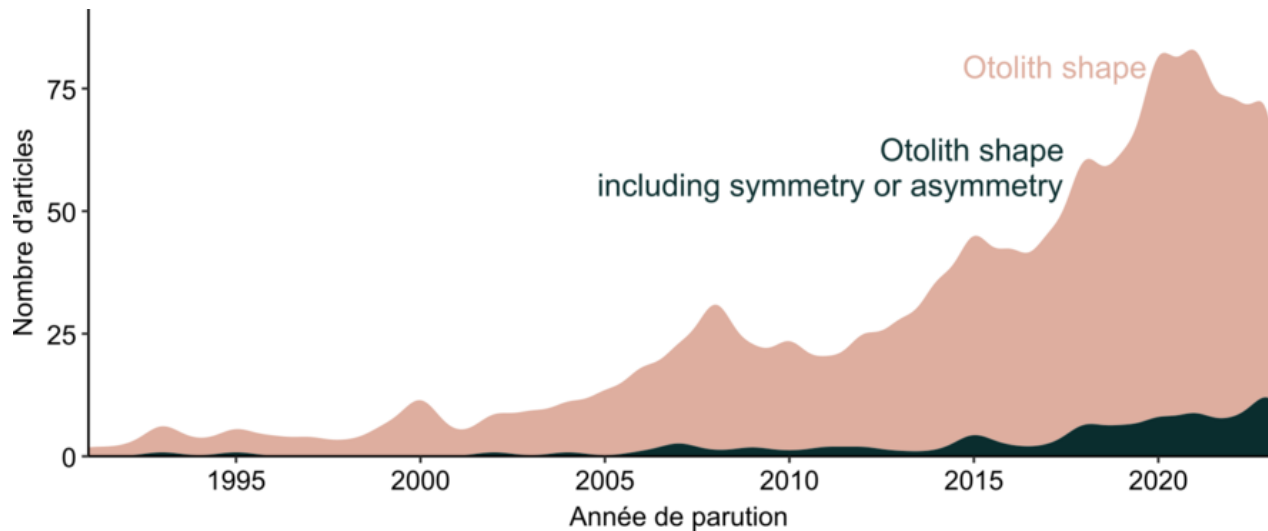


FIGURE 9 – Nombre d’articles scientifiques parus chaque année selon le type de données extraites pour analyser la forme de l’otolithe en ayant préalablement sélectionné les mots-clés « otolith shape » puis « symmetry » ou « asymmetry » (source Web of Science, juin 2024).

Comment extraire les informations de la forme de l’otolithe ?

Pour étudier la variabilité de forme des otolithes, il est crucial de décrire leur forme externe de manière quantitative. Ces variables sont mesurées à partir d’une image de l’otolithe à l’aide de logiciels ou d’algorithmes d’analyse d’images (par exemple R Momocs, BONHOMME *et al.*, 2014).

La forme de l’otolithe est généralement extraite des images bidimensionnelles (2D) (BIRD *et al.*, 1986). Selon l’espèce étudiée, des otolithes entiers, cassés et/ou sectionnés sont utilisés pour l’estimation de l’âge (VITALE *et al.*, 2019), cependant les otolithes sectionnés et cassés ne peuvent pas être utilisés pour l’analyse de forme. Pour préparer les otolithes à l’analyse, ils sont d’abord nettoyés de la matière organique à l’aide d’une éponge, de serviettes en papier, d’une brosse douce ou d’un nettoyeur ultrasonique. Pour certaines espèces (par exemple, le rouget de roche, *Mullus surmuletus*; MAHÉ *et al.*, 2013), les otolithes peuvent être brûlés pour augmenter la visibilité des incréments de croissance tels que définis par CHRISTENSEN, 1964. Selon l’échantillonnage, les images des otolithes sont prises en utilisant un seul otolithe ou les 2 otolithes gauche et droit, ce qui conduit à ces deux types différents d’images d’otolithes dans les bases de données d’images acquises en routine. Certaines des acquisitions ne sont pas standardisées; et parfois les otolithes sont cassés ou présentent un chevauchement entre les otolithes gauche et droit. De plus, pour la même espèce, la taille des otolithes peut être très différente et, dans plusieurs cas, divers objectifs (grossissement) sont utilisés. Trois outils différents sont utilisés pour prendre les images des otolithes : un scanner (basse résolution), une loupe binoculaire (résolution moyenne) et un microscope optique à haute résolution, qui permet la visualisation des structures de croissance (incrément de croissance) et de la forme. Avec la loupe et le microscope, des caméras aux caractéristiques techniques différentes (c’est-à-dire objectif, grossissement, capteur, résolution) peuvent être utilisées, entraînant des tailles différentes de pixels. Les images sont généralement acquises en utilisant un canal RGB (rouge-vert-bleu : RedValue + GreenValue + BlueValue), mais peuvent parfois, selon l’utilisateur, être prises en niveaux de gris. L’intensité lumineuse de l’image est également ajustée

par l'utilisateur. Toutes ces possibilités d'acquisition d'images en termes de résolution, de couleur, de grossissement, d'intensité lumineuse ou de nombre d'otolithes par image (ou d'otolithes cassés / décalcifiés) entraînent un manque de standardisation dans les images acquises en routine pour estimer l'âge des poissons. Pour toutes les méthodes d'acquisition, les utilisateurs peuvent choisir une lumière réfléchie ou transmise pour éclairer les otolithes. Un anneau annuel (c'est-à-dire un incrément de croissance annuel) est supposé se composer d'une zone opaque et d'une zone translucide (PANFILI *et al.*, 2002). En lumière réfléchie, les zones opaques des otolithes sont blanches et les zones translucides sont sombres (sur un fond noir). En lumière transmise (avec un fond blanc), c'est l'inverse : les zones opaques des otolithes sont sombres et les zones translucides sont blanches. Tout cela illustre la diversité des images d'acquises en routine. Dans ce contexte, une partie de cette thèse se concentre sur le développement d'une méthode visant à standardiser les différentes images obtenues lors des acquisitions en routine. L'objectif est de convertir ces images en données uniformisées, répondant à des critères standards de représentation (les couleurs, la résolution, l'orientation, ...). Cette standardisation est essentielle pour garantir la comparabilité et la fiabilité des analyses effectuées à partir de ces images, tout en minimisant les variations dues aux conditions techniques ou méthodologiques.

Toutefois, ces images 2D ne représentent qu'un seul plan de projection d'un objet tridimensionnel (3D). Un biais potentiel peut donc exister en raison de la position de l'objet lors de l'acquisition en 2D. D'une part, vu que l'otolithe est courbé, la forme de l'otolithe capturée en 2D peut être différente si l'inclinaison de l'otolithe n'est pas standard lors de la prise de vue (figure 10).

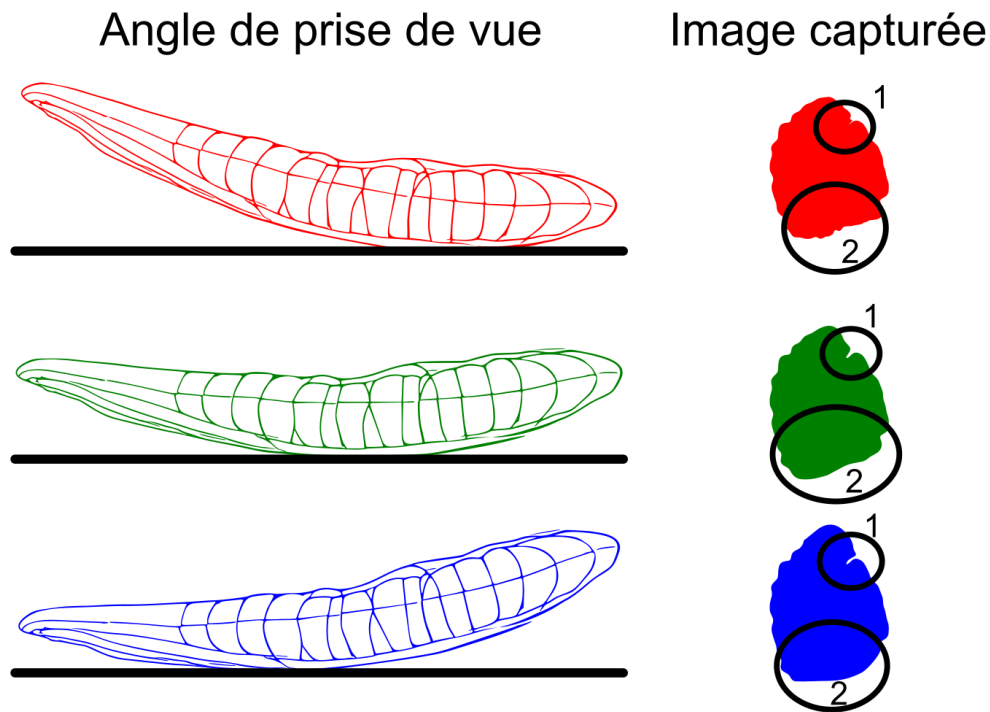


FIGURE 10 – Différentes formes de l'otolithe capturées en 2D selon les angles d'inclinaison de l'otolithe. 1 : parties entre le *rostrum* et l'*antirostrum* différentes ; 2 : parties postérieures de l'otolithe différentes.

D'autre part, la plupart des études de forme des otolithes en 2D, en particulier celles portant sur la délimitation des stocks, ne prennent pas en compte le *sulcus acusticus* dans leur projection 2D. Cette zone présente des formes relativement complexes, y compris pour les poissons plats dont les otolithes ont des formes simples. Les études antérieures sur cette structure en 2D (TORRES *et al.*, 2000; CHOLLET-VILLALPANDO *et al.*, 2019; D'IGLIO *et al.*, 2023) ne prennent pas en compte toutes les projections possibles, ce qui signifie que la forme complète ne peut pas être représentée, faussant ainsi la représentation du volume ou de la profondeur. Ces faces, non prises en compte par l'analyse de forme 2D (face proximale ou distale de l'otolithe), sont également composées d'éléments ioniques et organiques de quantité hétérogène dans l'endolymphe (figure 11). Or, une représentation de la forme 3D de l'otolithe peut permettre de capturer ces différences et d'estimer plus justement le volume et la profondeur de chaque partie.

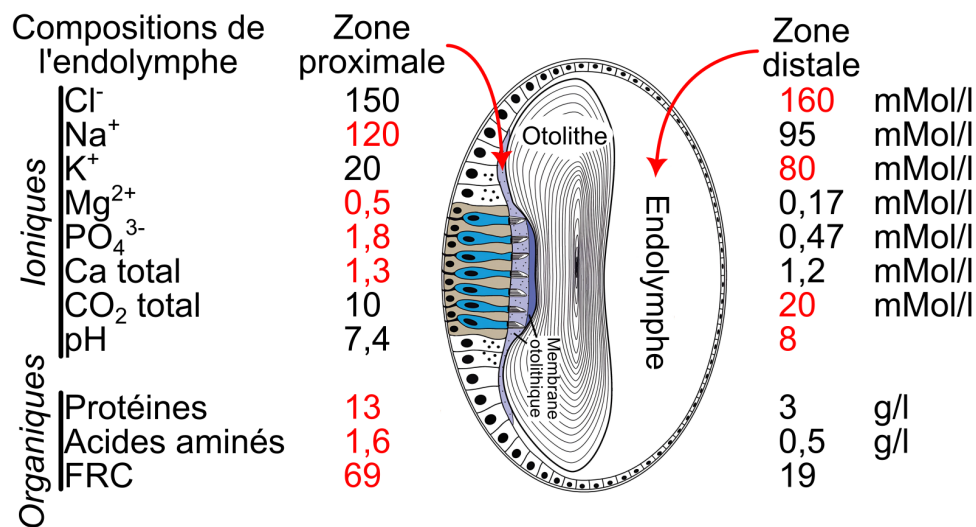


FIGURE 11 – Différence de quantité des composées ioniques et organiques des deux zones de l'endolymphe (proximale et distale). Les valeurs en rouge sont les plus élevées (données ALLEMAND *et al.*, 2007; figure modifiée de SCHULZ-MIRBACH *et al.*, 2019).

Plusieurs études antérieures ont utilisé le poids de l'otolithe comme simple estimateur de l'approximation de la forme totale (PAWSON, 1990; WORTHINGTON *et al.*, 1995; CARDINALE et ARRHENIUS, 2004; FRANCIS *et al.*, 2005), mais les otolithes peuvent avoir des formes différentes pour un poids donné. Les études sur l'otolithe 3D se sont concentrées sur les acquisitions des images et/ou l'extraction de la forme de l'otolithe en trois dimensions (ZITEK *et al.*, 2014; MAPP *et al.*, 2016; MARTI-PUIG *et al.*, 2016; VASCONCELOS-FILHO *et al.*, 2019; QUINDAZZI *et al.*, 2022), et sur la compréhension du rôle fonctionnel et de l'évolution de l'oreille interne et de l'otolithe avec les effets sonores (SCHULZ-MIRBACH *et al.*, 2018; SCHULZ-MIRBACH *et al.*, 2019; SCHULZ-MIRBACH *et al.*, 2020; WEI et MCCAULEY, 2022). Ces analyses de l'otolithe en 3D se sont développées qu'à partir de 2010 et ne représentent qu'une infime partie dans le domaine de l'analyse de forme de l'otolithe (figure 12).

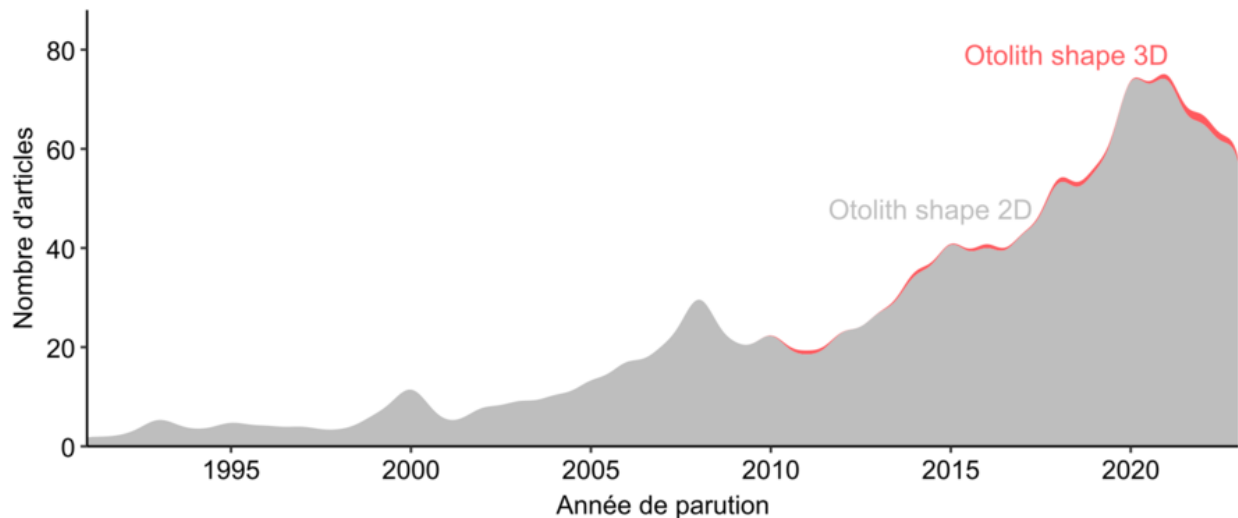


FIGURE 12 – Nombre d’articles scientifiques parus chaque année selon le type de données extraites pour analyser la forme de l’otolithe en ayant préalablement sélectionné les mots-clés « otolith shape » puis « 3D » (source Web of Science, état en juin 2024).

Cette thèse se distingue par une approche originale pour analyser la morphologie tridimensionnelle des otolithes. Les techniques avancées d’imagerie 3D, souvent utilisées en neurosciences, sont combinées à des méthodes d’analyse quantitatives récentes. L’objectif est de caractériser avec précision la diversité et la variabilité des formes. Cette stratégie permettra de mieux comprendre les différences intra et interspécifiques et d’identifier des indices subtils liés à des facteurs écologiques et fonctionnels. En explorant des dimensions encore peu étudiées, cette recherche représente une avancée importante dans la compréhension globale des otolithes et des facteurs influençant leur forme.

Dans le cadre de cette thèse, la microtomographie a été choisie comme méthode principale pour l’analyse tridimensionnelle des otolithes. La microtomographie est une technique non destructive qui utilise des rayons X pour obtenir des images en coupe d’un objet. Ces images sont ensuite combinées pour reconstruire une structure 3D détaillée. Comme le montre le tableau 1, cette méthode se distingue par une résolution interne excellente et permet une analyse non invasive, ce qui en fait un outil de choix pour l’étude des otolithes. L’un des principaux atouts de la microtomographie est sa haute résolution interne, qui peut atteindre l’échelle du micromètre. Cela permet d’observer avec précision les caractéristiques interne et externes de l’objet scanné, comme leur microstructure et leur contours complexe. De plus, contrairement à d’autres méthodes nécessitant des préparations destructives, elle préserve parfaitement l’intégrité des échantillons. Cette qualité est particulièrement précieuse lorsqu’il s’agit d’otolithes rares ou d’échantillons à forte valeur scientifique qui doivent être conservés pour des analyses futures. Par ailleurs, la microtomographie offre une visualisation tridimensionnelle complète des otolithes. Ces structures, souvent marquées par des sillons et des courbures ne peuvent pas être correctement évaluées à l’aide de méthodes bidimensionnelles. Grâce à la reconstruction 3D, il est possible d’obtenir une représentation fidèle de leur forme, tout

en facilitant des analyses morphométriques détaillées. Cette capacité est essentielle pour mieux comprendre les processus de croissance des otolithes et les variations liées à leur environnement.

TABLE 1 – Comparaison des méthodes de capture 3D et leurs caractéristiques

Méthode	Fonctionnement	Avantages	Prix (€)
Tomographie	Rayons X pour des images en coupe, combinées en 3D	Résolution interne excellente, non destructif (<i>in vivo</i>)	100 000 – 1 million+
Imagerie par IRM	Champs magnétiques et ondes radio pour l'imagerie 3D	Pas de radiation, idéal pour les tissus mous	150 000 – 2 millions+
Scanner 3D laser	Mesure les distances avec un faisceau laser	Portable pour certain modèle	10 000 – 100 000+
Scanners à lumière structurée	Projette un motif lumineux et capture les déformations	Rapide	5 000 – 50 000
Photogrammétrie	Utilise plusieurs photos pour reconstruire la 3D	Coût faible, nécessite juste un appareil photo	<5000 (matériel photo + logiciel)
LiDAR	Envoie des impulsions lumineuses et mesure le retour	Couvre de grandes surfaces	20 000 – 200 000+

Les images radiographiques, permettant de reconstruire des objets 3D comme des otolithes, sont acquises à l'aide d'un microtomographe à rayons X (Micro-CT ou μ CT). Cette technologie est une avancée dans le domaine de l'analyse de l'otolithe et elle est de plus en plus utilisée dans les études morphométriques et biologiques. La microtomographie à rayons X consiste à capturer des images bidimensionnelles (radiographies) des otolithes sous différents angles, couvrant une rotation complète de 180° ou 360°. Ce processus permet de reconstruire en trois dimensions la structure externe de l'otolithe avec une grande précision. La Micro-CT fonctionne sur le principe de l'atténuation différentielle des rayons X, qui varie en fonction de la densité du matériau traversé. En effet, les tissus plus denses, comme les otolithes, atténuent davantage les rayons X que l'air ou les tissus moins denses, ce qui se traduit par une échelle de valeurs de gris dans les images obtenues.

Il existe deux grands types de données qu'il est possible d'extraire avec la forme des otolithes : les données univariées et les données multivariées.

Les données univariées reposent sur des paramètres morphologiques simples ou des descripteurs tels que la longueur (mesurée comme le plus grand axe de l'otolithe), la largeur (le plus grand axe perpendiculaire à la longueur), l'aire, le périmètre et l'épaisseur. Les indices de forme est l'une des méthodes qui permet de caractériser l'otolithe par une forme géométrique simple et donc moins dépendants de la taille de l'otolithe par rapport aux données univariées de base. Par exemple, les otolithes peuvent être décrits comme des cercles, donnant l'indice de circularité, des rectangles

avec l'indice de rectangularité, ou des ellipses avec l'indice d'ellipticité. Ces indices de forme, construits à partir des mêmes paramètres morphologiques, peuvent être redondants (MÉRIGOT *et al.*, 2007; MAHÉ, 2019). Toutefois, ces méthodes demeurent des descripteurs simples de la forme des otolithes, mais elles restent très utilisées dans la littérature (figure 13).

Les méthodes multivariées sont les plus couramment utilisées pour identifier les stocks (CADRIN *et al.*, 2014; MAHÉ, 2019; ICES, 2024). Ces méthodes permettent une description plus complète et précise de la forme des otolithes. Les méthodes multivariées pour décrire la forme des otolithes sont les transformations en ondelettes (Wavelet transform) (PARISI-BARADAD *et al.*, 2005; TUSET *et al.*, 2014; LIBUNGAN *et al.*, 2015; SAYGIN, 2024), la morphométrie géométrique basée sur les points homologues ou semi-homologues (MONTEIRO *et al.*, 2005; PONTON, 2006; VIGNON, 2012; TUSET *et al.*, 2016; IBÁÑEZ *et al.*, 2017; AFANASYEV *et al.*, 2017), et l'analyse des Descripteurs Elliptiques de Fourier (en anglais EFDs) (GAULDIE et CRAMPTON, 2002; GAGLIANO et MCCORMICK, 2004; GALLEY *et al.*, 2006; MILLE *et al.*, 2015; AFANASYEV *et al.*, 2017; MAHÉ, 2019) (figure 13).

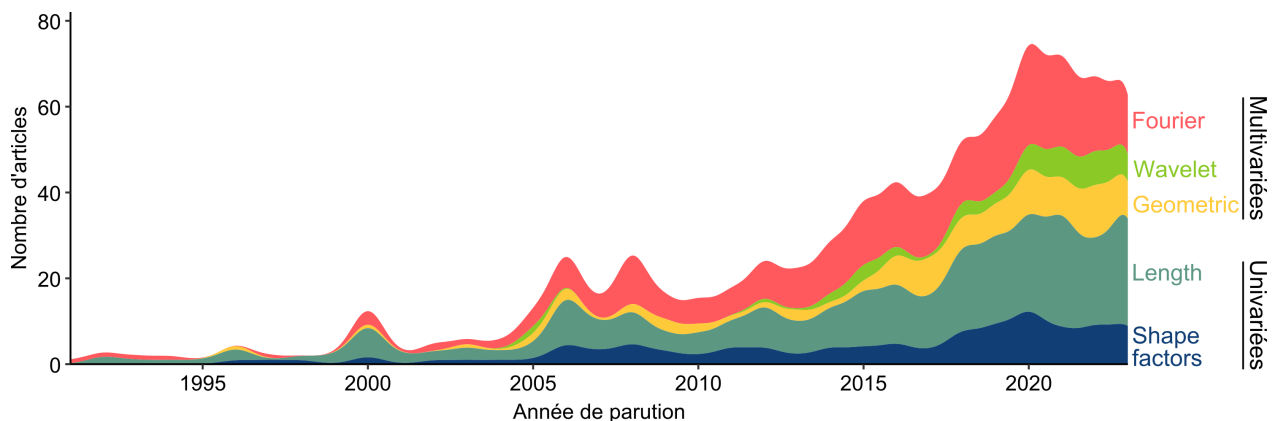


FIGURE 13 – Nombre d'articles scientifiques parus chaque année selon différents mots-clés après avoir préalablement sélectionné le mot-clé « otolith shape » puis les différentes méthodes d'analyse de la forme des otolithes (source Web of Science, état juin 2024).

La méthode la plus utilisée est celle à partir des descripteurs EFDs (figure 13), qui permet de décrire le contour fermé de n'importe quel objet en utilisant des ellipses. Ces descripteurs fournissent une représentation plus complète de la forme, rendant possible une analyse plus précise et détaillée des variations morphologiques dans des contextes biologiques et écologiques. Elle permet d'identifier précisément les zones où se situent les différences moyennes entre les groupes d'individus, en fournissant une vue détaillée des variations morphologiques (BOOKSTEIN, 1992). Les variations de la forme ont été étudiées à l'échelle individuelle afin d'examiner les sources de variations de la forme au sein des populations (intra-populationnelle) et entre individus (inter-individuelle), ainsi que les variations au sein même d'un individu, telle que l'asymétrie entre les 2 oreilles internes (ZELDITCH *et al.*, 2004; KLINGENBERG, 2015).

Le contour de l'otolithe est projeté dans un repère orthonormé en deux dimensions. Cette projection est décrite par des fonctions paramétriques $x(t)$ et $y(t)$ (figure 14), qui peuvent être approximées par une somme de fonctions trigonométriques, ou harmoniques, correspondant à des ellipses (KUHLE et GIARDINA, 1982) :

$$\begin{cases} x(t) = \frac{A_0}{2} + \sum_{i=1}^m (A_i \times \cos(i\omega t) + B_i \times \sin(i\omega t)) \\ y(t) = \frac{C_0}{2} + \sum_{i=1}^m (C_i \times \cos(i\omega t) + D_i \times \sin(i\omega t)) \end{cases}$$

Chaque harmonique est caractérisée par 4 descripteurs de Fourier (A_i, B_i, C_i, D_i), m est le nombre total d'harmoniques utilisées pour approximer $x(t)$ et $y(t)$. $t \in [0, T]$ est la distance de l'arc le long du contour mesurée à partir d'un point de départ arbitraire jusqu'au point considéré. T correspond au périmètre du contour fermé (approximation par le polygone équivalent) et est la période des fonctions $x(t)$ et $y(t)$, ce qui permet de définir la longueur d'onde $\omega = 2\pi/T$. La standardisation de ces descripteurs de Fourier par rapport à la première harmonique rend les descripteurs invariants par rapport à la taille et à l'orientation de l'otolithe ainsi qu'au point de départ choisi pour la projection du contour. Les EFDs sont particulièrement puissants pour décrire les variations de forme sur l'ensemble du contour des otolithes et permettent une reconstruction précise des formes à partir d'un nombre limité d'harmoniques.

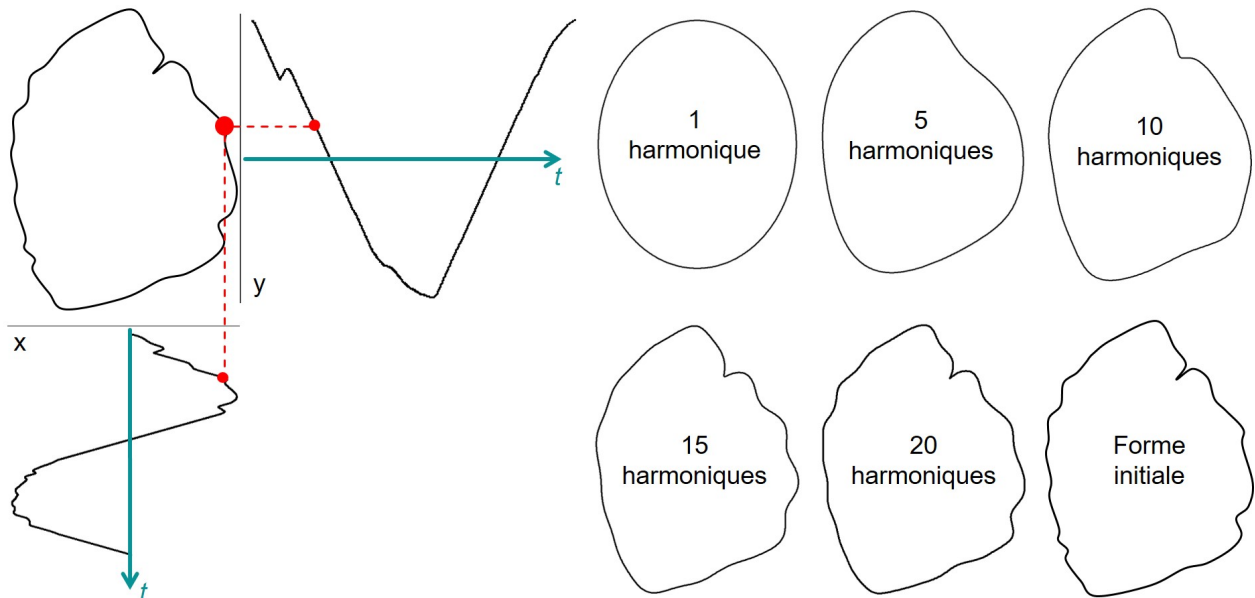


FIGURE 14 – Principe des descripteurs elliptiques de Fourier selon l'évolution du nombre d'harmoniques utilisées pour reconstruire la forme initiale.

Comment traiter les informations de la forme de l'otolithe ?

À partir de l'extraction des descripteurs de forme, la seconde étape est de partitionner ou classer les données selon les informations disponibles. Ainsi, des analyses de classification supervisée et/ou non supervisée peuvent être appliquées :

- La classification supervisée est une méthode d'apprentissage automatique où un modèle est entraîné à partir d'un ensemble de données étiquetées. Le modèle apprend à prédire l'étiquette correcte pour de nouvelles données en utilisant ces exemples étiquetés.

- La classification non supervisée, souvent appelée clustering, est une méthode d'apprentissage automatique où le modèle apprend à partir d'un ensemble de données non étiquetées. Le but est de découvrir des regroupements ou des découpages des données, sans connaissances préalables sur les étiquettes de classe ni même sur leur nombre à considérer.

Dans le document, le terme classification concerne uniquement des données étiquetées, le cas échéant le terme clustering pour de la classification non supervisée.

En 2D, l'analyse en Composantes Principales (ACP) est principalement utilisée comme étape de prétraitement pour la réduction du nombre de dimensions sans perte de variation (CADRIN *et al.*, 2014; ICES, 2024). Les approches non supervisées comprennent le regroupement hiérarchique (ZHUANG *et al.*, 2015) et le regroupement par délimitation sphériques K-means (LI *et al.*, 2021), tandis que les méthodes supervisées comprennent l'analyse discriminante linéaire (LDA) (CAÑÁS *et al.*, 2012), l'analyse discriminante quadratique (QDA) (BIOLÉ *et al.*, 2019), les forêts aléatoires (ZHANG *et al.*, 2016), les machines à vecteurs de support (SVM) (TUSET *et al.*, 2021) et, récemment, certains réseaux neuronaux profonds pour l'estimation de l'âge (BENSON *et al.*, 2023).

Au fil des années, il y a une nette augmentation de l'utilisation des techniques de machine learning (apprentissage automatique) dans les publications scientifiques, surtout après 2015 (figure 15B). La classification supervisée est la méthode la plus utilisée, comparativement au clustering, classification non-supervisée (figure 15A). Les réseaux de neurones, notamment les réseaux profonds dit Deep Learning, et les forêts aléatoires montrent un développement important, reflet de leur efficacité et de leur adoption croissante dans le domaine de l'intelligence artificielle. Les principes, les avantages et les inconvénients des différentes méthodes utilisées pour analyser la forme des otolithes sont résumés dans le tableau 2.

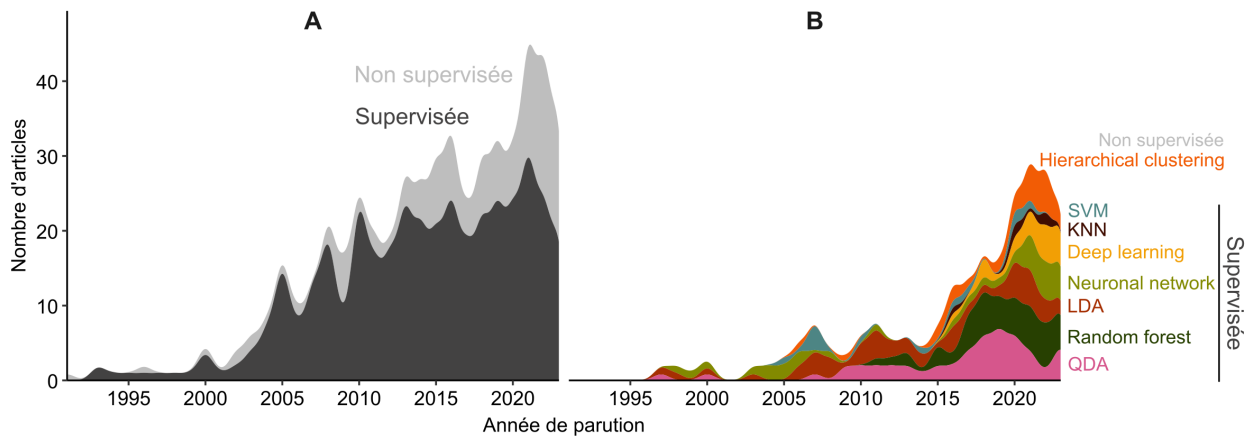


FIGURE 15 – Nombre d'articles scientifiques parus chaque année selon différents mots-clés après avoir préalablement sélectionné le mot-clé « otolith shape » puis les différentes méthodes de classifications ou de modélisations ; A : les principales familles de méthodes ; B : les méthodes les plus utilisées (source Web of Science, état juin 2024).

TABLE 2 – Récapitulatif des méthodes de machine learning principalement utilisées dans les analyses de forme de l’otolithe. Le mot outlier désigne une donnée très éloignée de la distribution globale voire aberrante.

Méthode	Principe	Avantages	Inconvénients
Réseaux profonds ou Deep Learning	Réseaux de neurones artificiels avec plusieurs couches profondes.	Capacité à modéliser des relations complexes et abstraites; performances élevées sur un grand nombre de données.	Exige une grande quantité de données et de ressources de calcul; difficile à interpréter.
Réseau neuronal ou Neural Network	Réseaux de neurones artificiels avec quelques couches seulement.	Flexible et capable de résoudre une grande variété de problèmes.	Sensible aux hyperparamètres; tendance à surapprendre sans régularisation appropriée.
K plus proche voisin (KNN)	Classification basée sur la proximité des données à des données dites de référence.	Simple à comprendre et à implémenter; pas de phase d’apprentissage complexe.	Lent avec de grands ensembles de données; sensible à la dimensionnalité, sensible à la base de référence.
Forêt aléatoire (RF)	Ensemble d’arbres de décision entraînés sur des sous-échantillons des données.	Réduction du surapprentissage; robuste aux bruits et aux données manquantes.	Moins interprétable que des arbres de décision individuels; peut être lent sur de grands ensembles de données.
LDA (analyse discriminante linéaire)	Trouver une combinaison linéaire de caractéristiques qui sépare le mieux les classes.	Performant pour des distributions gaussiennes; interprétation facile.	Hypothèse de distribution normale peut être restrictive; sensible aux outliers.
QDA (analyse discriminante quadratique)	Extension de LDA, permettant des frontières de décisions quadratiques.	Plus flexible que LDA pour modéliser des relations complexes.	Nécessite plus de données pour estimer correctement les paramètres; sensible aux outliers.
SVM (machines à vecteurs de support)	Trouver l’hyperplan qui maximise la marge entre les classes.	Efficace dans des espaces de haute dimension; bien adapté pour les cas non linéaires avec des noyaux.	Difficile à interpréter; coûteux en termes de calcul et de mémoire pour des grands ensembles de données.
Classification hiérarchique	Regroupement de données en formant une hiérarchie de clusters imbriqués.	N’exige pas de spécifier le nombre de clusters à l’avance; visualisation facile avec dendrogrammes.	Sensible au choix de la mesure de distance; peut être lent pour de grande quantité de données.

Dans cette thèse, l'un des objectifs principaux est de comparer plusieurs méthodes de classification et de clustering afin d'optimiser la reconnaissance et la classification des formes des otolithes en 2D ou en 3D. Cette démarche vise à identifier les techniques les plus performantes pour distinguer les variations morphologiques des otolithes, qu'elles soient liées aux stocks de poissons ou aux différentes espèces. En exploitant des approches d'analyse 2D et 3D, cette étude permettra d'évaluer la pertinence des algorithmes appliqués à des données issues d'imagerie 3D. L'objectif final est de proposer une méthode robuste et automatisée pour améliorer la précision des classifications, facilitant ainsi l'identification des populations et contribuant aux études d'écologie des espèces.

Objectifs de la thèse

La forme de l'otolithe chez les poissons est influencée par plusieurs facteurs, tels que l'environnement, la génétique, l'ontogénie et l'effet côté de l'oreille interne. La collecte de données sur la forme des otolithes commence généralement par la capture d'images. Cependant, la plupart des processus d'imageries utilisés sont routiniers et non standardisés, ce qui peut affecter la qualité et la comparabilité des données recueillies. Jusqu'à présent, il existe relativement peu de recherches publiées qui explorent l'utilisation d'images 3D pour l'étude des otolithes. Ces images tridimensionnelles pourraient offrir une représentation plus complète et précise de la forme de l'otolithe, permettant une analyse détaillée des caractéristiques morphologiques qui peuvent être occultées dans les approches bidimensionnelles traditionnelles. Parmi les méthodes utilisées pour analyser la forme des otolithes à partir de ces images, l'analyse des descripteurs elliptiques de Fourier se distingue comme l'approche multivariée la plus couramment employée en 2D. Cette technique mathématique transforme la forme de l'otolithe en une série de coefficients qui capturent les nuances de sa géométrie. Ces coefficients de Fourier servent ensuite de base pour des techniques de classification supervisée ou de clustering non-supervisée. Ces méthodes de traitement de données permettent de regrouper ou de classifier les otolithes selon des critères spécifiques, tels que l'espèce (au niveau interspécifique) ou le stock de poissons (au niveau intra-spécifique), en se basant uniquement sur la forme de l'otolithe.

Cette thèse s'organise en 4 chapitres pour d'une part proposer de structurer et de standardiser les images 2D et 3D des otolithes ; d'explorer les méthodes de classifications non supervisées et supervisées de la forme des otolithes ; et d'autre part explorer l'apport de l'analyse de la forme de l'otolithe en 3D ; tout cela pour mieux identifier les stocks et les espèces de poissons (figure 16).

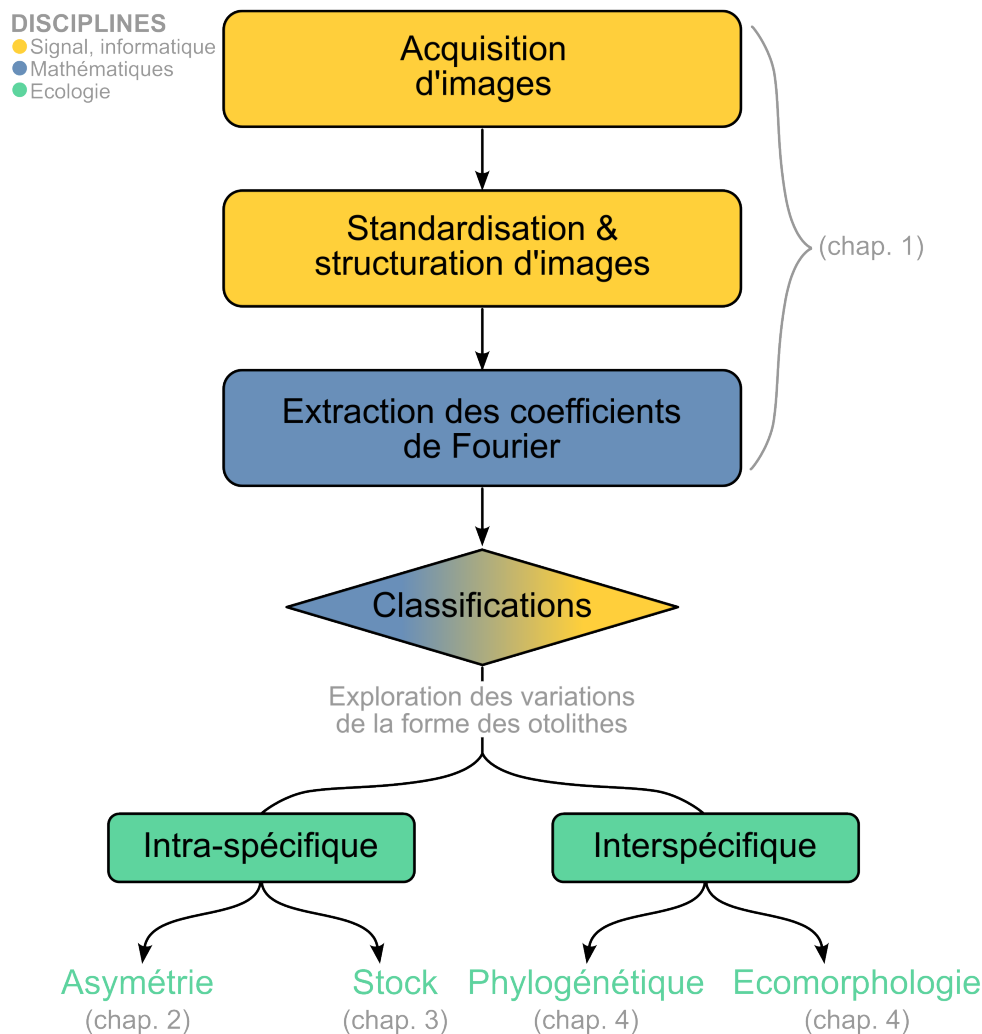


FIGURE 16 – Structure générale de la thèse avec les disciplines appliquées (signal informatique, mathématique et écologie).

Différentes études ont été menées pour répondre aux questions suivantes :

- Chapitre 1 : Comment standardiser et extraire les informations de la forme des otolithes à partir de leurs images en 2D et 3D pour assurer une analyse précise et reproductible ? Ce premier chapitre a pour objectif de généraliser et de rendre publique les méthodes et codes utilisés pour la standardisation des images d'otolithes. L'objectif est de garantir la qualité, la comparabilité et l'accessibilité des données pour des recherches futures. Pour analyser précisément la forme des otolithes, il est crucial que les images initiales soient comparables entre elles (en termes de taille, de rotation, de couleur et/ou de nombre de points ou de polygones). Pour les images 2D, des tests ont été effectués sur trois espèces différentes (plie, *Pleuronectes platessa*, le rouget barbet de roche, *Mullus surmuletus* et la morue, *Gadus morhua*) en utilisant des images capturées avec diverses sortes d'appareils, d'objectifs et de conditions d'éclairage. Les otolithes ont subi différents types de préparation (entiers, découpés, brûlés) et les images proviennent de deux laboratoires différents. En ce

qui concerne les images 3D, les études d'acquisition et de standardisation se sont d'abord concentrées sur une autre espèce, le rouget barbet de vase (*Mullus barbatus*), puis ont été étendues à 22 autres espèces, comme détaillé dans le chapitre 4.

- Chapitre 2 : Comment l'asymétrie de l'oreille interne (gauche versus droite), influence-t-elle la forme des otolithes ? Ce chapitre se focalise sur le rouget barbet de vase (*Mullus barbatus*) en mer Méditerranée avec une comparaison entre les analyses en 2D et en 3D pour mesurer si la précision de ces 2 approches est comparable.
- Chapitre 3 : Comment les variations morphologiques des otolithes au sein d'une même espèce sont-elles influencées par des facteurs environnementaux (variation de la forme de l'otolithe en intraspécifique) ? Dans ce chapitre, l'accent est mis sur les variations morphologiques des otolithes au sein d'une même espèce sous l'influence de facteurs environnementaux à micro-échelle spatiale sur 9 espèces tropicales démersales de l'île de La Réunion et à macro-échelle spatiale en mer Méditerranée, en comparant là aussi le 3D et le 2D pour évaluer les stocks et leurs limites. Un focus méthodologique a aussi été réalisé en testant plusieurs méthodes de classification supervisée et non supervisée.
- Chapitre 4 : Quels sont les potentiels des variations de forme des otolithes en 3D pour distinguer les espèces de poissons et comprendre leur écologie et écomorphologie⁴ (variation de la forme de l'otolithe en interspécifique) ? Ce chapitre explore le potentiel des variations de forme des otolithes en 3D et analyse comment la morphologie en 3D des otolithes peut informer sur la trajectoire de vie des poissons, leur position dans la colonne d'eau et les adaptations à leur habitat respectif, en examinant les variations interspécifiques. L'étude vise également à utiliser la forme des otolithes pour la classification taxonomique et écologique des poissons.

Présentation des cas d'études

Pour répondre aux objectifs et chaque question des différents chapitres, plusieurs espèces présentes dans des écosystèmes variés ont été choisies (figure 17).

Au premier chapitre, l'attention s'est portée sur trois espèces : la plie (*Pleuronectes platessa*), le rouget barbet de roche (*Mullus surmuletus*) et la morue (*Gadus morhua*). Ces espèces ont été choisies en raison des méthodes distinctes de préparation de leurs otolithes pour l'estimation de l'âge. Par exemple, les otolithes de la plie sont utilisés entièrement et sans traitement préalable, tandis que ceux du rouget barbet de roche sont brûlés et ceux de la morue sont coupés transversalement (VITALE *et al.*, 2019). Ces différences dans le traitement préliminaire sont cruciales pour tester l'efficacité des méthodes de standardisation.

Le rouget barbet de vase (*Mullus barbatus*) a été choisi dans des analyses réalisées dans les chapitres 2 et 3 (figure 17).

C'est un poisson démersal vivant dans des environnements assez larges allant de l'Est Atlantique à Dakar, Sénégal, les îles Canaries et la Méditerranée (BEN-TUVIA, 1990). Les études se sont concentrées exclusivement sur la Méditerranée, une mer qui couvre une superficie d'environ 2,5

4. L'écomorphologie ou morphologie écologique est l'étude de la relation entre le rôle écologique d'un individu et ses adaptations morphologiques.

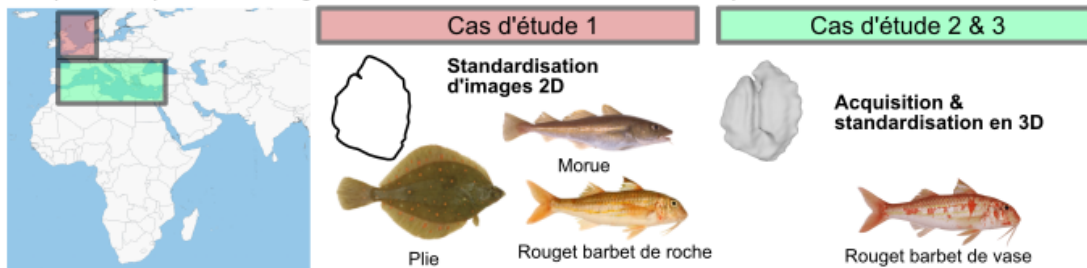
millions de km² et qui abrite quelque 17 000 espèces marines (par exemple, sur les mers Ligurienne et les mers Tyrrhénienne, 684 espèces de poissons ont été recensées en 2010, PSOMADAKIS *et al.*, 2012). Cette biodiversité s'explique par la diversité des habitats, des vastes herbiers de posidonies et des récifs coralliens aux zones rocheuses côtières et aux profondeurs abyssales. La Méditerranée est divisée en deux bassins, occidental et oriental, par des hauts-fonds entre la Sicile et la Tunisie. L'étude du rouget barbet de vase dans cette région riche et complexe pourrait révéler des variations intra-spécifiques de la forme de l'otolithe influencées par l'environnement. Le rouget barbet de vase constitue un modèle particulièrement pertinent pour les analyses de la forme des otolithes en raison de plusieurs facteurs biologiques, écologiques et méthodologiques. Cette espèce, d'importance commerciale et culinaire, joue un rôle clé dans les écosystèmes benthiques des zones côtières méditerranéennes et atlantiques, tout en étant sensible aux variations environnementales comme la température, la salinité ou la profondeur. Les otolithes du rouget barbet de vase reflètent ces conditions de manière significative, offrant ainsi une opportunité précieuse pour relier leur morphologie aux habitats et aux facteurs écologiques locaux. Par ailleurs, la large distribution géographique de cette espèce et son abondance facilitent l'échantillonnage et permettent d'étudier les variations morphologiques entre populations réparties sur des zones distinctes. De plus, la forme des otolithes chez le *Mullus barbatus* varie aussi bien à l'intérieur d'une même population qu'entre différentes zones géographiques, ce qui en fait un excellent cas pour analyser la structuration des stocks et l'impact des barrières environnementales. Les otolithes du rouget barbet de vase présentent des caractéristiques morphologiques bien définies, avec une forme fusiforme souvent marquée, idéale pour des analyses quantitatives basées sur des approches comme l'analyse de Fourier ou des descripteurs géométriques. En outre, leur utilisation dans des études archéologiques et paléocéologiques témoigne de leur robustesse et de leur capacité à fournir des informations sur les conditions environnementales anciennes et les relations trophiques.

Les chapitres 2 et 3 se sont concentrés sur des écosystèmes très différents avec la mer Méditerranée et autour de l'île de la Réunion (Océan Indien) (figure 17). Ces écosystèmes présentent des variations de température annuelle relativement faibles (en moyenne $\pm 10^{\circ}\text{C}$ de variation) par rapport aux régions tempérées (en moyenne $\pm 15^{\circ}\text{C}$ de variation), ce qui pourrait influencer la forme des otolithes.

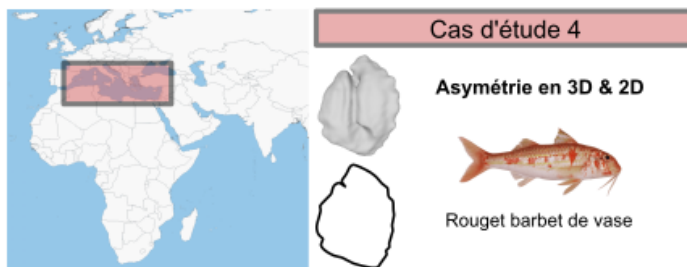
Les régions tropicales sont situées près de l'équateur, entre les tropiques du Cancer et du Capricorne. Elles connaissent généralement des températures élevées tout au long de l'année, avec peu de variations saisonnières. De plus, il est déjà difficile d'estimer l'âge des poissons tropicaux à partir de leurs otolithes (PANFILI *et al.*, 2002), ce qui rend ces études particulièrement pertinentes. Située dans le sud-ouest de l'océan Indien, La Réunion est caractérisée par une biodiversité marine exceptionnelle et un contexte environnemental unique, marqué par des gradients écologiques abrupts, notamment en termes de profondeur, de température et de substrats benthiques. Ces conditions variées influencent directement les habitats des espèces démersales, offrant une opportunité rare d'étudier comment des facteurs environnementaux locaux façonnent la morphologie des otolithes. Les poissons démersaux, occupant une zone de transition entre les habitats benthiques et pélagiques, sont particulièrement sensibles à ces variations, ce qui fait de leurs otolithes de précieux indicateurs des conditions environnementales locales. De plus, La Réunion, en tant qu'île océanique isolée, offre un cadre idéal pour explorer la structuration des populations de poissons démersaux. L'isolement géographique favorise des phénomènes de différenciation populationnelle

et d'endémisme, qui peuvent se refléter dans les otolithes à travers des variations morphologiques. Par ailleurs, la zone constitue un carrefour biogéographique unique, où se mélangent des influences indo-pacifiques et australes, permettant d'explorer des dynamiques écologiques et évolutives complexes. Les otolithes des espèces démersales offrent donc un moyen de documenter ces processus tout en étudiant les réponses des populations aux éventuelles barrières hydrographiques ou environnementales notamment la présence des récifs coralliens. Des études antérieures ont déjà testé l'appartenance de poissons à des stocks issus de milieux récifaux (VIGNON *et al.*, 2008 ; VIGNON et MORAT, 2010). Cependant, ces recherches n'ont pas encore été menées dans le contexte spécifique de l'île de la Réunion. Dans cette thèse, cette question sera explorée pour la première fois dans cette région. L'objectif est d'appliquer les méthodes existantes à un environnement encore peu étudié afin d'évaluer leur pertinence et d'obtenir des données inédites sur les stocks de poissons associés aux récifs de l'île. Cela permettra de combler des lacunes scientifiques et d'apporter des informations nouvelles sur les dynamiques des populations de poissons démersaux dans l'océan Indien. De plus, la pêche artisanale et commerciale ciblant les espèces démersales autour de La Réunion revêt également une grande importance socio-économique, rendant crucial le suivi des stocks de ces poissons. L'analyse de la forme des otolithes peut fournir des outils non invasifs et efficaces pour évaluer la structuration des populations, la connectivité des stocks et l'influence des pressions anthropiques, comme la surpêche ou les changements climatiques.

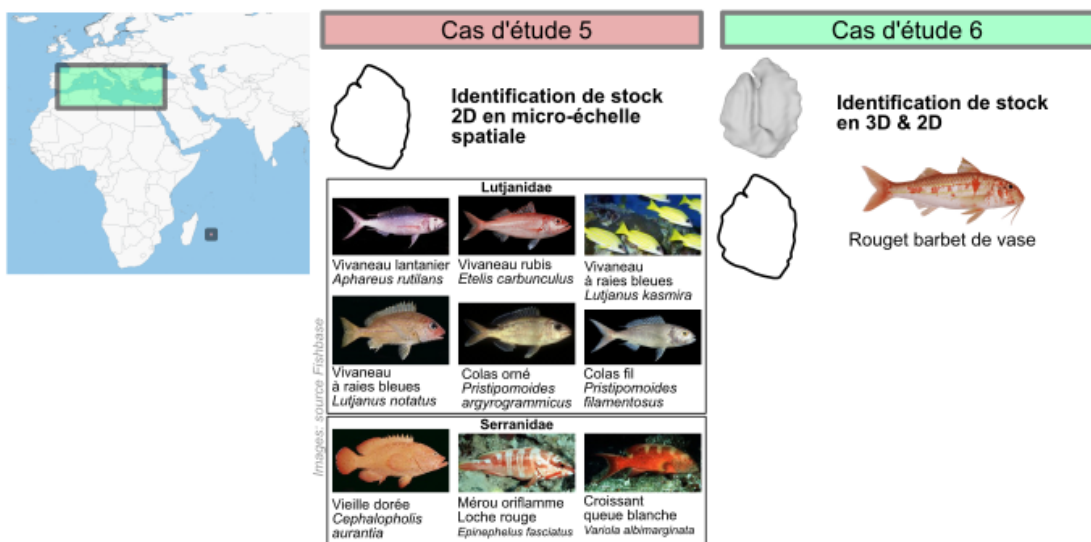
Chap. 1 - Acquisition d'images, standardisation & extraction descripteur de Fourier



Chap. 2 - Effet confondant sur la forme de l'otolithe : Asymétrie



Chap. 3 - Effet intra-spécifique sur la forme de l'otolithe: Identification de stock



Chap. 4 - Effet interspécifique sur la forme de l'otolithe

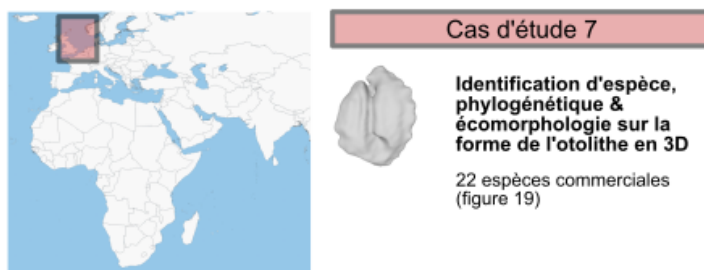


FIGURE 17 – Panorama des différents chapitres et cas d'études réalisés dans la thèse.

Pour le chapitre 4, l'analyse cible les variations entre espèces (variation interspécifique) de la forme de l'otolithe. 22 espèces de poissons de la Manche et du sud de la Mer du Nord ont été étudiées. Elles sont bien réparties dans l'arbre phylogénétique des principales espèces capturées dans cette région et donc elles représentent bien la diversité des formes en fonction de la phylogénie⁵ (figure 18). De plus, ces espèces présentent une très grande variété de formes de l'otolithe (figure 19).

5. La phylogénie ou arbre évolutif ou arbre de parenté est une branche de la biologie qui étudie les relations évolutives entre différentes espèces ou groupes d'organismes (montre comment les espèces descendent d'ancêtres communs).

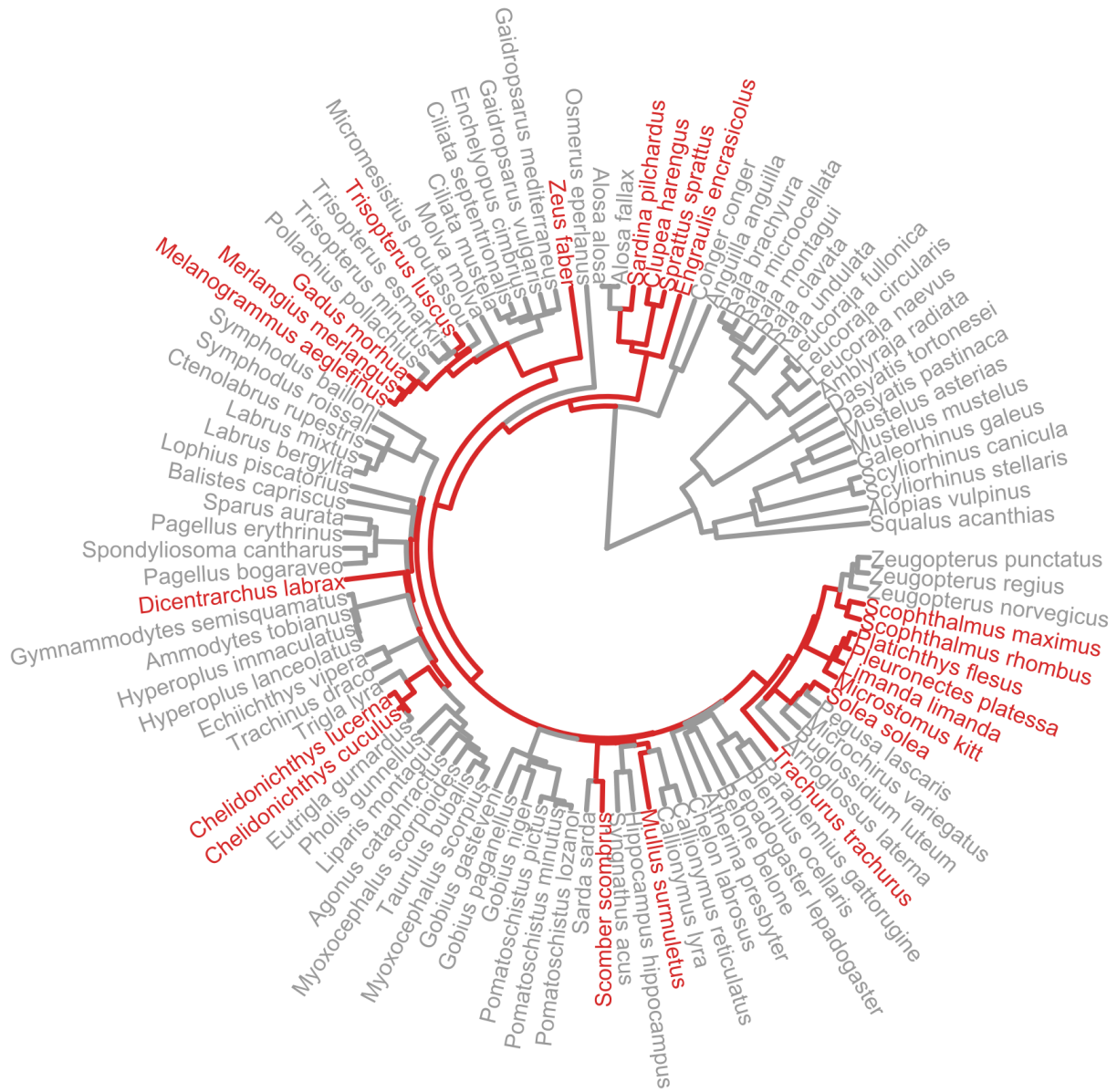


FIGURE 18 – Diversité des 22 espèces étudiées en interspécifique dans le chapitre 4 (en rouge) sur l’arbre phylogénétique des espèces capturées en Manche – Sud Mer du Nord par la campagne scientifique IBTS (International Bottom Trawl Survey).



FIGURE 19 – 22 espèces étudiées dans le chapitre 4 avec la forme de leurs otolithes.

Chapitre 1 Structuration des données : Standardisation des images 2D et 3D

1.1 Introduction du chapitre 1

La gestion durable des ressources halieutiques repose en grande partie sur des estimations d'âge des poissons, lesquelles permettent d'établir des modèles d'évolution des populations et d'orienter les stratégies de pêche (HILBORN et WALTERS, 2013 ; CADRIN et DICKEY-COLLAS, 2015). Parmi les diverses pièces calcifiées utilisées pour cette estimation d'âge, les otolithes occupent une place centrale, en raison de leur inertie métabolique et de leur capacité à enregistrer des informations de croissance tout au long de la vie du poisson (CASSELMAN, 1987). Chaque année, plus d'un million d'otolithes sont ainsi prélevés pour des analyses dans le monde, dont environ 35 000 en France, afin de fournir des données essentielles pour les évaluations de stocks de diverses espèces commerciales (CAMPANA et THORROLD, 2001 ; ICES, 2011). Toutefois, les images des otolithes pour détermination l'âge et la croissance ne sont réalisées avec différents matériels d'imagerie et selon différents protocoles. De ce fait, la standardisation de ces images reste un défi majeur, en particulier pour les utiliser dans le but d'extraire la forme des otolithes (FISHER et HUNTER, 2018).

Historiquement, l'analyse des otolithes s'est concentrée sur des images en deux dimensions (2D), facilitant des approches comme la mesure des anneaux de croissance et la description de contours externes. Cependant, ces méthodes peuvent introduire des biais en raison de la diversité des équipements utilisés, des protocoles d'acquisition variés et des positions parfois non standardisées des otolithes lors de la capture des images (MAHÉ, 2019). Le présent chapitre vise à pallier ces disparités en proposant des méthodes rigoureuses de standardisation des images 2D, ainsi qu'en explorant la possibilité d'élargir cette standardisation aux données tridimensionnelles (3D), plus récentes, pour une description morphologique plus fine et sans distorsion géométrique.

La première question abordée est de savoir comment transformer les images 2D, qui sont souvent hétérogènes, en un ensemble d'images standardisées pour permettre une analyse précise des formes (PANFILI *et al.*, 2002). Cela implique de déterminer les biais qui influencent la qualité des images en fonction de l'appareil utilisé (microscopes, loupes, scanners) et des protocoles appliqués. Une fois ces biais identifiés, l'objectif est de développer un outil automatique permettant la transformation de ces images en un format normalisé, facilitant ainsi l'analyse comparative des formes.

En parallèle, le développement très récent des techniques de reconstruction 3D, en particulier par tomographie (micro-CT scan), offre la possibilité d'acquérir des données sur la structure volumétrique complète des otolithes. Cette dimension 3D permet d'examiner la complexité morphologique des otolithes sous de nouveaux angles, révélant des caractéristiques asymétriques ou des variations fines induites par les facteurs environnementaux qui influencent leur croissance (MAHÉ *et al.*, 2021). Toutefois, la question demeure de savoir comment obtenir des images 3D standardisées et comparables avec les images 2D pour garantir une cohérence dans les analyses futures entre les 2 types de données (2D et 3D).

L'essor des méthodes d'analyse de forme, allant des indices morphométriques aux descripteurs de Fourier ou aux méthodes géométriques basées sur des landmarks (LIBUNGAN et PÁLSSON, 2015), a également permis de développer d'autres applications des images d'otolithes pour des études de discrimination de stocks (au sein d'une espèce) et d'identification des espèces (CADRIN *et al.*, 2014). En effet, l'étude des formes externes et des caractéristiques morphologiques des otolithes fournit des indicateurs puissants pour la différenciation des populations géographiques et l'étude des régimes alimentaires des prédateurs de poissons (NEVES *et al.*, 2011 ; MAHÉ, 2019). La mise à disposition de bases de données standardisées en 2D et 3D vise ainsi à faciliter ces analyses, à en réduire le coût et à accroître la fiabilité des résultats.

L'analyse des formes d'otolithes en 3D, bien que récente, ouvre la voie à des recherches sur la morphogenèse et l'asymétrie bilatérale chez les poissons. Des études récentes ont montré que l'asymétrie observée entre les otolithes gauche et droit chez certaines espèces de poissons plats, par exemple, pourrait être liée à des facteurs génétiques, environnementaux ou stochastiques (MILLE, 2015 ; PALMER, 2016). Dans ce contexte, la standardisation des images 3D devient indispensable pour réaliser des comparaisons sans biais entre les otolithes d'un même individu ou entre différentes populations.

Enfin, cette démarche de structuration des données d'otolithes trouve un appui essentiel dans les outils logiciels actuels, tels que Smartdots pour l'estimation de l'âge et ImageJ pour le traitement d'images, ainsi que dans l'utilisation de bases de données de formes pour des analyses de plus grande envergure impliquant de l'intelligence artificielle (ICES, 2020). En permettant une comparaison plus aisée et précise des formes d'otolithes à travers des protocoles de standardisation, ce chapitre contribue à une meilleure compréhension de la variabilité morphologique liée aux facteurs biologiques et environnementaux, essentielle pour la gestion durable des stocks halieutiques.

Ce chapitre pose les bases méthodologiques nécessaires à la constitution de bases de données d'images d'otolithes standardisées en 2D et en 3D (figure 1.1). En répondant aux questions de standardisation, de transformation automatique des images et de comparabilité entre dimensions. Il met en place les fondements pour des analyses morphologiques robustes et homogènes, intégrant ainsi des données précieuses pour la science halieutique et l'écologie des poissons.

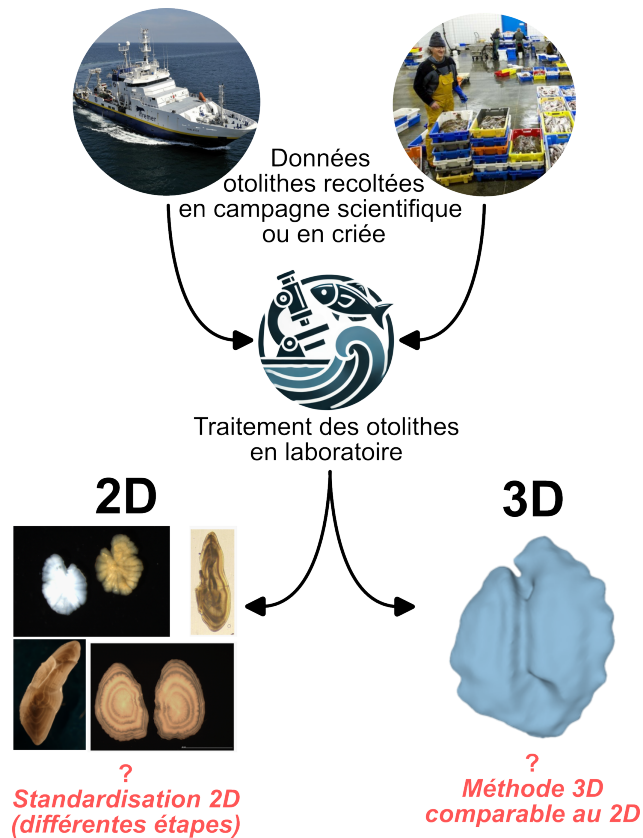


FIGURE 1.1 – Problématiques du chapitre 1. Collecte des otolithes réalisée lors de campagnes en mer et en criée, suivie d’une analyse des otolithes pour estimer l’âge des poissons de différentes manières. Une méthode de standardisation des images 2D est nécessaire, impliquant plusieurs étapes jusqu’à l’extraction des informations de la forme. La méthode 3D cherche à offrir une alternative comparable en termes de standardisation et de précision à celle du 2D.

1.2 Méthode automatique de transformation des images d'otolithes de routine en une base de données standardisée d'otolithes avec R

L'article suivant décrit l'ensemble du protocole de standardisation des images 2D, il a été publié la revue Cybium.

Automatic method to transform routine otolith images for a standardized otolith database using R

by

Nicolas ANDRIALOVANIRINA* (1, 2), Alizée HACHE (1), Kélig MAHÉ (1), Sébastien COUETTE (3) & Émilie POISSON CAILLAULT (2)



© SFI
Submitted: 18 Mar. 2022
Accepted: 14 Oct. 2022
Editors: E. Dufour, O. Otero

Key words

Otoliths
Image processing
Standardization
Rotation
Shape analysis
Binarization

Abstract. – Fisheries management is generally based on age structure models. Thus, fish ageing data are collected by experts who analyze and interpret calcified structures (scales, vertebrae, fin rays, otoliths, etc.) according to a visual process. The otolith, in the inner ear of the fish, is the most commonly used calcified structure because it is metabolically inert and historically one of the first proxies developed. It contains information throughout the whole life of the fish and provides age structure data for stock assessments of all commercial species. The traditional human reading method to determine age is very time-consuming. Automated image analysis can be a low-cost alternative method, however, the first step is the transformation of routinely taken otolith images into standardized images within a database to apply machine learning techniques on the ageing data. Otolith shape, resulting from the synthesis of genetic heritage and environmental effects, is a useful tool to identify stock units, therefore a database of standardized images could be used for this aim. Using the routinely measured otolith data of plaice (*Pleuronectes platessa* Linnaeus, 1758) and striped red mullet (*Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758) in the eastern English Channel and north-east Arctic cod (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758), a greyscale images matrix was generated from the raw images in different formats. Contour detection was then applied to identify broken otoliths, the orientation of each otolith, and the number of otoliths per image. To finalize this standardization process, all images were resized and binarized. Several mathematical morphology tools were developed from these new images to align and to orient the images, placing the otoliths in the same layout for each image. For this study, we used three databases from two different laboratories using three species (cod, plaice and striped red mullet). This method was approved to these three species and could be applied for others species for age determination and stock identification.

Résumé. – Méthode automatique de transformation des images d'otolithes acquises en routine pour une base de données d'otolithes standardisés en utilisant R.

La gestion des pêches est généralement basée sur des modèles structurés en âge. De ce fait, les données sur l'âge des poissons sont collectées par des experts qui analysent et interprètent des pièces calcifiées (écailles, vertèbres, rayons de nageoires, otolithes, etc.). L'otolithe, située dans l'oreille interne du poisson, est la principale pièce calcifiée utilisée, car elle est la seule métaboliquement inerte et est historiquement l'une des premiers proxys de données développées. L'otolithe contient également toutes les informations de l'histoire de vie du poisson et fournit des données d'âge pour toutes les évaluations de stocks des espèces commerciales. Cette méthode traditionnelle d'estimation de l'âge par un processus d'interprétation réalisée par un scientifique expert est donc très chronophage. L'analyse d'images peut être une méthode alternative peu coûteuse. Cependant, la première étape consiste à transformer les images d'otolithes prises en routine en images standardisées au sein d'une base de données afin d'appliquer des techniques d'apprentissage automatique sur les images. La forme des otolithes, résultant de la synthèse du patrimoine génétique et des effets de l'environnement, est un outil utile pour identifier les populations, une base de données d'images standardisées pourrait donc être également utilisée pour cela. À partir des données d'otolithes de plie (*Pleuronectes platessa* Linnaeus, 1758) et de rouget barbet de roche (*Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758) en Manche Orientale ainsi que de la morue du nord-est de l'Arctique (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758), un protocole de standardisation des données a été proposé. Toutes les étapes méthodologiques ont été développées sous un environnement R. Une matrice d'images en niveaux de gris a été générée à partir des images brutes dans différents formats. La détection des contours a été appliquée pour identifier les otolithes cassés, l'orientation de chaque otolithe et le nombre d'otolithes par image. Pour finaliser ce processus de standardisation, toutes les images ont été redimensionnées et binéarisées. Plusieurs outils mathématiques de morphologie ont été appliqués pour aligner et orienter les images, en plaçant les otolithes dans la même disposition pour chaque image. Pour cette étude, nous avons utilisé trois bases de données de deux laboratoires différents sur trois espèces (la morue, la plie et le rouget barbet de roche). Cette méthode a été approuvée sur ces trois espèces différentes et pourra être utilisée sur de multiples espèces pour la détermination de l'âge et l'identification des stocks.

(1) Ifremer, Laboratoire Ressources Halieutiques, 150 quai Gambetta, BP 699, 62321 Boulogne-sur-Mer, France. nicolas.andrialovanirina@ifremer.fr, a.hch@laposte.net, kelig.kahe@ifremer.fr

(2) LISIC, Université Littoral Côte d'Opale (ULCO), 62228 Calais, France. emilie.caillault@univ-littoral.fr

(3) Ecole Pratique des Hautes Etudes, PSL, Paris & UMR Biogéosciences, université de Bourgogne, 21000 Dijon, France. sebastien.couette@ephe.psl.eu

* Corresponding author

INTRODUCTION

Fisheries management is generally based on an age structure model (Hilborn and Walters, 2013; Cadrin and Dickey-Collas, 2015). Fish ageing is therefore an essential biological tool, providing data for sustainable management of fish resources. In routine analysis, the age data is determined by several experienced readers who observe the surface of calcified structures (scales, vertebrae, fin rays, otoliths, etc.) showing seasonal zones (alternating opaque and translucent rings) in fishes (Panfili *et al.*, 2002). Among these calcified structures, the otoliths, located in the vestibular system of the inner ear, are the most commonly used calcified structure for age estimation in fish (Fossum *et al.*, 2000). They are metabolically inert (*i.e.* they can neither be altered nor generally resorbed, and they grow throughout the life of the fish; Casselman, 1987). Otoliths are also historically one of the first proxies developed; being easy to sample, store and process, age estimation using otoliths has been carried out since Reibisch (1899). These are all of the reasons why otoliths are the most commonly used calcified structures for ageing (Casselman, 1987; Campana and Thorrold, 2001). Campana and Thorrold (2001) estimated that nearly 800,000 otoliths were used worldwide each year to determine the age structures of commercial fish species, representing a cost of around 8 million Canadian dollars. In Europe, fisheries management relies on data collected, managed, and supplied by countries under the Data Collection Framework, which was first put into place in 2000. Under this framework, the member states are required to annually collect a number of calcified structures, and in 2010 22 countries analyzed 759,403 calcified structures (ICES, 2011). Each year, nearly one million otoliths are collected worldwide, including 35,000 in France, to provide age structure data for stock assessments of commercial species.

The traditional and most common use of otoliths is for age and growth determination, the internal structure of otoliths showing different growth increments with periodicity from a day to a year (*i.e.* daily, seasonal, and annual growth cycles) depending on the observed life stage (Panfili *et al.*, 2002). There are also other uses of an otolith, in particular for microchemistry (Hüssy *et al.*, 2021) and external shape analyses (Cadrin *et al.*, 2013; Mahé, 2019). The morphology of otoliths is used to identify species in zooarchaeological and food-web studies. Otolith outline shape depends on the fish genotype, the influence of environmental factors (biotic and abiotic) during the life of the fish, and on the stage of development. Consequently, many studies have used otolith shape as a tool for stock identification (91 papers published from 1993 to 2017 exclusively on this topic) and this continues to develop substantially (Mahé, 2019; ICES, 2020). Since 2005, however, (according to Web of Science and the Stock Identification Methods Working Group [SIMWG])

set up by the International Council for the Exploration of the Sea, ICES, see supplementary figure), there has been an increase in the number of otolith-based publications. This rise is due to two further research topics: otolith shape as a tool for stock identification, and otolith microchemistry to understand the ecology, habitat, and movement of individuals and to characterize the connectivity between different geographical areas for a studied species (*e.g.* Smith, 1992; Cardinale *et al.*, 2004; Lombarte *et al.*, 2006; Vignon *et al.*, 2008; Cadrin *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2019; Randon *et al.*, 2020; Hüssy *et al.*, 2021).

Otolith shape is species-specific, but can also show intra-specific geographic differences (L'Abée-Lund, 1988; Lombarte and Leonart, 1993; Vignon, 2012). Indeed, the otolith outline integrates both genetic determinism and the variation of environmental conditions during the life of the fish (Mahé, 2019). Species discrimination using the otolith shape is mostly done for species identification from the stomach contents of predators to reconstruct their diet and the food web. At the species level, otolith shape is used to identify the boundaries of stocks, which information is necessary for effective stock assessment to thus implement an efficient fishery management. In the majority of stock discrimination case studies, approaches based on otolith shape and/or morphometry represent the cheapest methodology, and appear as more efficient than several others (*e.g.* genetics, parasites, isotope and micro-chemical discrimination techniques) (Neves *et al.*, 2011). Many studies have combined different markers to increase the power of stock discrimination (Randon *et al.*, 2020). This explains partly the growing number of papers dealing with this subject, along with the development of methods (*i.e.* Morphometric variables, Shape indices, Elliptical Fourier Descriptors, Geometric methods from landmarks, Wavelet transform, etc.) and tools (packages in R dedicated to shape analysis (Libungan and Pálsson, 2015) or programs such as Shape (Iwata and Ukai, 2002)), to analyze otolith shape. Finally, several works have recently been published on otolith morphogenesis, and particularly on the symmetry between left and right otoliths (*e.g.* Mille, 2015; Palmer, 2016; Mahé *et al.*, 2021). For several flatfishes, left and right otoliths are asymmetric so shape analysis is used to compare the degree of asymmetry between otoliths (Mille, 2015; Delerue-Ricard *et al.*, 2019). For such shape comparisons, one otolith must be translated horizontally to compare to the second otolith of the same individual without bias. According to Palmer (2016) and Mahé *et al.* (2021), otolith asymmetry may be due to random (or stochastic) effects, genetic determinism, or environmental stress.

Since the 2000s, otolith imaging has been greatly enhanced by the development of web-based tools (*i.e.* Smart-Dots, <https://www.ices.dk/data/tools/Pages/smartdots.aspx>) to evaluate the precision of the age data during calibration exercises between experts or using the web-database to rec-

ognise species from otolith shape (Lombarte *et al.*, 2006). At the same time, solutions dedicated to otolith images processing have been developed in freeware such as ImageJ, or into dedicated software such as TNPC, which is specifically designed to estimate fish age (Mahé *et al.*, 2011). Consequently, a very large number of images acquired for routine fish ageing could be used for otolith shape studies, reducing the human cost of image acquisition and potentially increasing the number of images available for this type of study. For several species, age is obtained directly from the whole otolith, without prior preparation. This represents around 30 percent of the species studied in France (Mahé *et al.*, 2009), including a large number of flatfish, or roundfish (Vitale *et al.*, 2019). Quality and standardization levels required for ageing studies versus shape analyses are, however, not the same. An overview of two-dimensional imaging systems showed that there is also a great diversity in the methods and materials for routine acquisition, which also influences the quality of the raw images (Fisher and Hunter, 2018). For ageing data, the information is in the growth bands within the otolith, for which a full external shape is not necessary. Consequently, the objective of this paper is to describe an efficient method to transform a routinely acquired ageing database into a standardized otolith shape database to easily interpret ageing and shape analyses. We highlight available data, all steps contained in the methodological approach and, finally, we applied this protocol to a case study using the French database of plaice (*Pleuronectes platessa* Linnaeus, 1758; $n = 11,274$) in the Eastern English Channel and the southern North Sea from 2010 to 2019 and striped red mullet (*Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758; $n = 1,149$) in the Eastern English Channel. Norwegian database of cod (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758; $n = 1,055$) was also used to include northeast Arctic cod survey (Norwegian-Russian winter survey and Spawning Cod acoustic-trawl survey) (Myers *et al.*, 2020).

MATERIALS

Sampling

Age-structured models need year-round monitoring, thus samples are taken during all four annual quarters, either at sea or on land. At sea, the calcified structures are taken either on board a professional fishing vessel or during scientific surveys. On land, they are sampled in the fish market or in the scientific laboratory.

When a fish is sampled to estimate its age, both biological (species, individual size and weight, sex, sexual maturity staging, etc.) and sampling parameters (catch date and location, sampling area, gear, etc.) are identified. Accuracy of this information is directly dependent on the sampling method; for example, samples in the fishing market have many

uncertainties, especially the geographical positions, but all the necessary data are acquired with a very high degree of precision during scientific surveys. Consequently, the quality of the metadata associated with the otolith may limit its use for shape analysis, depending on the scientific question to be answered. In addition, the sampling location also has a direct influence on sample quality, as it relates to the percentage of damaged and/or dirty otoliths (Stevenson and Campana, 1992).

The final step before image acquisition is the transport and storage from the sampling location to the laboratory. Paper envelopes and micro-tubes are two main means of storage. Paper envelopes, recommended by Williams and Bedford (1974), are very practical during sampling and filing to keep calcified structures, but their use increases the percentage of broken otoliths, which can be used for ageing but are unusable for shape analysis. A last means of transport and storage, which is specifically used for small otoliths from pelagic species during scientific surveys, is a black plastic strip with cavities where the otoliths are embedded in resin (Vitale *et al.*, 2019). This last method simplifies aging acquisition on board but it reduces the quality of images due to the resin (*i.e.* poor contrast, presence of impurities or air bubbles, etc.) that is present above the otolith.

Image acquisition for ageing database

Each sagittal otolith is prepared and analyzed for age determination according to the international ageing protocol (Vitale *et al.*, 2019). Depending on the study species, whole, broken and/or sectioned otoliths are used for ageing (Vitale *et al.*, 2019), however sectioned and broken otoliths cannot be used for shape analysis.

To prepare the otoliths for analysis, they are first cleaned of organic matter using sponge, paper towels, a soft brush, or an ultrasonic cleaner. For some species (*e.g.* striped red mullet, *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758; Mahé *et al.*, 2013), otoliths can be burned to increase the visibility of growth increments as defined by Christensen (1964).

Depending on sampling, otolith images are taken using only one otolith or both left and right otoliths, leading to these two different types of otolith images in routine otolith image databases. As shown in figure 1, some of the acquisitions are non-standardized, and sometimes otoliths are broken or there is an overlap between left and right otoliths. Moreover, for the same species, the size of the otoliths can be very different and, in several cases, various magnifications are used. Three different tools are used to take the otolith images: a scanner (low resolution), a binocular dissecting microscope (medium resolution) and a high resolution microscope, which enables visualization of internal (growth increments) and outline structures (shape). With both types of microscope, cameras with different technical characteristics (*i.e.* lens, magnification, sensor, resolution) can be

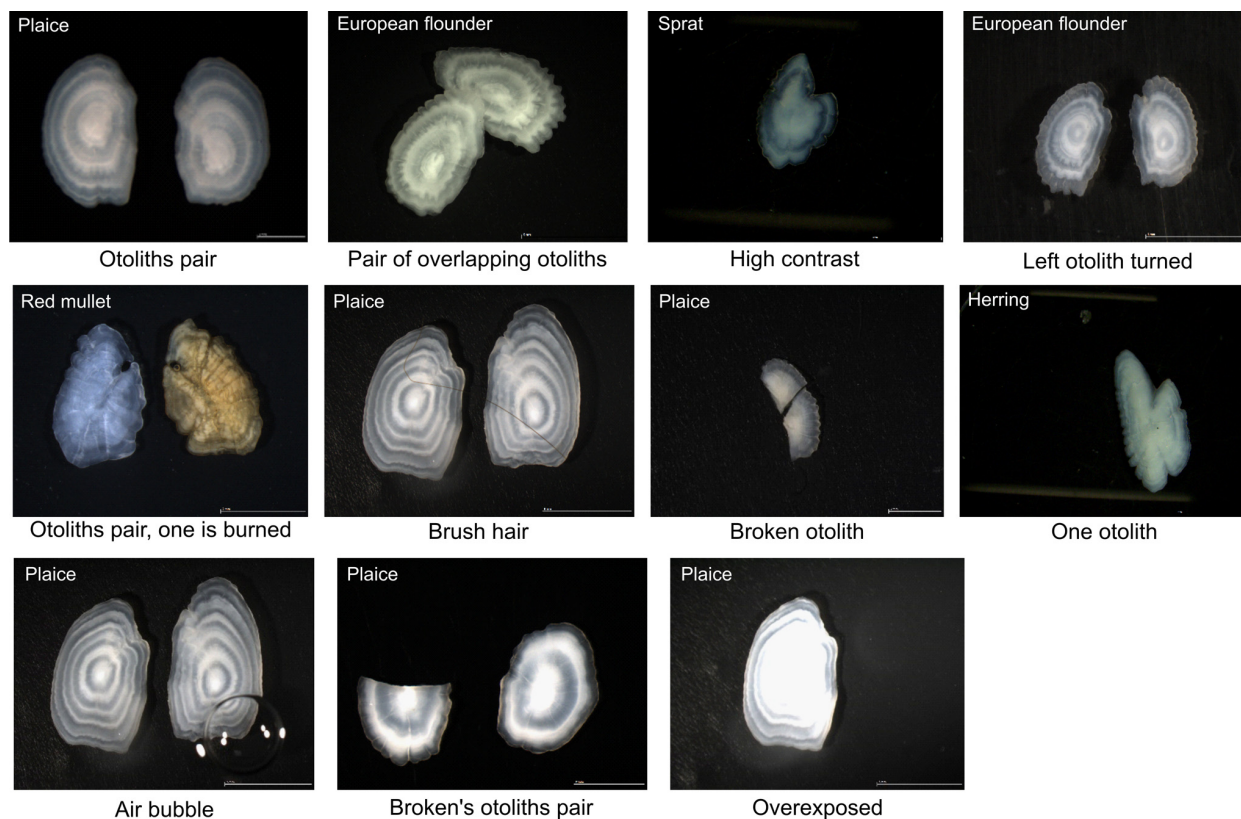


Figure 1. – Different types of otolith images showing common issues. Scale is different between images depending on the sample, some broken otoliths, various exposures and colors, some particles may be present (hair, bubbles).

used, resulting in different pixel sizes. Images are generally acquired made using an RGB (RedValue + GreenValue + BlueValue) channel, but can sometimes, depending on the reader, be taken in greyscale. Image light intensity is also adjusted by the reader. All of these possibilities for image acquisition in terms of resolution, colour, magnification, light intensity or number of otoliths per image (or broken / decalcified otoliths) lead to a lack of standardization in the routine images (Fig. 1).

For all acquisition methods, readers can choose reflected or transmitted light to illuminate the otoliths. It is assumed that one annulus (*i.e.* one annual growth increment) consists of one opaque and one translucent zone (Panfili *et al.*, 2002). Under reflected light, the opaque zones of the otoliths are white and the translucent zones are dark (on a black background). In transmitted light (with a white background), the opposite is true: the opaque zones of the otoliths are dark and the translucent zones are white (Fig. 2).

Finally, a database is created with biological parameters, images and ageing data for each fish. Table I summarises the various sources of potential differences with their respective solutions, which are described later in this paper.

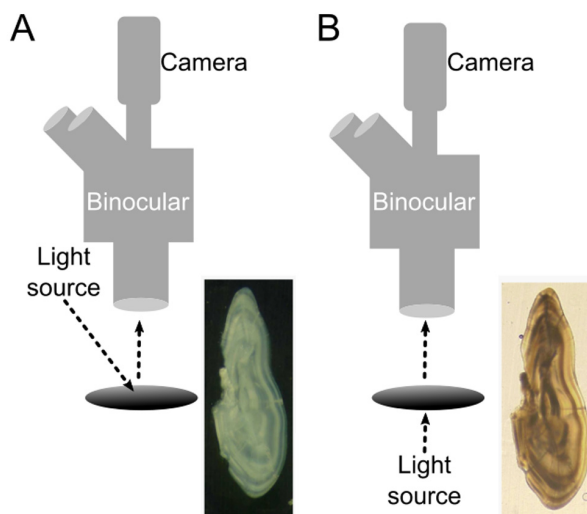


Figure 2. – Otolith images from a binocular dissecting microscope under different types of illumination: A. Reflected light and B. Transmitted light.

Data organization

The database for routine otolith processing has two com-

Table I. –Sources of differences between otolith images with proposed solutions.

Source of bias	Potential differences	Methodological steps to standardize
Otolith presentation	Whole / Broken / overlapped otoliths / pairs of otoliths / left or right otoliths	Sorting (with several groups with different characteristics)
Preparation method	Otolith in water / burnt otolith / otolith embedded in resin	Sorting (with several groups with different characteristics)
Light type	Transmitted light / Reflected light	Sorting (with several groups with different characteristics)
Acquisition system	Scanner / Binocular microscope / High-resolution microscope	1. Greyscale image / 2. Count and cut otolith image: resizing / 3. Oriented image: binarized image
Light intensity	Various exposures	1. Greyscale image / 3. Oriented image: binarized image
Contrast of image	Depends on readers and camera	1. Greyscale image / 3. Oriented image: binarized image
Colour channel	RGB / Greyscale	1. Greyscale image / 3. Oriented image: binarized image
Number of otoliths	Left otolith / Right otolith / Both otoliths	2. Count and cut otolith image: cutting and mirror effect
Magnification	From 1x to 100x	2. Count and cut otolith image: resizing
Ratio of otolith to image size	Percentage from 10 to 95 %	2. Count and cut otolith image: resizing
Image resolution	Between 658 and 1432 pixel/cm	2. Count and cut otolith image: resizing
Orientation of longest axis	Orientation from 0 to 360 degrees	3. Oriented image: main axis alignment
Format of image	jpg / png / raw / tiff	Save in single format

ponents: firstly, the images database with a name which is composed of the sampling quarter and year, the name of the reader, and the location (*i.e.* survey name or fishing port); secondly, the metadata file which includes the name of the otolith image and the metadata on the fish catch (survey/commercial sampling, date, location, vessel and gear) and species (sex, sexual maturity stage, length and weight).

METHODS

To standardize otolith images, the algorithm in R used three successive steps (Fig. 3). Before the image processing, sorting of the images was done to identify those that were unusable for the standardization process, such as the broken or overlapping otoliths. The algorithm we developed selects otoliths by greyscale and then by size. For an image with a single broken otolith our algorithm cannot detect that it is a broken otolith (therefore excluded). On the other hand, on an image with a pair of otoliths with a whole otolith and a broken one, the algorithm will be able to select only the whole otolith and not take into account the broken one.

After this pre-treatment, the standardization steps were implemented. Firstly, the otolith image was transformed into greyscale (Fig. 3; Step 1) using the *magick* package (Ooms, 2021). The transformation was done by converting the three-

channel image (*i.e.* RGB) to a single channel using the formula in equation 1 (Ooms, 2021):

$$\text{Greyscale} = (\text{RedValue} + \text{GreenValue} + \text{BlueValue}) / 3 \quad (1)$$

Step 2 of the algorithm comprises several functions to count and segment individual otoliths present in captured imagery. A basic R function “*contourLines*” with 8 levels was used to detect the otolith outlines (a greyscale or binarized image can be used). To detect whether objects are otoliths or not, a minimum area is defined. The area of each outline within the image is then calculated. This step also allows the exclusion of broken otoliths. Contours with a high area that are not included in another shape are kept and counted. Thus, the number of otoliths is deduced with the perimeter of an image. If there are two otoliths in the same image, the algorithm identifies the minimum and maximum point on the y axis (y and ymax) for the lowest and/or highest otolith; and the minimum and maximum point in x axis ($x_1, x_{1\text{max}}$; $x_2, x_{2\text{max}}$) for each otolith. The otolith image is then cut using the values of $x_1:x_{1\text{max}}$; $y:y_{\text{max}}$ for the left otolith and $x_2:x_{2\text{max}}$; $y:y_{\text{max}}$ for the right otolith. This step also resizes the image because all images are resized to the otolith proportions. In shape analysis, the otolith side has to be comparable, thus the user can apply a horizontal translation (*i.e.* mirror effect) on the otolith from one side (for this modification, the cut of the image must be reversed, from x_{max} to x).

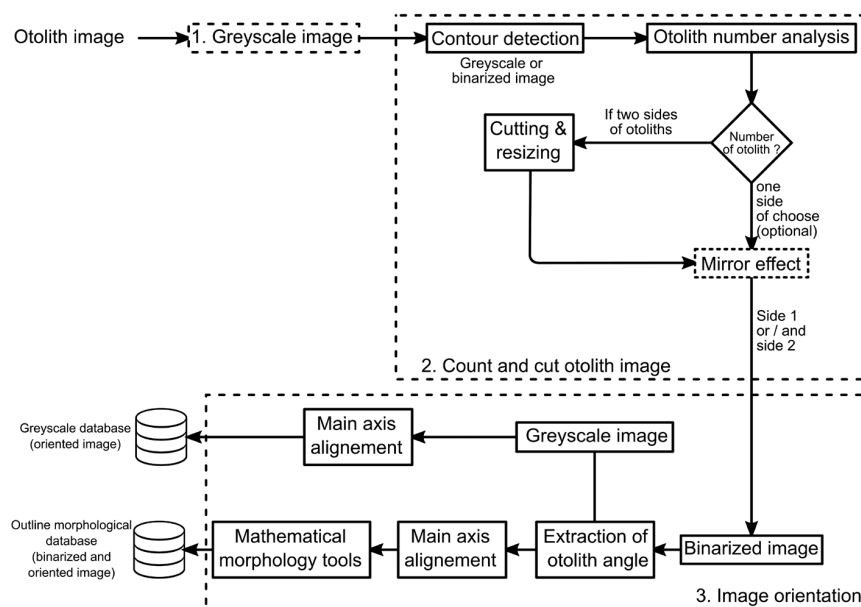


Figure 3. – Proposed processing pipeline for converting otolith images from a conventional ageing database to a standardized shape database format in the R environment (R scripts are presented in the Supplementary data).

The third step performs the otolith reorientation and the extraction of morphological information. The greyscale image is transformed into an image with binary colours (black [pixel value = 0]; white [pixel value = 1]): all pixels with a value superior to 0 are converted into 1. To correct potential conversion problems and to avoid calculation errors of morphological information: (1) smoothing is applied to the contour of the object (*i.e.* the otolith); (2) black pixels are added on the edges of the object to allow better outline detection in the future; and (3) a pixel erosion (with the help of a kernel, used depending on the shape of the otolith, *i.e.* box, disc, diamond) is applied to the image to remove white particles outside the otolith. The orientation angle of the otolith over its longest length (Θ) is then extracted using the

“computeFeatures.moment” function. Binarized and greyscale images are reoriented on the 0 axis (rotate at $[-\Theta]$) of the longest length (Fig. 4).

As the binarized image has been correctly oriented, the height of the otolith (in pixels) corresponds to the number of white pixels on the y-axis (on the highest height); the width relates to the number of white pixels on the x-axis (on the widest width); and the area of the otolith relates to the total number of white pixels on the image. Finally, an oriented, binarized image database with metadata on morphometric and resolution (in pixel/cm) information, and another with oriented greyscale images are generated. These databases have standardized images for shape analysis (using oriented, binarized images) and for age analysis (using oriented greyscale images).

All parameters in the algorithm were reported in the table II and were the same in all tested database.

The segmentation of the otolith images (accuracy of the segmentation, good or not) was checked by visualizing the results.

CASE STUDY USING PLAICE, STRIPED RED MULLET AND COD

To apply the standardization process, plaice (*Pleuronectes platessa* Linnaeus, 1758), striped red mullet (*Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758) and cod (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758) otoliths image database were processed. Data for plaice and striped red mullet were provided by Andria-

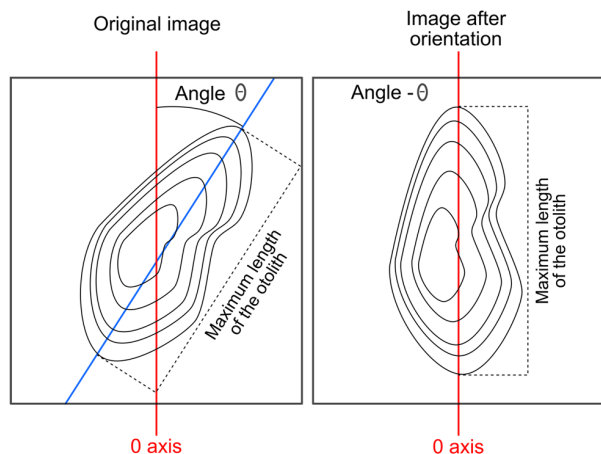


Figure 4. – Automatic otolith image orientation method.

Table II. – Optimization of all parameters of the algorithms in each function.

Functions	Parameters	Optimization	Best value
separeOto / separeOto_n1	offset	Number of pixel(s) of accepted overlap in the side of the otolith	0
separeOto / separeOto_n1	ratioArea	For the first 100 images, computes the t3 quantile of the area proportion [1-quantile(area/ image size (Lmat*Hmat), 0.75)]	0.2
separeOto_n1 / calculInfoOto	k (pixel erosion)	shapeKernel parameter requires an image size longer and larger than 60	shapeKernel(c(10,10), type="box") shapeKernel(c(5, 5), type="box")
separeOto / separeOto_n1	nlevels (contourLines)	Could be between 4-8 to accelerate computation, more than 8 improves the outline precision	8

lovanirina *et al.* (2022). Myers *et al.* (2020) supplied data for cod otolith.

In the French plaice and striped red mullet database, the images were acquired by scanner or binocular microscope using reflected light.

A total of 11,274 routinely acquired images of plaice otolith were processed to obtain 8683 standardized right otolith images (100% of these were well cut). Images could contain a right or left otolith or both. When they contained two otoliths, one could be broken and therefore not retained for

analysis. The image processing time varied between 1 and 3 seconds depending on the power of the computer used. Figure 5 shows the standardization process for an otolith image.

For striped red mullet otoliths in the processed photos included burned or unburned, left or right otoliths or both. A total of 1,149 images were standardized to get 918 standardized right otoliths (98% of these were well cut) (example in Fig. 6).

For cod, Myers *et al.* (2020) were used a transmitted light and three exposures for each otolith image (standard,

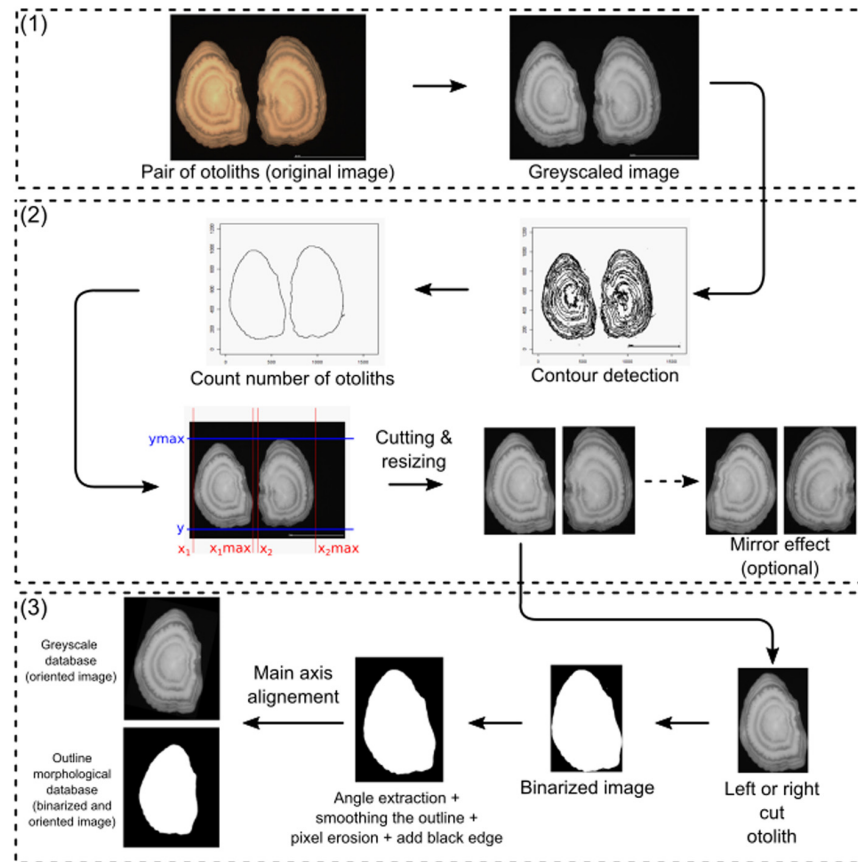


Figure 5. – Otolith image process of plaice (*Pleuronectes platessa*; Linnaeus, 1758) standardization with illustration of three main steps presented in figure 3.

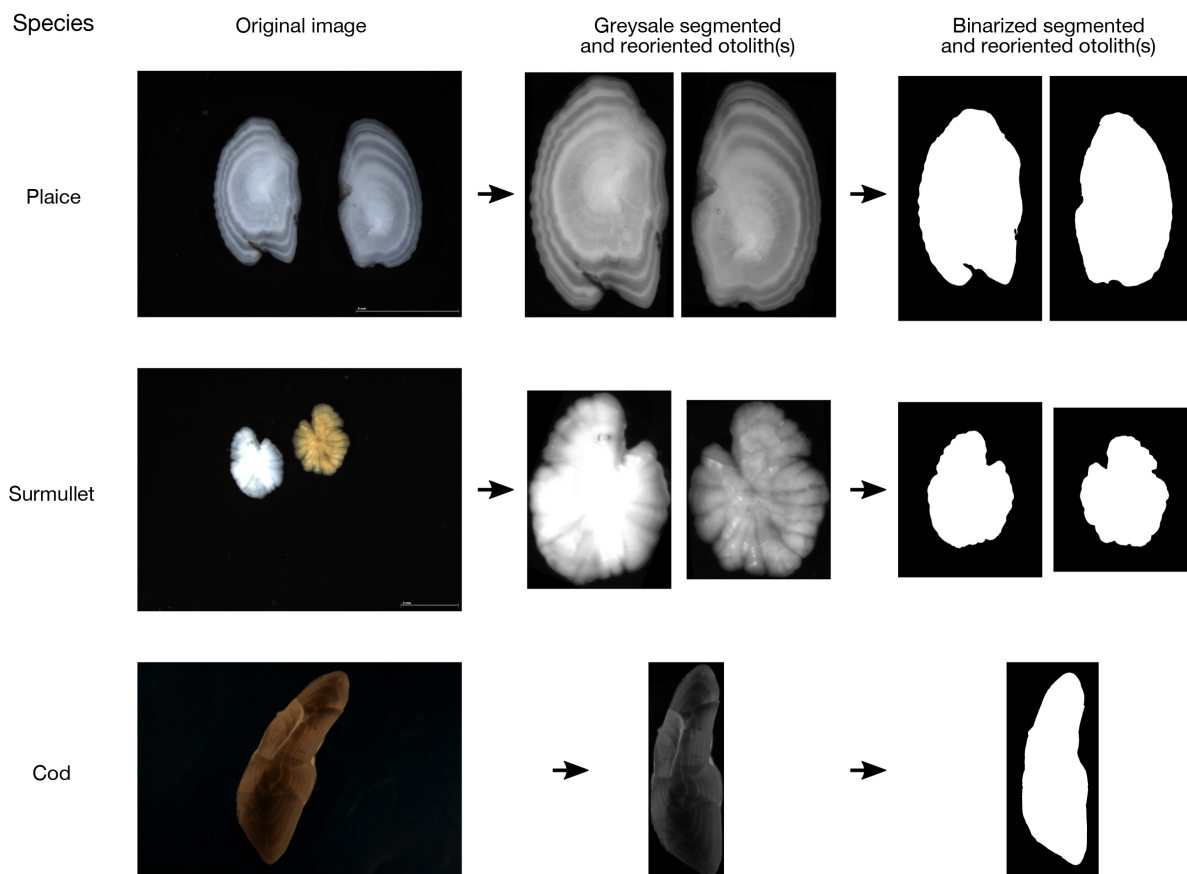


Figure 6. – Example of otolith image standardization for the three species.

decreased, and increased exposure). If the exposure was not decreased, the background was not uniform. A total of 1,055 images of cod otoliths were processed on three types of exposure (standard, increased and decreased). For each image, there was only one side of the otolith. The images with a decreased exposure were the best cut with 97% success (Fig. 6) (compared to 47% for standard exposures and 6% for increased exposures).

CONCLUDING REMARKS

The otolith is a calcified part, which is very often used to estimate the age of fish; many laboratories have thus a lot of image databases of otoliths in order to develop age structured models for stock management. However, images taken by each laboratory are not always using the same image acquisition protocol, this results in non-standardized image databases (see material). The objectives of this study were to develop a method to standardize otolith images and applying it on three species otolith images, originating from two lab-

oratories. The method was able to standardize images with different acquisition processes, two types of illumination (reflected and transmitted), various species, and with burned and unburned otoliths. It was very effective on images where there is a strong contrast between the background of the image and the otolith. On the opposite, when the background is brighter (case of standard exposure and enhanced cod otolith images) the detection of the otolith is difficult using our algorithm. In the case of an image with an illuminated background, it is then necessary to use a decreased exposure. When the otolith is darker (case of 3% of cod and 2% of unburned red mullet otolith samples), an increased exposure of the otolith could be considered.

The method takes into account the cut and orientation of the otoliths as well as the translation of one side of otolith for studies of otolith asymmetry for example. All recent research into the shape of the otolith and the process of biomineralization, taking into account potential differences between the two ears, requires the standardized images as proposed in this paper to analyse the internal or external patterns of otoliths. Several methods of classification/learn-

ing have become well-developed in recent years with the emergence of mathematical and statistical tools and, particularly, artificial intelligence (*i.e.* deep learning). This latter approach allows the development of innovative topics, such as automatic age reading, but requires a very large number of images (at least several thousand). It is therefore very important to standardize the tools used for otolith image analysis, such as our method for standardizing routinely acquired otolith images. This standardization step is essential before any automated analysis (analysis of the internal and external structures of otoliths) since routinely acquired otolith images can present several variations (see Methods), as has been discussed in several previous studies (Easey and Millner, 2008; Mahé *et al.*, 2009; Vitale *et al.*, 2019; VanderKooy *et al.*, 2020). Currently, there is a debate about the best standard image formats to use, but several methods remain in current use. Acquisition by scanner is, however, increasingly used, allowing the acquisition of multiple standardized otolith images (Gonçalves *et al.*, 2017; Moore *et al.*, 2019; Mahé *et al.*, 2021). Moore *et al.* (2019), for example, acquired otolith images using a scanner and developed a machine learning technique for the automatic ageing of fish.

Recently, otolith research on automatic methods for species identification or automatic ageing using a deep learning approach around has developed strongly (Stock *et al.*, 2021; Moen *et al.*, 2018; Ordoñez *et al.*, 2020; Politikos *et al.*, 2021; Vabø *et al.*, 2021; Benzer *et al.*, 2022). Other research domains have also shown that image standardization is an important step in computer vision or deep learning (Lee *et al.*, 2017; Folmsbee *et al.*, 2019; Misztal *et al.*, 2020). For otoliths, Fisher and Hunter (2018) and Myers *et al.* (2020) developed automation of otolith image interpretations. Our protocol, a preliminary step to automated ageing studies using a very large number of images, should facilitate access to standardized images and thus the development of these automation approaches. Our method could be standardized with one image per second from mathematical algorithms (*i.e.* machine time), which is faster than the classic method with the time of four minutes realized by an expert. In France, over 40000 images are analyzed each year in the Ifremer Center for Sclerochronology. These images could be used for other scientific purposes such as stock identification, automatic ageing, species discrimination and investigation of the potential drivers controlling otolith morphogenesis. Using our protocol, however, the preliminary choices of light sources (transmitted or reflected) and image formats during the acquisition stage make it necessary to treat these batches of images differently. Deep learning could, from a different perspective, also be used to sort images with different light sources and with various presentations of otoliths (*e.g.* broken or overlapped otoliths).

The principle of the method presented here is to standardize otolith images acquired routinely with microscopes

or scanners, but this method can be applied in other areas to standardize images with a uniform background. In fisheries science, for example, images of fish eggs acquired with a microscope could be standardized before analysis; Duan *et al.* (2019) has already developed a method to automatically segment fish eggs.

Acknowledgements. – The authors thank technicians, researchers, and students who helped with the samples, and the Sclerochronology team of IFREMER for image acquisition and ageing data. The authors would especially thank Kirsteen MacKenzie for valuable help in editing this manuscript.

The authors are also grateful for the insightful comments and recommendations offered by the anonymous peer reviewers at this manuscript. Their comments improved very well the quality of this paper.

This study was supported by the French National Research Agency (ANR-21-EXES-0011) and the Data Collection Framework (DCF; EC Reg. 199/2008, 665/2008; Decisions 2008/949/EC and 2010/93/EU). This work was supported by the Institut Français de Recherche et d'Exploitation de la Mer and the ULCO University (doctoral support to N. ANDRIALOVANIRINA, 2021-2024).

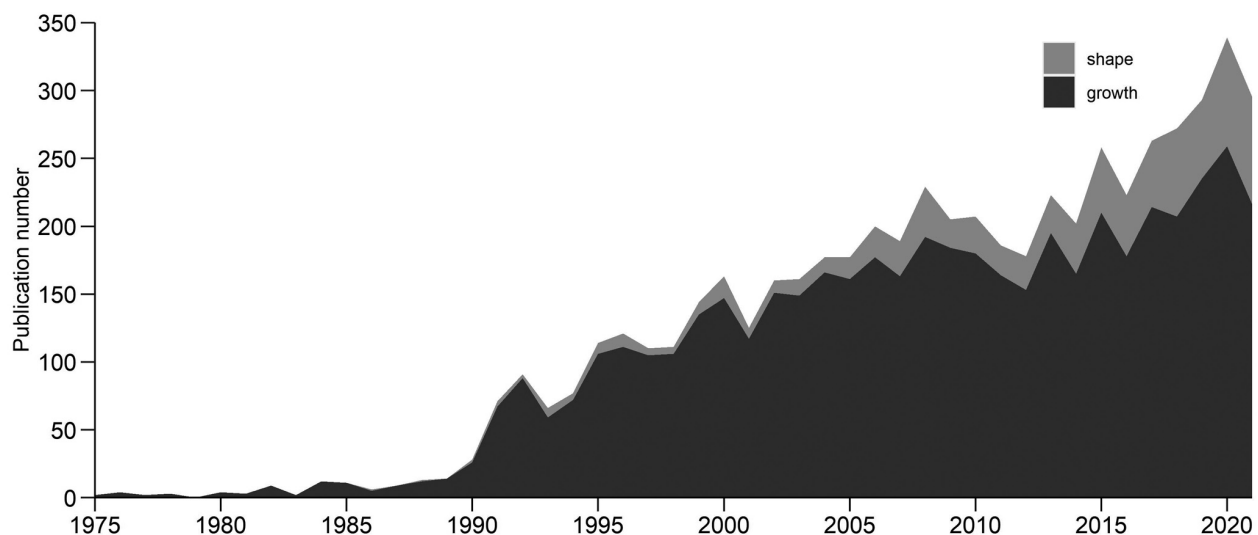
REFERENCES

- ANDRIALOVANIRINA N., HACHÉ A., MAHÉ K., COUETTE S. & POISSON CAILLAULT E., 2022. – Data applied to automatic method to transform routine otolith images for a standardized otolith database using R. SEANOË. <https://doi.org/10.17882/91023>
- BENZER S., GARABAGHI F.H., BENZER R. & MEHR H.D., 2022. – Investigation of some machine learning algorithms in fish age classification. *Fish. Res.*, 245. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2021.106151>
- CADRIN S.X. & DICKEY-COLLAS M., 2015. – Stock assessment methods for sustainable fisheries. *ICES J. Mar. Sci.*, 72: 1-6. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsu228>
- CADRIN S., KERR L. & MARIANI S., 2013. – Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science. Second Edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- CAMPANA S.E. & THORROLD S.R., 2001. – Otoliths, increments, and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 58: 30-38. <https://doi.org/10.1139/f00-177>
- CARDINALE M., DOERING-ARJES P., KASTOWSKY M. & MOSEGAARD H., 2004. – Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 61: 158-167. <https://doi.org/10.1139/f03-151>
- CASSELMAN J.M., 1987. – Determination of age and growth, *In: The Biology of Fish Growth* (Weatherley A.H. & Gill H.S., eds), pp. 209-242. New York.
- CHRISTENSEN J.M., 1964. – Burning of otoliths, a technique for age determination of soles and other fish. *ICES J. Mar. Sci.*, 29: 73-81. <https://doi.org/10.1093/icesjms/29.1.73>
- CHUNG M.T., TRUEMAN C.N., GODIKSEN J.A., HOLMSTRUP M.E. & GRØNKJÆR P., 2019. – Field metabolic rates of teleost fishes are recorded in otolith carbonate. *Comm. Biol.*, 2: 1-10. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0266-5>

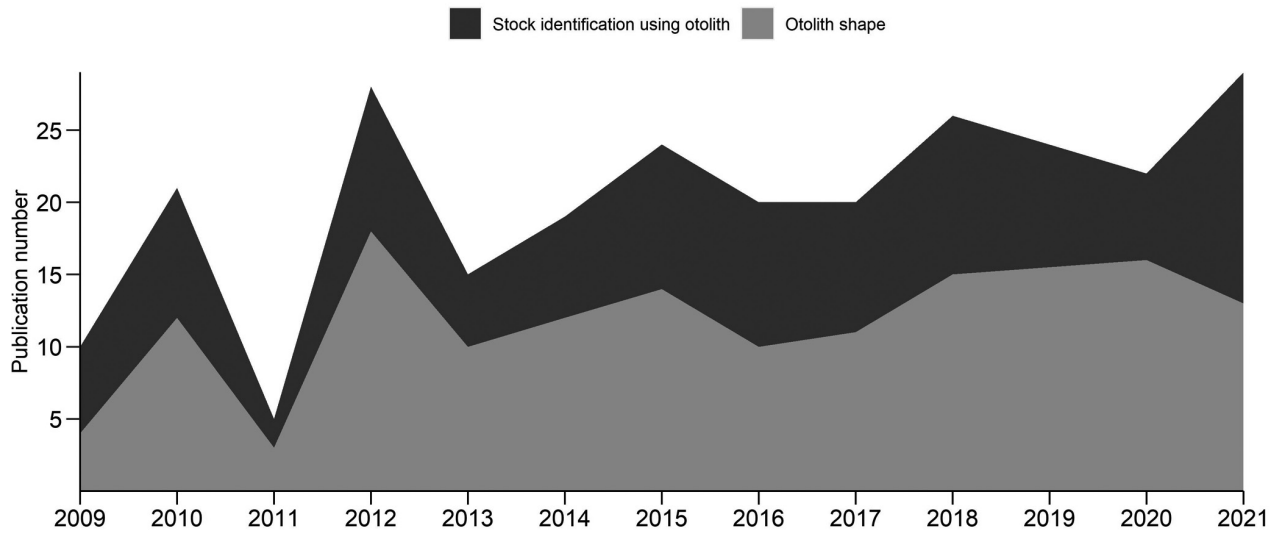
- DELERUE-RICARD S., STYNNEN H., BARBUT L., MORAT F., MAHÉ K., HABLÜTZEL, P.I., HOSTENS K. & VOLCK-AERT F.A.M., 2019. – Size-effect, asymmetry, and small-scale spatial variation in otolith shape of juvenile sole in the Southern North Sea. *Hydrobiologia*, 845: 95-108. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-018-3736-3>
- DUAN Y., LI D., STIEN L.H., FU Z., WRIGHT D.W. & GAO Y., 2019. – Automatic segmentation method for live fish eggs microscopic image analysis. *Aquacult. Eng.*, 85: 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2019.01.004>
- EASEY M.W. & MILLNER R.S., 2008. – Improved methods for the preparation and staining of thin sections of fish otoliths for age determination. *Sci. Ser. Tech. Rep.* 143, 16.
- FISHER M. & HUNTER E., 2018. – Digital imaging techniques in otolith data capture, analysis and interpretation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 598: 213-231. <https://doi.org/10.3354/meps12531>
- FOLMSBEE J., JOHNSON S., LIU X., BRANDWEIN-WEBER M. & DOYLE S., 2019. – Fragile neural networks: the importance of image standardization for deep learning in digital pathology. *In: Medical Imaging 2019: Digital Pathology*, pp. 222-228. Presented at the Medical Imaging 2019: Digital Pathology. SPIE. <https://doi.org/10.1117/12.2512992>
- FOSSUM P., KALISH J. & MOKSNESS E., 2000. – Foreword. *In: 2nd International Symposium on Fish Otolith Research and Application*, Bergen, Norway, 20-25 June 1998. *Fish. Res.*, 46(1-3): 1-2. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(00\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(00)00126-0)
- GONÇALVES P., MAHE K., ELLEBOODE R., CHANTRE C., MURTA A., AVILA DE MELO A. & CABRAL H., 2017. – Blue whiting otoliths pair's symmetry side effect. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.*, 5: 6-9.
- HILBORN R. & WALTERS C.J., 2013. – Quantitative Fisheries Stock Assessment: Choice, Dynamics and Uncertainty. 575 p. Springer Science & Business Media.
- HÜSSY K., LIMBURG K.E., DE PONTUAL H., THOMAS O.R.B., COOK P.K., HEIMBRAND Y., BLASS M. & STURROCK A.M., 2021. – Trace element patterns in otoliths: the role of biomineralization. *Rev. Fish. Sci. Aquacult.*, 29: 445-477. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1760204>
- ICES, 2011. – Report of the Workshop of National Age Readings Coordinators (WKNARC). 5-9 Sep. 2011, Boulogne-sur-Mer, France. ICES CM 2011/ACOM:45, 175.
- ICES, 2020. – Stock Identification Methods Working Group. *ICES Sci. Rep.*, 2: 38.
- IWATA H. & UKAI Y., 2002. – SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *J. Hered.*, 93: 384-385. <https://doi.org/10.1093/jhered/93.5.384>
- L'ABÉE-LUND J.H., 1988. – Otolith shape discriminates between juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, and brown trout, *Salmo trutta L.* *J. Fish Biol.*, 33: 899-903. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05538.x>
- LEE H., TAJMIR S., LEE J., ZISSEN M., YESHIWAS B.A., ALKASAB T.K., CHOY G., & DO S., 2017. – Fully automated deep learning system for bone age assessment. *J. Digit. Imaging*, 30: 427-441. <https://doi.org/10.1007/s10278-017-9955-8>
- LIBUNGAN L.A. & PÁLSSON S., 2015. – Shape R: An R package to study otolith shape variation among fish populations. *PLOS ONE*, 10: e0121102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121102>
- LOMBARTE A. & LLEONART J., 1993. – Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. *Environ. Biol. Fish.*, 37: 297-306. <https://doi.org/10.1007/BF00004637>
- LOMBARTE A., CHIC Ò., PARISI-BARADAD V., OLIVELLA R., PIERA J. & GARCÍA-LADONA E., 2006. – A web-based environment for shape analysis of fish otoliths. The AFORO database. *Sci. Mar.*, 70: 147-152.
- MAHÉ K., 2019. – Sources de variation de la forme des otolithes : implications pour la discrimination des stocks de poissons. PhD Thesis, 273 p. Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), école doctorale – Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement.
- MAHÉ K., BELLAIL R., DUFOUR J.L., BOIRON-LEROY A., DIMEET J., DUHAMEL E., ELLEBOODE R., FELIX J., GRELLIER P., HUET J., LABASTIE J., LE ROY D., LIZAUD O., MANTEN M.L., MARTIN S., METRAL L., NEDELEC D., VERIN Y., & BADTS V., 2009. – French summary of age estimation procedures. 79 p. Ifremer
- MAHÉ K., FAVE S. & COUTEAU J., 2011. – TNPC User guide. 83 p. Ifremer – Département Halieutique Manche Mer du Nord, Laboratoire Ressources Halieutiques de Boulogne.
- MAHÉ K., COPPIN F., VAZ S. & CARPENTIER A., 2013. – Striped red mullet (*Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758) in the eastern English Channel and southern North Sea: growth and reproductive biology. *J. Appl. Ichthyol.*, 29: 1067-1072. <https://doi.org/10.1111/jai.12266>
- MAHÉ K., MACKENZIE K., IDER D., MASSARO A., HAMED O., JURADO-RUZAF A., GONÇALVES P., ANASTASOPOULOU A., JADAUD A., MYTILINEOU C., RANDON M., ELLEBOODE R., MORELL A., RAMDANE Z., SMITH J., BEKAERT K., AMARA R., DE PONTUAL H. & ERNANDE B., 2021. – Directional bilateral asymmetry in fish otolith: a potential tool to evaluate stock boundaries? *Symmetry*, 13: 987. <https://doi.org/10.3390/sym13060987>
- MILLE T., 2015. – Sources de variation intra-populationnelle de la morphologie des otolithes : asymétrie directionnelle et régime alimentaire. PhD Thesis, 222 p. Université de Lille 1 – Sciences et Technologies.
- MISZTAL K., POCHA A., DURAK-KOZICA M., WĄTOR M., KUBICA-MISZTAL A. & HARTEL M., 2020. – The importance of standardization – COVID-19 CT & Radiograph Image Data Stock for deep learning purpose. *Comput. Biol. Med.*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2020.104092>
- MOEN E., HANDEGARD N.O., ALLKEN V., ALBERT O.T., HARBITZ A. & MALDE K., 2018. – Automatic interpretation of otoliths using deep learning. *PLOS ONE*, 13: e0204713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204713>
- MOORE B., MACLAREN J., PEAT C., ANJOMROUZ M., HORN P. & HOYLE S., 2019. – Feasibility of automating otolith ageing using CT scanning and machine learning. (New Zealand Fisheries Assessment Report 2019/58. 23 p. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29670.16960>
- MYERS S.C., THORSEN A., SMOLIŃSKI S., AANESTAD GODIKSEN J., MALDE K., & HANDEGARD N.O., 2020. – An efficient protocol and data set for automated otolith image analysis. *Geosci. Data J.*, 7: 80-88. <https://doi.org/10.21355/NMDC-1826273218>
- NEVES A., SEQUEIRA V., FARIAS I., VIEIRA A.R., PAIVAR. & GORDO L.S., 2011. – Discriminating bluemouth, *Helicolenus dactylopterus* (Pisces: Sebastidae), stocks in Portuguese waters by means of otolith shape analysis. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 91: 1237-1242. <https://doi.org/10.1017/S002531541000189X>
- OOMS J., 2021. – magick: Advanced Graphics and Image-Processing in R. <https://cran.r-project.org/web/packages/magick/index.html>

- ORDOÑEZ A., EIKVILL., SALBERG A.B., HARBITZ A., MURRAY S.M. & KAMPFMEYER M.C., 2020. – Explaining decisions of deep neural networks used for fish age prediction. *PLOS ONE*, 15: e0235013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235013>
- PALMER A.R., 2016. – What determines direction of asymmetry: genes, environment or chance? *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.*, 371: 20150417. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0417>
- PANFILI J., DE PONTUAL H., TROADEC H. & WRIGH P.J. (eds), 2002. – Manual of Fish Sclerochronology. 464 p. Brest, France: Ifremer – IRD.
- POLITIKOS D.V., PETASIS G., CHATZISPYROU A., MYTILINEOU C. & ANASTASOPOULOU A., 2021. – Automating fish age estimation combining otolith images and deep learning: the role of multitask learning. *Fish. Res.*, 242: 106033. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2021.106033>
- RANDON M., PAPE O.L., ERNANDE B., MAHÉ K., VOLCKAERT F.A.M., PETIT E.J., LASSALLE G., BERRE T.L. & RÉVEILLAC E., 2020. – Complementarity and discriminatory power of genotype and otolith shape in describing the fine-scale population structure of an exploited fish, the common sole of the Eastern English Channel. *PLOS ONE*, 15: e0241429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241429>
- REIBISCH J., 1899. – Ueber die Eizahl bei *Pleuronectes platessa* und die Altersbestimmung dieser Form aus den Otolithen. *Nebst Bemerkung zu vorstehender Arbeit von Dr. V. Hensen*, pp. 233-248. Wiss. Meeresunt (Kiel).
- SMITH M.K., 1992. – Regional Differences in Otolith Morphology of the Deep Slope Red Snapper *Etelis carbunculus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 795-804. <https://doi.org/10.1139/f92-090>
- STEVENSON D. & CAMPANA S., 1992. – Otolith microstructure examination and analysis. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, 117:135. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22258.61127>
- STOCK M., NGUYEN B., COURTENS W., VERSTRAETE H., STIENEN E. & DE BAETS B., 2021. – Otolith identification using a deep hierarchical classification model. *Comput. Electron. Agric.*, 180: 105883. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105883>
- VABØ R., MOEN E., SMOLIŃSKI S., HUSEBØ Å., HANDEGARD N.O. & MALDE K., 2021. – Automatic interpretation of salmon scales using deep learning. *Ecol. Informatics*, 63: 101322.
- VANDERKOOY S., CARROLL J. & ELZEY S, GILMORE J. & KIPP J., 2020. – A Practical Handbook for Determining the Ages of Gulf of Mexico and Atlantic Coast Fishes, Third Edition. Gulf States Marine Fisheries Commission & Atlantic States Marine Fisheries Commission. GSMFC No. 300.
- VIGNON M., 2012. – Ontogenetic trajectories of otolith shape during shift in habitat use: Interaction between otolith growth and environment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 420-421: 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.03.021>
- VIGNON M., MORAT F., GALZIN R. & SASAL P., 2008. – Evidence for spatial limitation of the bluestripe snapper *Lutjanus kasmira* in French Polynesia from parasite and otolith shape analysis. *J. Fish Biol.*, 73: 2305-2320. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02070.x>
- VITALE F., CLAUSEN L.W. & CHONCHÚIR G.N. (eds), 2019. – Handbook of fish age estimation protocols and validation methods. *ICES Coop. Res. Rep.*, 346. <http://doi.org/10.17895/Ices.pub.5221>
- WILLIAMS T. & BEDFORD B.C., 1974. – The use of otoliths for age determination. *In: The Ageing of Fish* (Bagenal T.B., ed.) Proc. of an International Symposium. Unwin Brothers Ltd. 234 p.

Supplementary data



Supplementary figure 1. – Studies number in Web of Science about otolith growth and otolith shape.



Supplementary figure 2. – Studies number in the Stock Identification Methods Working Group (SIMWG) about stock identification using otolith and shape of otolith.

1.3 Méthode d'acquisition d'images 3D d'otolithes sagittal

L'article suivant décrit les différentes étapes d'acquisition des images 3D, il a été publié la revue Scientific Data et la base de données a été mise à disposition pour la communauté dans SEANOE (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2024b).



OPEN

DATA DESCRIPTOR

3D meshes dataset of sagittal otoliths from red mullet in the Mediterranean Sea

Nicolas Andrialovanirina^{1,2}✉, Lauriane Poloni^{3,4}, Rémi Laffont⁴, Émilie Poisson Caillault¹, Sébastien Couette^{3,4} & Kélig Mahé^{1,2}✉

This paper presents a dataset of 3D sagittal left otolith meshes from 339 individual red mullet (*Mullus barbatus*). These immature specimens were collected from 17 geographical areas covering the entire Mediterranean Sea. Measured biological parameters were: fish total length (TL \pm 1 mm, range from 125 to 238 mm), total weight (W \pm 0.1 g, range from 14.9 to 168.0 g), sex (S), sexual maturity staging (Mat). The 3D otolith dataset comprises high-resolution meshes of otoliths obtained using microtomography (29.2 μ m voxel size). The data offer valuable insights into the morphological variability and population structure of red mullet populations in the Mediterranean Sea. Potential applications of the dataset include age determination, stock identification, and population connectivity analysis. These applications aim to enhance the understanding of red mullet populations and contribute to the sustainable management of marine resources in the Mediterranean Sea.

Background & Summary

Among the numerous fish species inhabiting the Mediterranean Sea, the red mullet (*Mullus barbatus*) stands out as a primary commercial species supporting artisanal and industrial fisheries across this geographical area¹. Understanding the dynamics and structure of red mullet populations is essential for sustainable fisheries management in the Mediterranean. The otolith contains valuable clues about the life history of individual fish and the environmental pressures they experience²⁻⁵.

The otolith, an incrementally grown calcified structure located in the inner-ear of fishes, plays a crucial role in hearing, balance and orientation⁶. It is found within otic sacs in a network of semicircular canals inside the ear. These otic sacs contain three pairs of otoliths known as *sagitta*, *lapillus*, and *lagenae*⁷. The data presented in this paper pertains only to the sagittal otolith, which is generally the most voluminous and the most commonly studied in fisheries applications^{2,4,5}. Otolith shape is influenced by a multifaceted interaction among environmental factors⁸⁻¹⁸, genetic inheritance^{11,14,16}, and ontogenetic development^{12,19-21}. Otoliths are metabolically inert (*i.e.*, without post-deposition alteration or resorption)⁶, and their extraction and processing are less time-consuming and less expensive than other methods of stock delimitation (*e.g.*, genetics)². Therefore, it has become one of the most widely used proxies for age estimation, identifying stock boundaries, and population connectivity analysis of various fish species^{2,5}.

Traditionally, otolith shape analysis has been conducted using two-dimensional (2D) images⁵, which offer only a limited perspective of the three-dimensional (3D) structure. This approach may introduce biases due to the object's positioning during 2D image acquisition. Recent advancements in imaging technology have enabled the application of 3D shape analysis to otoliths, providing a more comprehensive understanding of their morphology. By capturing the whole 3D surface of otoliths in three dimensions, this method offers deeper insights into their structural complexity and biological significance.

3D analysis reveals features that are often overlooked in 2D analysis, thereby expanding our knowledge of otolith morphology. However, research on 3D otoliths has primarily focused on acquisition methods²²⁻²⁶ and understanding their function within the fish inner-ear²⁷⁻³⁰, rather than on aspects applied to shape analysis. A recent study using part of the present dataset from red mullet otoliths demonstrated the effectiveness of 3D

¹Univ. Littoral Côte d'Opale, UR 4491, LISIC, Calais, F-62100, France. ²Ifremer, Unité HMMN, Laboratoires Ressources Halieutiques, 150 quai Gambetta, Boulogne-sur-Mer, 62321, France. ³École Pratique des Hautes Études, PSL Université, Paris, 75014, France. ⁴UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Université de Bourgogne, 6 Bd Gabriel, Dijon, 21000, France. ✉e-mail: nicolas.andrialovanirina@ifremer.fr; kelig.mahé@ifremer.fr

n° GSA	1	5	6	8	10	11	12	14	16	17	18	20	22	23	24	25	27
n samples	7	23	12	12	13	5	19	16	58	8	30	20	36	19	22	24	27

Table 1. Sampling distribution by geographical sub-areas (GSAs).

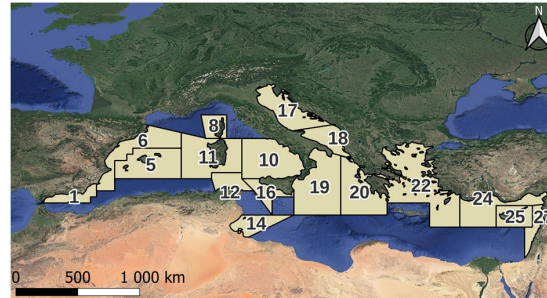


Fig. 1 Location of fish sampling from 17 geographical sub-areas (GSAs) in the Mediterranean Sea.

analysis in addressing significant asymmetry originating from the inner-ear side, a phenomenon not observed in 2D analysis with the same otoliths³¹. Additionally, this 3D asymmetry also influenced the fish's location, *i.e.* the intensity of the asymmetry varied depending on the fish's environment. Consequently, this dataset on the 3D shape of fish otoliths represents a new opportunity for better understanding their morphogenesis processes. With the 3D meshes data, research could delve deeper into the relationship with fish growth (*i.e.* ontogeny evolution), genetic heritage, and the environmental parameters of the habitat, allowing for a more comprehensive exploration and understanding their impact of these factors on the otolith.

This paper presents a comprehensive dataset of 3D sagittal otolith meshes of red mullet collected from 17 locations from the Mediterranean Sea. The dataset includes high-resolution images obtained using micro-computed tomography (micro-CT or μ CT). Each otolith image is available with the individual biological parameters of each specimen. These measurements provide valuable information on the shape variability of red mullet otoliths, which can be used to infer age, assess growth rates, and identify stock structure. The creation of this dataset was motivated by the need for standardised, high-quality data to support research in fisheries science, marine ecology, and conservation biology. By providing researchers with access to a collection of 3D otolith models and associated biological fish data, this dataset facilitates studies on the population dynamics, connectivity, and resilience of red mullet populations in the Mediterranean Sea. Furthermore, the dataset has the potential for broader applications beyond red mullet research, serving as a valuable resource for comparative studies on otolith morphology and fish population dynamics across different species and geographic regions.

Overall, this dataset represents a valuable resource for researchers interested in studying the ecology, biology, and fisheries management of red mullet populations in the Mediterranean Sea. By facilitating access to 3D otolith data, this dataset contributes to the advancement of scientific knowledge and the development of evidence-based management strategies for sustainable fisheries in the region.

Methods

Fish sampling. 339 individual fish specimens were collected from 17 geographical sub-areas (GSAs) (see Table 1 and Fig. 1), as defined by the General Fisheries Commission for the Mediterranean (GFCM). These GSAs represent diverse fisheries management unit within the Mediterranean Sea. The sampling campaign was conducted during the 2019 international MEDiterranean International Trawl Survey (MEDITS survey), a substantial effort to assess fish populations and their habitats in the Mediterranean Sea³². The MEDITS survey provides a valuable dataset for understanding the distribution and characteristics of fish species.

To ensure robustness in analyse, potential ontogenetic effects on otolith shape are considered. Consequently, the sampling is restricted to young mature fishes (*i.e.* fish after their first sexual maturity and aged between 3 and 5 years old) within a total length range from 125 to 238 mm (with a mean length of 159 ± 19 mm), and a total weight range from 14.9 to 168.0 g (with a mean weight of 46 ± 19 g). Biological fish parameters and sample information were acquired (see Table 2). Furthermore, only left otoliths (*sagittae*) are selected to avoid asymmetric variation. These choices ensure uniformity in our dataset and facilitate accurate comparisons across individuals. Otoliths were carefully extracted from the inner ears of the fish, and cleaned to remove any adhering tissue or debris. Metadata describing the geographic sampling location, and the specimen characteristics (fish total length, weight, sex, maturity stage) were also obtained.

Three-dimensional otolith reconstruction. *X-ray images acquisition.* Otolith X-ray images were acquired using an X-ray microtomograph (micro-CT or μ CT) Skyscan 1174 (Bruker) (see Fig. 2). X-ray microtomography consists on entailed capturing two-dimensional (radiograph) images of the otoliths from various angles, covering a complete rotation from 0° to 180°. The differential attenuation of X-rays while crossing the sample depending of material density, and expressed as different grey values, enable us to discern quite easily the whole otolith from the surrounding air. X-ray microtomograph parameters are showed in Table 3.

Parameters	Detail
Number	Sample identification number
Refscan	Unique sample reference
Species	Latin name of fish species
Meshes3D	3D meshes file name
Sdate	Fish catch date sampling (yyyy-mm-dd)
GSA	Fisheries management unit
Subarea	Geographical sub-area
Latitude	Latitude of the fish sample (in decimal degrees)
Longitude	Longitude of the fish sample (in decimal degrees)
Depth	Estimated depth of catch (in m)
BTemp	Bottom temperature (in celsius degrees)
TL	Total length of the fish, from the tip of the snout to the tip of the longest lobe of the caudal fin (in mm)
W	Total weight of the fish (in g)
S	Sex of the fish (M: male, F: female or I: undetermined)
Mat	Fish sexual maturity staging (0: abnormal <i>i.e.</i> necrotic, sclerotized or intersex gonads; 1: immature; 2: developing gonads, non-hydrated eggs; 3: spawning; 4: regressing or regenerating gonads; 5: no spawning)

Table 2. Sampling details and biological fish parameters.

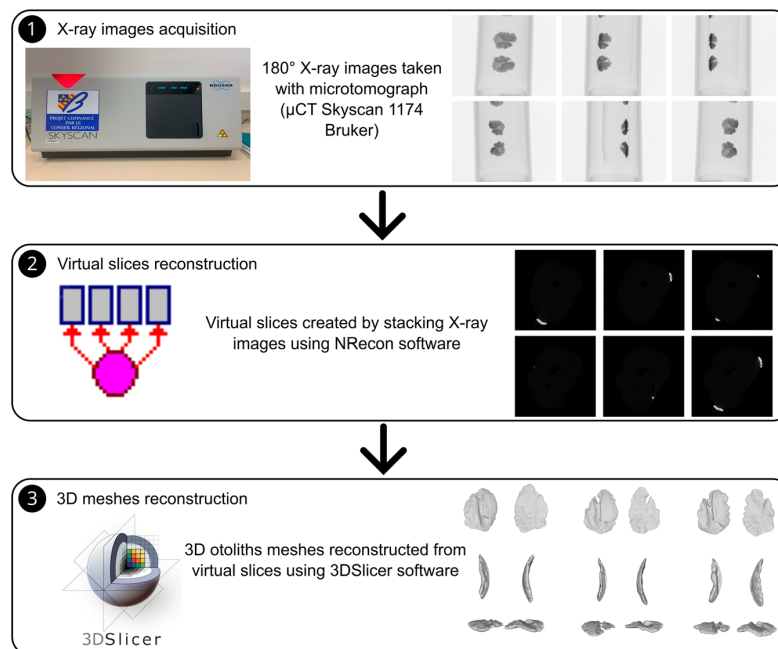


Fig. 2 Method from X-ray images acquisition to 3D otolith meshes.

Virtual slices reconstruction. The software NRecon by Bruker (v.1.7.4.6) was used to reconstruct cross-sectional slices of the otoliths from the radiographs acquired by the microtomograph (see Fig. 2). The program employs a Feldkamp algorithm, a convolution formula, and backprojection to reconstruct a three-dimensional density function from a set of two-dimensional projections. Indeed, X-ray images obtained by microtomography represent grayscale equivalences of material densities (higher densities will be encoded by higher grayscale levels, tending towards white). The algorithm compiles this set of images into a density volume and then generates slices in the transverse plane of this volume at regular intervals. This reconstruction step is automated and also allows for parameter optimization such as volume alignment, artifact correction, or selection of areas of interest. The slice images are saved in Tag Image File Format (.tiff).

3D meshes reconstruction. The segmentation step of the virtual slices aims to distinguish, within the resulting 3D volume of these slices, areas of interest corresponding to the objects under study (see Fig. 2). In this case, the goal is to differentiate between the voxels corresponding to the otoliths and the background voxels based on

Parameters	Measures
Type of scanning	Oversize scan
Rotation step	by 0.7° (from 0° to 180°)
Number of catches	2
Exposure	3,000 ms
Filter	0.5 mm AL
Intensity	800 A
Tube voltage (tension)	50 kV
Voxel size	29.2 μm

Table 3. X-ray microtomograph parameters.

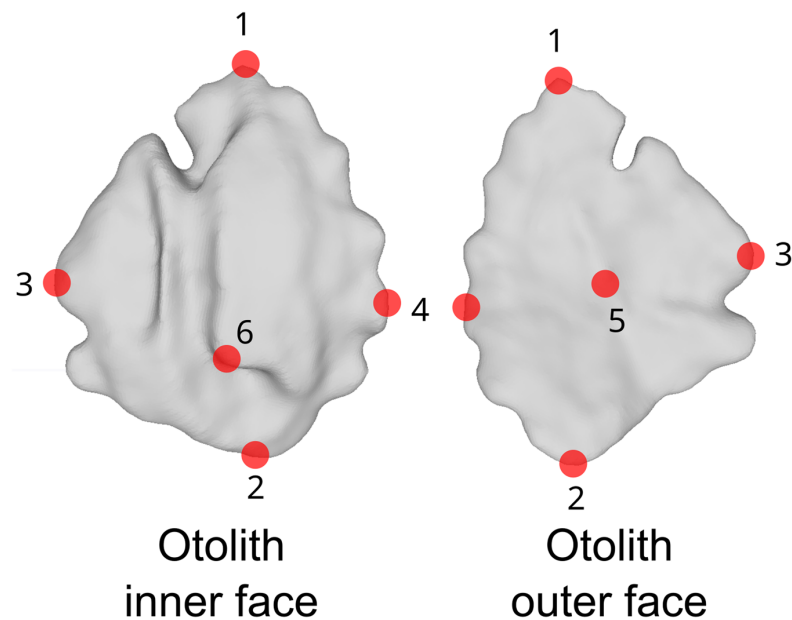


Fig. 3 3D otolith meshes in inner and outer face with six landmarks (red points: 1 at the tip of the *rostrum*, 2 on the *postrostrum*, 3 at the end of dorsal, 4 at the tip of ventral, 5 on the middle of the outer face of the otolith, 6 in the transition part between *ostium* and *cauda*).

simple criteria of grayscale levels (the otolith being dense compared to the background, its constituent voxels will be bright) and adjacency (the otolith constituting a continuous object). This segmentation step is performed using the software 3DSlicer (v.5.0.2). Segmentation Editor module was used with threshold option. Threshold range was between 60 and 255. A grayscale voxel thresholding is applied to select all the voxels constituting the otoliths. The surface of this selected voxel set is then extracted in the form of a 3D mesh (see Fig. 2). This type of object models a 3D mesh as a cloud of points (vertices) connected by triangulation (see Fig. 2) expressing the surface of the 3D segmented object. 3D Slicer uses a Flying edges algorithm for the surface extraction and meshing. Landmarks were manually placed on the meshes to improve the alignment and measurement of the otoliths for future study. We proposed six landmarks (Fig. 3) placed on the meshes using the R package Digit3DLand³³. These landmarks were chosen for their anatomical relevance and ease of identification across specimens, located at the anterior, posterior, dorsal, and ventral edges, as well as the core and a notable curvature point. These landmarks are only subjective, and we strongly recommend automatic alignment. These proposed landmarks could be used for pre-alignment before automatic alignment.

Data Records

3D mesh data was saved in binary Polygon File Format (.ply). The x, y, and z coordinates of six landmarks (refer to Fig. 3) were stored in a TPS text file, where the ID corresponds to the mesh name. Sampling and biological fish parameters were registered in a single comma-separated value (.csv) file. In this csv data, each row corresponds to one fish, with 15 columns as detailed in Table 2. Log file after X-ray images acquisition (.log) and virtual slices reconstruction (_rec.log) were made available. In this way, all the information relating to image acquisition and reconstruction of the virtual slices was saved in these files if necessary. Readme text file is provided for information on the dataset.

All 3D meshes, tps file with landmarks, sampling and biological fish parameters on csv are available on SEANOE (<https://doi.org/10.17882/99980>)³⁴.

Technical Validation

Most shape analysis tools, such as Fourier descriptors, generally require closed objects for processing 3D mesh data. The presence of holes in a 3D object prevents its contour from being analysed.

To address this issue, meshes with holes, non-manifolds (*i.e.*, detached or split edges or vertices) or isolated elements (non otolith artefacts) needed to be identified. To identify 3D meshes with non-manifolds, MeshLab 2022.02 was used. In the following equation (1), genus in mathematic function with Euler characteristic³⁵ were employed to identify manifold meshes with holes.

$$g = -1 \times (0.5 \times (V - E + F + b) - 1) \quad (1)$$

Where g is the genus (number of holes), V is the number of vertices, E is the number of edges, F is the number of faces and b is the number of borders of the 3D meshes.

Subsequently, meshes with holes were either removed or reconstructed by readjusting the threshold range on 3DSlicer. Functions from Rvcg package³⁶ were used to remove isolated artefacts.

Usage Notes

The data³⁴ provided in this paper offer valuable insights into the 3D shape of fish otoliths and can be utilized by researchers across various fields. It is advisable to normalise the data to ensure consistency across different datasets. Researchers may also consider performing additional processing steps, such as alignment, scaling, or feature extraction, depending on their specific research objectives. Landmarks could be used for these purposes. An R script could be supplied to standardise the 3D meshes with the landmarks (decimation, alignment, scale) and then to extract the Fourier coefficients using SPHARM-spherical harmonics³⁷. In SPHARM analysis, landmarks can be used to ensure that the polarity “up-down”, “right-left”, and “front-back” is homologous among the meshes being compared.

Code availability

Pre-processing code was written in R to delete non otolith artefacts, select meshes without holes, save the mesh as a .ply file, and place 6 landmarks for all 3D otolith meshes. The code is available in the supplementary information of this paper.

Received: 21 May 2024; Accepted: 11 July 2024;

Published online: 23 July 2024

References

- Conides, A. & Papaconstantinou, C. Commercial fisheries in the mediterranean, focusing on the environmental status and the corresponding management measures. *Aquaculture and Fisheries Studies* **2**, <https://doi.org/10.31038/AFS.2020214> (2020).
- Cadrin, S., Kerr, L. & Mariani, S. Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science (Second Edition). Elsevier Academic Press, Amsterdam (2014).
- Irgens, C. Otolith structure as indicator of key life history events in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Ph.D. Thesis, University of Bergen, Norway (2018).
- Mahé, K. Sources de variation de la forme des otolithes : Implications pour la discrimination des stocks de poissons. Ph.D. Thesis, Université du Littoral Côte d'Opale, France <https://doi.org/10.17895/ices.pub.24466996> (2019).
- ICES. ICES stock identification methods working group (SIMWG) **5**, 153, <https://doi.org/10.17895/ices.pub.24466996> (2023).
- Casselman, J. M. Determination of age and growth. In: Weatherley, A. H., Gill, H. S. (Eds.), *The Biology of Fish Growth*. Academic Press, New York (1987).
- Schulz-Mirbach, T., Heß, M., Metscher, B. D. & Ladich, F. A unique swim bladder-inner ear connection in a teleost fish revealed by a combined high-resolution microtomographic and three-dimensional histological study. *BMC Biology* **11**, 75, <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-75> (2013).
- Wilson, R. R. Depth-related changes in sagitta morphology in six macrourid fishes of the pacific and atlantic oceans. *Copeia* **1985**, 1011–1017, <https://doi.org/10.2307/1445256> (1985).
- Morales-Nin, B. Y. O. The influence of environmental factors on microstructure of otoliths of three demersal fish species caught off namibia. *South African Journal of Marine Science* **5**, 255–262, <https://doi.org/10.2989/025776187784522207> (1987).
- Mosegaard, H., Svedäng, H. & Taberman, K. Uncoupling of somatic and otolith growth rates in arctic char (*Salvelinus alpinus*) as an effect of differences in temperature response. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **45**, 1514–1524, <https://doi.org/10.1139/f88-180> (1988).
- Campana, S. E. & Casselman, J. M. Stock discrimination using otolith shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**, 1062–1083, <https://doi.org/10.1139/f93-123> (1993).
- Lombarte, A. & Lleonart, J. Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. *Environmental Biology of Fishes* **37**, 297–306, <https://doi.org/10.1007/BF00004637> (1993).
- Begg, G., Overholtz, W. & Munroe, N. The use of internal otolith morphometrics for identification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) stocks on georges bank. *Fishery Bulletin* **99** (2001).
- Lombarte, A., Torres, G. J. & Morales-Nin, B. Specific merluccius otolith growth patterns related to phylogenetics and environmental factors. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **83**, 277–281, <https://doi.org/10.1017/S0025315403007070h> (2003).
- Cardinale, M., Doering-Arjes, P., Kastowsky, M. & Mosegaard, H. Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **61**, 158–167, <https://doi.org/10.1139/f03-151> (2004).
- Vignon, M. & Morat, F. Environmental and genetic determinant of otolith shape revealed by a non-indigenous tropical fish. *Marine Ecology Progress Series* **411**, 231–241, <https://doi.org/10.3354/meps08651> (2010).
- Lewis, L. S. *et al.* Otolith-based approaches indicate strong effects of environmental variation on growth of a critically endangered estuarine fish. *Marine Ecology Progress Series* **676**, 37–56, <https://doi.org/10.3354/meps13848> (2021).

18. Iranmanesh, M., Hesni, M. A. & Lashkari, M. Morphological surveys of the sagittal otolith of marine gobiid fish (teleostei: Gobioidae). *Animal Biology* **73**, 273–291, <https://doi.org/10.1163/15707563-bja10110> (2023).
19. Secor, D. H. & Dean, J. M. Somatic growth effects on the otolith-fish size relationship in young pond-reared striped bass, *Morone saxatilis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **46**, 113–121, <https://doi.org/10.1139/f89-015> (1989).
20. Simoneau, M., Casselman, J. M. & Fortin, R. Determining the effect of negative allometry (length/height relationship) on variation in otolith shape in lake trout (*Salvelinus namaycush*), using fourier-series analysis. *Canadian Journal of Zoology* **78**, 1597–1603, <https://doi.org/10.1139/z00-093> (2000).
21. Monteiro, L. R., Benedetto, A. P. M. D., Guillermo, L. H. & Rivera, L. A. Allometric changes and shape differentiation of sagitta otoliths in sciaenid fishes. *Fisheries Research* **74**, 288–299, <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2005.03.002> (2005).
22. Zitek, A., Mayrhofer, B., Oehm, J., Irrgeher, J. & Prohaska, T. Affordable 3d scanning of small otoliths for improved shape analysis by photogrammetry techniques <https://doi.org/10.13140/2.1.4083.7122> (2014).
23. Mapp, J. J. I. *et al.* Three-dimensional rendering of otolith growth using phase contrast synchrotron tomography. *Journal of Fish Biology* **88**, 2075–2080, <https://doi.org/10.1111/jfb.12949> (2016).
24. Marti-Puig, P., Danés, J., Manjabacas, A. & Lombarte, A. New parameterisation method for three-dimensional otolith surface images. *Marine and Freshwater Research* **67**, 1059, <https://doi.org/10.1071/MF15069> (2016).
25. Vasconcelos-Filho, J. *et al.* Peeling the otolith of fish: Optimal parameterization for micro-CT scanning. *Frontiers in Marine Science* **6**, <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00728> (2019).
26. Quindazzi, M. J., Summers, A. & Juanes, F. Efficiency is doing things right: high-throughput, automated, 3d methods in the modern era of otolith morphometrics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **79**, 7, <https://doi.org/10.1139/cjfas-2021-0088> (2022).
27. Schulz-Mirbach, T. *et al.* In-situ visualization of sound-induced otolith motion using hard x-ray phase contrast imaging. *Scientific Reports* **8**, 3121, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21367-0> (2018).
28. Schulz-Mirbach, T., Ladich, F., Plath, M. & Heß, M. Enigmatic ear stones: what we know about the functional role and evolution of fish otoliths. *Biological Reviews* **94**, 457–482, <https://doi.org/10.1111/brv.12463> (2019).
29. Schulz-Mirbach, T. *et al.* Auditory chain reaction: Effects of sound pressure and particle motion on auditory structures in fishes. *PLOS ONE* **15**, e0230578, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230578> (2020).
30. Wei, C. & McCauley, R. Numerical modeling of the impacts of acoustic stimulus on fish otoliths from two directions. *The Journal of the Acoustical Society of America* **152**, 3226–3234, <https://doi.org/10.1121/10.0016359> (2022).
31. Andrialovanirina, N. *et al.* Asymmetry of sagittal otolith shape based on inner ear side tested on mediterranean red mullet (*Mullus barbatus* linnaeus, 1758): Comparative analysis of 2d and 3d otolith shape data. *Symmetry* **15**, 1067, <https://doi.org/10.3390/sym15051067> (2023).
32. Spedicato, M. T. *et al.* Spatial distribution of marine macro-litter on the seafloor in the northern mediterranean sea: the MEDITS initiative. *Scientia Marina* **83**, <https://doi.org/10.3989/scimar.04987.14A> (2019).
33. Laffont, R. & Navarro, N. digit3dland: Digitalization of 3d landmarks on mesh. *R package version 0.2.3* <https://github.com/morphOptics/digit3DLand>.
34. Andrialovanirina, N. *et al.* 3d otolith mesh dataset of red mullet (*Mullus barbatus*) in the mediterranean sea. *SEANOE* <https://doi.org/10.17882/99980> (2024).
35. Euler, L. Elements of rubrics for solids. *Novi Commentarii Academiae Scientiarum Petropolitanae (in Latin)* 109–140 (1758).
36. Schlager, S. Chapter 9 - morpho and rvcg - shape analysis in r: R-packages for geometric morphometrics, shape analysis and surface manipulations 217–256, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810493-4.00011-0> (2017).
37. Shen, L., Farid, H. & McPeck, M. A. Modeling three-dimensional morphological structures using spherical harmonics. *Evolution* **63**, 1003–1016, <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00557.x> (2009).

Acknowledgements

This work has benefited from the grant “ANR-21-EXES-00 11” as part of the IFSEA graduate school (which originates from National Research Agency under the Investments for the Future program), the French Federative Research Structure (SFR Campus de la mer, project No. 2022.7). The otoliths come from the Specific Contract No. 03_EASME/EMFF/2017/L.3.2.3/01/SI2.793201 (MED_UNITS) financed by the European Union. This work is also a contribution to the e-Col+ project funded by the Programme d’Investissements d’Avenir (ANR 21 ESRE 0053). The GISMO platform (Biogéosciences, University Bourgogne Franche-Comté, UMR CNRS 6282, France) was used for the acquisition of 3D images.

Author contributions

N.A., É.P.C., S.C. and K.M. designed the research; L.P., S.C., R.L. and K.M. organized the image analysis; N.A., L.P., R.L. and S.C. realized the images acquisition and reconstruction. N.A. wrote the paper, and all authors provided critical comments and were involved in the writing of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03641-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.A. or K.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

1.4 Reconstruction des otolithes sagittal en 3D à partir de descripteurs sphériques de Fourier

L'article suivant décrit l'ensemble du protocole d'acquisition et de standardisation des images 3D, il a été publié et présenté dans les articles de conférences RFIAP 2024.

3D sagittal otolith reconstruction from spherical Fourier descriptors

N. Andrialovanirina^{1,2} R. Laffont³ S. Couette^{3,4} A. Matéos^{5,6} K. Mahé² É. Poisson Caillault¹

¹Univ. Littoral Côte d'Opale, UR 4491, LISIC, F-62100 Calais, France

²IFREMER, Fisheries Laboratory, 150 quai Gambetta, 62321 Boulogne-sur-Mer, France

³UMR CNRS 6282Biogéosciences, Université de Bourgogne, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

⁴École Pratique des Hautes Études, PSL Université, 75014 Paris, France

⁵Université d'Artois, 62030 Arras, France

⁶UMR Transfrontalière BioEcoAgro N°1158, 62217 Tilloy-les-Mofflaines, France

nicolas.andrialovanirina@ifremer.fr

1 Introduction

Otoliths, also known as ear stones, are calcified structures found in the inner ears of fish, playing a crucial role in fish hearing and balance [1]. They are valuable tools in fisheries research, used for age determination, stock identification, and understanding fish population dynamics [2, 3, 4]. The shape of otoliths provides insights into a fish's life history and environment [4]. While traditional methods for studying otoliths involve manual measurements and visual examination, recent technological advancements have introduced automated techniques, such as image processing and mathematical modelling, enabling more efficient and accurate analysis of otolith shape and structure.

Currently, these analyses are predominantly conducted using two-dimensional (2D) images [2, 3, 4], offering only a partial representation of the otolith's shape. This paper introduces a novel technique focusing on three-dimensional (3D) sagittal otolith reconstruction from spherical harmonics decomposition descriptors [9]. By utilising advanced imaging technology to capture 3D models of otoliths and applying mathematical descriptors, such as Fourier transforms, the method aims to provide a standardised and reproducible characterisation of otolith shape. This approach enables the standardisation, alignment, and extraction of otolith shape parameters, crucial for ensuring data quality and comparability across different 3D models.

This study aims to demonstrate how to standardise and extract the 3D shape information of fish otoliths. This innovative approach holds promise in improving the accuracy and efficiency of age determination, stock identification, and enhancing our understanding of fish populations, thereby supporting sustainable fisheries management. To apply this analytic protocol, otoliths from 20 commercial fish species from the Eastern Channel were used.

2 Extraction of 3D otolith shape

2.1 3D image acquisition

The acquisition of 3D sagittal otolith images involved the use of an X-ray microtomograph, which captures two-dimensional X-ray images of the otolith from various angles. These images reveal differences in density between the otoliths and the surrounding air.

Subsequently, reconstruction was conducted using Nrecon software (Bruker, Kontich, Belgium) to convert the X-ray images into virtual slices, followed by segmentation with 3D Slicer to extract otolith isosurfaces as 3D meshes. To ensure symmetry between the left and right otoliths, a mirror transformation was applied to the right otoliths (by multiplying one of the three mesh vertex coordinate dimensions by -1), ensuring accurate comparative analysis between both sides.

2.2 3D meshes standardisation

Prior to further analyses, six landmarks had to be placed manually on each mesh (Figure 1, Part 1); these were used to pre-align otolith meshes. In this shape analyses, measures could be taken to prevent under or over-representation of a population or species. This involved duplicating individuals from the same population or species to ensure equal representation across categories.

A mesh decimation process was then applied to all otoliths to ensure they had the same number of triangles per 3D object. Decimation reduces the number of triangles in the mesh while preserving its overall shape. Depending on the required level of detail, decimation can be adjusted as follows. For a high level of detail, the meshes were standardised to 10,000 triangles with 5,002 vertices per otolith. With 1,000 triangles and 502 vertices, otolith reconstruction was already completed (Figure 1, Part 2). Isolated vertices resulting from decimation were removed to prevent potential issues during the projection onto a sphere. Furthermore, the landmarks were readjusted after mesh decimation by associating them with the vertices closest to the new decimated mesh. The centroid size was resized to 1 for all meshes to ensure uniform size.

2.3 Fourier spherical harmonics with SPHARM

Three-dimensional otolith models were filtered to include only individuals without structural holes. This selection was necessary because the SPHARM (spherical harmonics) analysis [5, 6], which projects 3D shapes onto a reference sphere, cannot process data with holes. Indeed, as one of the SPHARM analysis step consists of mapping between a reference spherical surface (*i.e.* genus-zero surfaces and with no holes or handles) and object surfaces under study, it was crucial to ensure that the selected otolith surfaces were suitable for analysis [6]. MATLAB functions for SPHARM analysis were also translated into R language for further processing.

To align all 3D otoliths and compute Fourier coefficients [7, 8], was utilised through an (Figure 1, Part 3). Initially, a random individual was selected to align all others using corrected landmarks, initiating the iterative process. Subsequently, a global mean shape was calculated from all aligned otoliths, and the mean shape was recalculated from these new alignments iteratively until convergence was achieved, and the mean shape stabilised.

During each iteration, all 3D meshes were mapped onto a sphere and aligned using landmarks (Figure 1, Part 3). The meshes were projected onto a unit sphere under a bijective mapping to minimise area and topology distortion. The CALD spherical parameterisation algorithm was employed, combining local and global smoothing methods alternately until convergence was achieved [9]. Local smoothing aimed to minimise area distortion and worst-case length distortion at the level of a local sub-mesh, while global smoothing attempted to distribute area distortions evenly over the entire sphere [6, 9].

Fourier coefficients were calculated at each iteration, and, finally, the coefficients from the last iteration were considered when convergence occurred. The surface of each mesh was described by a series of points using three parameterized variables: $x(\theta, \varphi)$, $y(\theta, \varphi)$, and $z(\theta, \varphi)$, where θ represents the polar colatitudinal coordinate with $\theta \in [0, \pi]$, and φ represents the azimuthal longitudinal coordinate with $\varphi \in [0, 2\pi]$ (Figure 1, Part 3) [6]. Standardisation and mesh alignment by landmarks are crucial in this context as comparisons are made point by point. Variations in these three coordinates along the sphere are then treated as signals using Fourier functions, where these coefficients represent combinations of sinusoids at different frequencies. Low frequencies describe general aspects of the shape while high frequencies depict fine details, and the combination of these terms at different frequencies comprehensively describes the 3D shape, capturing both general aspects and local details.

All three parameters could be expressed as Fourier spherical harmonic (SPHARM) functions like [10]

$$Y_l^m(\theta, \varphi) = \sqrt{\frac{2l+1(l-m)!}{4\pi(l+m)!}} P_l^m(\cos\theta) e^{-im\varphi}$$

$P_l^m(\cos\theta)$ are Legendre polynomials known as $P_l^m(x) = \frac{(-1)^m}{(2^l l!)} (1+x^2)^{\frac{m}{2}} \frac{(d^l)^m}{(dx^{l+m})} (x^2-1)^l$

Each parameters is autonomously decomposed with respect to spherical harmonics [6] as

$$x(\theta, \varphi) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-1}^l c_{lx}^m Y_l^m(\theta, \varphi) \quad ; \quad y(\theta, \varphi) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-1}^l c_{ly}^m Y_l^m(\theta, \varphi) \quad ; \quad z(\theta, \varphi) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-1}^l c_{lz}^m Y_l^m(\theta, \varphi).$$

All these functions can be combined into a single vector-valued function [6] as

$$v(\theta, \varphi) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-1}^l c_l^m Y_l^m(\theta, \varphi)$$

where $v(\theta, \varphi) = (x(\theta, \varphi), y(\theta, \varphi), z(\theta, \varphi))^T$ and $c_l^m = (c_{lx}^m, c_{ly}^m, c_{lz}^m)^T$. The coefficients c_l^m are calculated through conventional least-squares estimation [6]. The SPHARM objective function is to compute c_{lx}^m , c_{ly}^m and c_{lz}^m up to the number of harmonics (degrees) defined [6].

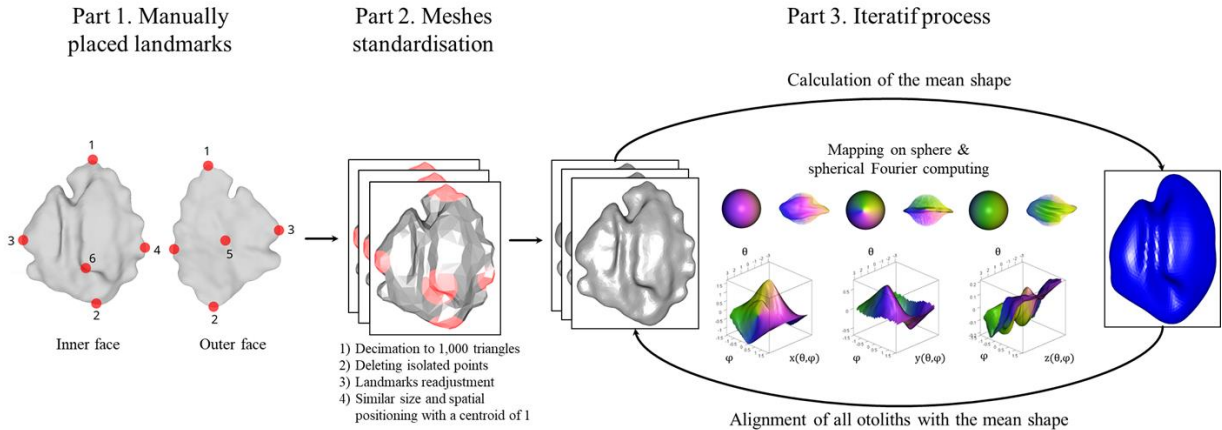


FIGURE 1 – Analytic protocol for standardisation, alignment, and calculation of spherical Fourier coefficients from 3D sagittal otoliths using SPHARM. Part 1 – 3D otolith mesh showing inner and outer faces with six landmarks (red points, 1 on the *rostrum*, 2 on the *postrostrum*, 3 at the end of dorsal, 4 at the tip of ventral, 5 on the middle of outer face of the otolith, 6 on top of the *sulcus acusticus*). Part 2 – Otoliths decimated to 1,000 triangles, with red parts on the meshes indicating the readjustment of landmarks. Part 3 – During each iteration, the meshes are projected onto a sphere, and Fourier coefficients are calculated for the aligned otoliths.

3 Discussion

This study introduces the application of the SPHARM method [6] for describing otolith shape, from 20 fish species, through the computation of spherical harmonics. A novel technique for 3D sagittal otolith reconstruction was introduced using spherical Fourier descriptors. This innovative approach overcomes the limitations of traditional 2D methods, providing a comprehensive characterisation of otolith shape. 3D analysis allows for the handling of asymmetry in otolith

shape based on the inner ear side. This important factor can influence otolith shape and is not adequately captured by 2D analysis. The analytic protocol in this study proved highly effective, automatically identifying and removing problematic meshes with holes, isolated points, or non-manifolds, which are the main 3D meshes where the SPHARM analysis finds the projection onto a sphere impossible. Leveraging advanced imaging technology and mathematical descriptors like Fourier transforms, the analytic protocol enables the standardisation, alignment, and extraction of otolith shape parameters, essential for ensuring data quality and comparability across different meshes.

Whether analysing 2D images or 3D meshes shape, standardisation of inputs is essential as it allows for comparison between each input. Standardisation is a vital process ensuring the quality and comparability of data by adjusting the dataset's distribution through normalisation, zero-centering, and standardisation [11]. This step accelerates machine learning time and achieves good generalisation in inference, improving data quality for activities like data cleaning, profiling, and matching. Moreover, alignment in morphometric analysis involves superposing shapes to minimise differences in position, orientation, and scale, a necessary preliminary step before meaningful shape comparisons [12, 13].

The next step will involve applying classification or multivariate analysis to this standardised otolith shape data. Using this comprehensive otolith shape holds potential to improve the accuracy and efficiency of age and stock identification classification.

The process of acquiring 3D images and standardisation is, however, time-consuming. It is advisable to reduce or optimise scan parameters according to the otolith size and study objectives. For instance, to reduce scanning time, X-ray with a smaller rotation step and a larger voxel size could be used (but risk losing quality and resolution). In this analytic protocol, decimation can be reduced to 1,000 triangles (11 harmonics) for small otoliths.

One avenue for further exploration lies in the automated identification of the six landmarks within the process. Additionally, addressing the challenge of managing holes in otoliths, a characteristic feature of certain fish species, presents another promising direction for study. While our case study focused on fish otoliths, this analytic protocol could be used in other areas of 3D shape analysis without holes or isolated elements.

Acknowledgments This work has benefited from the grant “ANR-21-EXES-00 11” as part of the IFSEA graduate school (which originates from National Research Agency under the Investments for the Future program), the French Federative Research Structure (SFR Campus de la mer, project No. 2022.7). The authors warmly thank the GISMO platform and its staff (Biogéosciences, University Bourgogne Franche-Comté, UMR CNRS 6282, France), which manages and maintains the analytical equipment used in this study. This work is a contribution to the e-Col+ project funded by the Programme d’Investissements d’Avenir (ANR-21-ESRE-0053).

Bibliography

- [1] J.M. CASSELMAN. Determination of Age and Growth. In *The Biology of Fish Growth*; Weatherley, A.H., Gill, H.S., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA. (1987), pp. 209–242.
- [2] Josipa FERRI. Otoliths and Their Applications in Fishery Science. *MDPI - Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. (2024 Mar), 270 pp.
- [3] Steven X. CADRIN. Defining spatial structure for fishery stock assessment. *Fisheries Research*. (2020 Jan).
- [4] *ICES Scientific Reports. ICES Stock Identification Methods Working Group (SIMWG)*. 5:101, (2024 Jan), 153 pp.
- [5] Jared VICORY *et al.* Shape AnaLysis Toolbox. In *Shape in Medical Imaging—ShapeMI 2018*; Reuter, M., Wachinger, C., Lombaert, H., Paniagua, B., Lüthi, M., Egger, B., Eds.; *Springer International Publishing: Cham, Switzerland*. (2018), pp. 65–72.
- [6] Li SHEN *et al.* Modeling Three-Dimensional Morphological Structures Using Spherical Harmonics. *Evolution*, 63. (2009), pp 1003–1016.
- [7] Frank P. KUHL *et al.* Elliptic Fourier Features of a Closed Contour. *Computer Graphics and Image Processing*. 18, (1982), pp. 236–258.
- [8] P.E. LESTREL. Fourier Descriptors and Their Applications in Biology. *Cambridge University Press: Cambridge, UK*. (2008), 482 pp.
- [9] Li SHEN and Fillia MAKEDON. Spherical mapping for processing of 3-D closed surfaces. *Image Vision Computing*. 24, (2006), pp. 743–761.
- [10] C. G. BRECHBUHLER *et al.* Parametrization of closed surfaces for 3D shape description. *Computer Vision and Image Understanding*. 61, (1995), pp. 154–170.
- [11] Y. LECUN *et al.* Efficient BackProp. In *Neural networks: Tricks of the trade*, (2012). pp. 9-48.
- [12] F. J. ROHLF and D. SLICE. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic biology*. 39(1), (1990), pp. 40-59.
- [13] F. L. BOOKSTEIN. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. *Cambridge University Press*. (1991).

1.5 Synthèse du chapitre 1

Ce chapitre présente une série de résultats méthodologiques majeurs, obtenus à travers des développements d'analyses d'images des otolithes. Ces avancées contribuent de manière significative à la standardisation des images d'otolithes, nécessaire pour automatiser des processus d'analyse et ainsi renforcer les études sur l'identification des stocks de poissons mais aussi sur la reconnaissance d'espèces actuelles ou passées.

Les premières analyses se sont concentrées sur trois types de jeux de données (otolithe entier de plie, otolithe entier brûlé et non brûlé de rouget barbet de roche, et coupe transversale d'otolithe de morue) pour identifier les biais inhérents aux images acquises en routine. Comme discuté dans la littérature, les images d'otolithes présentent des variations en raison des différences de protocoles d'acquisition d'un laboratoire à l'autre (EASEY et MILLNER, 2008; MAHÉ *et al.*, 2009; VITALE *et al.*, 2019; VANDERKOOY *et al.*, 2020), nécessitant ainsi une standardisation avant toute analyse automatisée des structures (MOORE *et al.*, 2019; MAHÉ *et al.*, 2021).

Pour répondre à cette nécessité, un outil open source a été développé dans un environnement R. Ce programme réalise une série d'étapes de standardisation qui permettent de corriger ces biais : conversion en niveau de gris, détection du contour, individualisation, recadrage, orientation, et production d'une image en noir et blanc standardisée. Cette procédure permet d'harmoniser les images et de créer une base uniforme pour les analyses (FISHER et HUNTER, 2018; MYERS *et al.*, 2020).

La standardisation manuelle des images étant très chronophage et la quantité de données acquise croissante, il est nécessaire d'automatiser l'analyse d'images et transformer les images obtenues en routine en formats standardisés. Dans le premier cas d'étude de cette thèse (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2023b), une méthode de standardisation automatique d'images en 2D d'otolithes a été développée. La méthode a démontré sa capacité à standardiser des images issues de divers processus d'acquisition, en utilisant deux types d'éclairage (lumière réfléchie ou lumière transmise), et en s'appliquant à différentes espèces, ainsi qu'à des otolithes brûlés et non brûlés, venant de 2 instituts différents (français et norvégien). La méthode développée a montré une grande efficacité sur les images où le contraste entre l'otolithe et le fond est marqué. En revanche, lorsque le fond de l'image est plus clair (comme dans les cas d'otolithes capturés avec une exposition standard ou un codage amélioré), l'algorithme montre des difficultés à détecter correctement l'otolithe. Pour les images avec un fond très lumineux, il devient nécessaire de réduire l'exposition. Dans les situations où l'otolithe apparaît plus sombre (comme c'est le cas pour environ 3% des échantillons d'otolithes de morue et 2% des échantillons d'otolithes non brûlés de rouget barbet), il peut être judicieux d'augmenter l'exposition pour améliorer la visibilité de l'otolithe. Cette méthode a été décrite en 5 étapes clés successives : conversion en niveaux de gris, détection des contours et segmentation des images, redimensionnement et binarisation, orientation et alignement, puis extraction des informations morphologiques. La conversion des images d'otolithes en niveaux de gris simplifie les données d'images en réduisant les canaux de couleur à un seul canal. La conversion en niveaux de gris garantit l'uniformité de l'analyse d'images, ce qui facilite l'application d'algorithmes normalisés (LIBUNGAN *et al.*, 2015). Cette étape est essentielle pour améliorer le contraste et rendre les tâches de traitement d'images ultérieures, telles que la détection des bords et la segmentation, plus efficaces et moins gourmandes en ressources informatiques (YOUSSEF *et al.*, 2016). Cette étape réduit la complexité informatique et met en évidence les caractéristiques structurelles de l'otolithe, qui sont cruciales pour les étapes de traitement ultérieures notamment pour détecter les formes et les motifs pertinents pour l'analyse morphologique (GONZALEZ et WOODS, 2018). Pour

améliorer la conversion en niveaux de gris, des techniques avancées d'amélioration de contraste, de seuillage et de filtre pourraient être appliquées. Dans un premier temps, l'application de filtres pour améliorer le contraste avant la conversion peut améliorer la clarté des structures de l'otolithe (SOBEL, 1990). Puis dans un second temps, l'égalisation d'histogrammes peut être employée pour améliorer le contraste, en particulier dans les images avec des conditions variables d'éclairage rendant les caractéristiques de l'otolithe plus faciles à distinguer (PIZER *et al.*, 1987; SAIFULLAH, 2022). La mise en œuvre de méthodes adaptatives qui prennent en compte les variations locales de contraste peut améliorer la visibilité des caractéristiques (ZHIGANG *et al.*, 2023). Des techniques de seuillage adaptatif peut aussi aider à conserver les caractéristiques importantes tout en éliminant le bruit (OTSU, 1979). Dans cette thèse, seule la structure externe de l'otolithe (sa forme) a été étudiée. Pour des études ultérieures, notamment la structure interne de l'otolithe pour estimer l'âge des poissons par exemple, la colorimétrie des otolithes pourrait être une donnée importante. Ce processus de conversion en niveaux de gris entraîne la perte d'informations colorimétriques qui pourraient aider à distinguer les différentes caractéristiques des otolithes. De ce fait, l'incorporation de techniques sélectives de rétention des couleurs pourrait atténuer ce problème (FOLMSBEE *et al.*, 2019). La détection des contours et la segmentation de l'image jouent un rôle crucial dans l'analyse des otolithes en permettant d'isoler ces structures calcifiées de l'arrière-plan et d'autres éléments perturbateurs. En pratique, l'algorithme appliqué identifie et isole les otolithes individuels dans les images. Il effectue la détection des contours à l'aide d'une fonction spécifique en R, qui repère les limites des otolithes. Cette technique est essentielle non seulement pour séparer les otolithes gauches et droits dans les images contenant des paires, mais aussi pour exclure les otolithes cassés, garantissant ainsi que seules les images individuelles d'otolithes entiers seront utilisées (STEVENSON et CAMPANA, 1992). Cette étape permet de distinguer clairement l'otolithe des artefacts environnants et du bruit, facilitant ainsi l'extraction précise des caractéristiques morphologiques pertinentes (CANNY, 1986; ARBELÁEZ *et al.*, 2011). L'algorithme sépare l'otolithe de son arrière-plan en utilisant la différence de seuillage de niveaux de gris. Pour détecter un otolithe cassé, il faut qu'il y ait une paire d'otolithes dans une image, un entier et un cassé, car l'algorithme prend l'aire la plus grande de l'objet et supprime les autres objets. De ce fait, une image avec un ou des otolithes cassés seulement ne fonctionnera pas car l'algorithme va tout de même sélectionner les otolithes cassés avec la plus grande aire. D'une part, la mise en œuvre de mécanismes automatisés de détection des erreurs peut jouer un rôle essentiel en identifiant et en rectifiant les problèmes de segmentation en temps réel, assurant ainsi une fiabilité accrue dans le traitement des données (MISZTAL *et al.*, 2020). Mettre en place des silhouettes prédéfinies sur la forme des otolithes entiers par espèce permettrait de mieux identifier les otolithes cassés en comparant avec ces derniers. En séparant un otolithe sur son axe principal, la partie comprenant l'antirostrum est plus complexe que l'autre partie. Pour déterminer les otolithes gauches ou droits, calculer la complexité de ces deux parties permettrait de différencier l'otolithe, car l'otolithe gauche a son antirostrum à droite et l'inverse pour l'otolithe droit excepté pour le Saint-Pierre (*Zeus Faber*). D'autre part, l'intégration de l'apprentissage automatique, en particulier les réseaux neuronaux convolutifs (CNN), enrichit considérablement la précision de la segmentation en exploitant les capacités d'apprentissage à partir d'ensembles annotés de données (RONNEBERGER *et al.*, 2015). Toutefois, l'application de ces réseaux neuronaux nécessite une grande quantité de données. Par exemple, avec 5 150 images 2D d'otolithes une précision de 72% a été atteinte pour l'estimation de l'âge de la morue en mer de Barents (MOEN *et al.*, 2023) et 72% aussi avec 3 261 images 2D d'otolithes pour le thon rouge du Pacifique (*Thunnus orientalis*) (TSUNG-HSIANG *et al.*, 2024). Cette approche pour-

rait être particulièrement efficace pour traiter un vaste ensemble d'images d'otolithes étiquetées, apprenant à reconnaître et à isoler efficacement les caractéristiques pertinentes comme différencier les otolithes cassés, gauche ou droit. Les réseaux antagonistes génératifs (GAN) (GOODFELLOW *et al.*, 2020) sont aussi une voie possible pour (i) augmenter le volume des bases de données requis pour un apprentissage automatique efficace et (ii) compléter les otolithes cassés. Le redimensionnement des images d'otolithes normalise leurs dimensions, facilitant ainsi l'analyse comparative entre différents échantillons. Cette standardisation des proportions garantit l'uniformité de l'ensemble des données et améliore la cohérence des analyses morphologiques. En plus de normaliser les tailles, le redimensionnement ajuste les proportions des otolithes, ce qui est crucial pour les comparaisons inter-échantillons. Il est essentiel de veiller à ce que le rapport d'aspect des otolithes soit préservé lors du redimensionnement pour éviter toute distorsion de leur forme. L'utilisation de méthodes d'interpolation avancées durant cette étape assure la conservation de l'intégrité des caractéristiques morphologiques, améliorant ainsi la précision des images normalisées (BURT et ADELSON, 1983; GONZALEZ et WOODS, 2018; MOEN *et al.*, 2018). Les images en niveaux de gris sont converties en format binaire, simplifiant notablement l'analyse en réduisant l'image à deux teintes : noir et blanc. Ce processus de binarisation, essentiel pour une extraction précise des caractéristiques, améliore la détection des contours en éliminant les particules blanches externes et en clarifiant l'image (OTSU, 1979; FAHMI *et al.*, 2023). La binarisation, en convertissant les images en noir et blanc, facilite l'application d'autres techniques d'analyses morphologiques en simplifiant l'image (GONZALEZ et WOODS, 2018). Ce processus comprend également des étapes pour affiner l'analyse, telles que le lissage des contours de l'objet, l'ajout de pixels noirs sur les bords pour améliorer la détection des contours, et l'application de l'érosion des pixels pour éliminer les particules blanches non pertinentes à l'extérieur de l'otolithe (FOSSUM *et al.*, 2000). Ces ajustements contribuent à une analyse plus précise et à une meilleure extraction des caractéristiques morphologiques des otolithes. Les techniques de seuillage adaptatif jouent un rôle crucial dans la binarisation des images d'otolithes, en ajustant dynamiquement la valeur du seuil selon les propriétés locales de l'image. Cette approche permet une meilleure segmentation, surtout dans les cas où l'éclairage de l'image est inégal, préservant ainsi les détails importants qui sont cruciaux pour une analyse précise (LIU et SRIHARI, 1997; BRADLEY et ROTH, 2007). L'application de techniques de binarisation adaptatives, qui ajustent les seuils en fonction des variations locales de l'image, contribue également à réduire le bruit et à améliorer la distinction entre l'otolithe et l'arrière-plan. Ces méthodes affinent la conversion binaire, garantissant que les caractéristiques essentielles sont clairement identifiables et que les images résultantes sont optimales pour les analyses subséquentes (NIBLACK, 1986; LEE *et al.*, 2017). L'angle d'orientation de l'otolithe est calculé pour chaque image, et les otolithes sont automatiquement tournés afin d'être alignés le long de l'axe principal, correspondant à l'axe de la plus grande longueur. Cet alignement systématique sur l'axe vertical ($x = 0$) garantit une uniformité entre les images, facilitant ainsi une analyse morphologique précise et consistante des formes (IWATA, 2002). Cette normalisation dans l'orientation et l'alignement des images d'otolithes est nécessaire, car elle assure que toutes les caractéristiques morphologiques sont positionnées de manière cohérente d'une image à l'autre. Ce processus uniformise la présentation des otolithes, réduisant les variations causées par différentes orientations lors de la capture des images, et rendant ainsi les analyses comparatives et la reconnaissance des modèles plus fiables et efficaces (SALEMBIER et PARDAS, 1994). En outre, un alignement cohérent des images d'otolithes est essentiel pour éviter les erreurs de mesure et les mauvaises interprétations des données. Des images mal alignées peuvent en effet conduire à des analyses incorrectes, compromettant la qualité

des études morphologiques et la validité de leurs conclusions (KUHLE et GIARDINA, 1982).

Après les étapes de standardisation des images, vient l'extraction automatique des paramètres univariés et multivariés. À partir des images binarisées obtenues par l'algorithme, des mesures telles que la longueur, la largeur, le périmètre et la surface de l'otolithe sont automatiquement extraites. Ces mesures fournissent une base quantitative précise pour les analyses ultérieures. Pour les chapitres 2, 3 et 4, l'extraction des Descripteurs de Fourier Elliptiques (EFDs) est également réalisée à partir de ces images binarisées. Cette méthode permet de capturer avec précision la complexité de la forme des otolithes, assurant ainsi la rigueur et la reproductibilité des analyses morphométriques à travers les différents chapitres de cette thèse.

Par ailleurs, ce chapitre aborde également le développement de méthodes de reconstruction 3D des otolithes. La reconstruction 3D s'effectue à partir de deux plateformes tomographiques et permet d'obtenir une représentation fidèle des structures externes des otolithes. Les images radiographiques des otolithes ont été acquises à l'aide d'un microtomographe à rayons X (Micro-CT ou μ CT). Le Micro-CT, bien que relativement basique en termes d'équipement, est particulièrement adapté aux petits échantillons de faible densité. Les échantillons analysés peuvent mesurer jusqu'à 50 mm de long et 30 mm de diamètre, ce qui permet d'inclure une gamme assez large de tailles d'otolithes. La résolution spatiale obtenue avec la Micro-CT est généralement élevée, offrant des détails fins des structures externes, ce qui en fait un outil puissant pour les études nécessitant une visualisation précise des microstructures des otolithes. Toutefois, il présente certaines limitations, notamment un temps d'acquisition relativement long, pouvant atteindre environ 45 minutes par échantillon de 10 individus. De l'acquisition à la standardisation, le processus prend environ 11 minutes par otolithe en 3D contre environ 2 minutes par otolithe en 2D. Cette durée peut varier en fonction de la résolution désirée et de la densité de l'otolithe. Il est recommandé d'ajuster et d'optimiser les paramètres du microtomographe en fonction de la taille de l'otolithe et des objectifs spécifiques de l'étude pour maximiser l'efficacité tout en conservant la qualité nécessaire. L'optimisation des paramètres de la microtomographie à rayons X est cruciale pour équilibrer le temps d'acquisition des images et la résolution des détails morphologiques. Par exemple, pour des otolithes de grande taille ou lorsque le temps d'acquisition est une contrainte majeure, il peut être judicieux de réduire la durée du balayage en augmentant la taille des voxels et en diminuant le nombre de pas de rotation. Une taille de voxel plus grande, qui correspond à une unité volumétrique dans l'image 3D, permet de couvrir une plus grande portion de l'échantillon par balayage, ce qui réduit le temps total nécessaire pour scanner l'ensemble de l'otolithe. De même, un pas de rotation plus petit (c'est-à-dire une rotation plus rapide entre chaque acquisition d'image) peut accélérer le processus de capture. Cependant, ces ajustements ne sont pas sans conséquences. L'augmentation de la taille des voxels et la réduction du pas de rotation peuvent entraîner une perte de résolution spatiale et de précision dans les images obtenues. Cela signifie que les détails fins, tels que les microstructures externes des otolithes, pourraient être moins discernables, ce qui peut compromettre l'exactitude des analyses morphométriques. Par conséquent, il est essentiel de trouver un équilibre entre la résolution requise pour répondre aux objectifs de l'étude et le temps d'acquisition disponible. Pour les études nécessitant une analyse fine des structures de l'otolithe, il est préférable de maintenir une résolution élevée, même si cela implique un temps de balayage plus long. En revanche, pour des études où la forme globale de l'otolithe est plus importante que les détails fins, une réduction de la résolution et une accélération du balayage peuvent être acceptables. Dans ce contexte, l'optimisation des paramètres doit toujours être guidée par les priorités scientifiques de

l'étude, en veillant à ne pas sacrifier la qualité des données essentielles à l'analyse. L'utilisation de tests préliminaires avec différents réglages de balayage peut aider à déterminer les paramètres optimaux avant de procéder à l'acquisition complète des données. La plupart des outils d'analyse de forme, tels que les descripteurs de Fourier, nécessitent généralement que les objets 3D soient fermés et continus pour pouvoir traiter efficacement les données de maillage. Ces outils sont conçus pour analyser les contours et les surfaces des objets, ce qui devient problématique lorsque des anomalies tels que des trous, des artefacts ou des éléments isolés sont présents dans le maillage 3D. Ces anomalies peuvent résulter de divers facteurs, notamment des erreurs lors de l'acquisition des données, des problèmes de segmentation, ou des limitations de la résolution des microtomographes utilisés pour capturer les structures internes complexes des otolithes. Pour résoudre ces problèmes, il est crucial d'identifier et de corriger les défauts dans les maillages 3D avant de procéder à l'analyse de forme. Un algorithme R a été développé pour détecter ces anomalies dans les maillages, telles que des trous, des arêtes ou des sommets détachés (ou non-manifold), ainsi que des éléments non désirés (artefacts) qui ne sont pas liés à l'otolithe mais qui apparaissent lors de l'acquisition des images (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2024c). Pour identifier les maillages avec des trous, une approche basée sur la caractéristique d'Euler et le genre de l'objet a été utilisée. La caractéristique d'Euler est une propriété topologique qui aide à déterminer si un objet est fermé et sans trous en calculant une valeur basée sur le nombre de sommets, d'arêtes et de faces dans le maillage. Les maillages avec des trous ont une caractéristique d'Euler qui diffère de celle d'un objet fermé, ce qui permet de les identifier efficacement. Une fois que les maillages avec des trous ont été identifiés, plusieurs approches peuvent être adoptées pour les corriger. Pour le cas où le trou est supposé naturel (provenant de la structure de l'otolithe), les maillages endommagés peuvent être simplement supprimés. Cependant, lorsque les trous sont supposés artificiels (provenant de problème d'acquisition ou de reconstruction), une reconstruction des maillages peut être nécessaire. Cette reconstruction peut être effectuée en réajustant la plage de seuils dans 3DSlicer. Le réajustement des seuils permet de combler les trous et de s'assurer que les surfaces sont continuées.

Pour traiter les artefacts isolés, qui peuvent inclure des fragments de maillage ou des particules détachées qui ne font pas partie de l'otolithe, les fonctions du package Rvcg (R Vertex and Face Convergence and Geodesics) (SCHLAGER, 2017) ont été utilisées. Ce package, qui est intégré à l'environnement R, offre des outils sophistiqués pour la manipulation des maillages, y compris la suppression des éléments isolés et le nettoyage des données pour produire des objets 3D propres et prêts pour l'analyse de forme. L'utilisation de ces outils garantit que les maillages sont conformes aux exigences des descripteurs de Fourier et d'autres méthodes d'analyse de forme, permettant ainsi une évaluation précise et fiable des caractéristiques morphologiques des otolithes.

Qu'il s'agisse d'analyser des images 2D ou des formes de maillage 3D, la normalisation des données joue un rôle crucial dans la capacité à comparer les données entre différentes entrées de manière cohérente et précise. La normalisation est un processus essentiel qui garantit la qualité, la cohérence et la comparabilité des données en ajustant leur distribution par divers moyens, notamment la normalisation, le centrage à zéro et la standardisation (LECUN *et al.*, 2012). Ces techniques permettent de réduire les variations inutiles et de s'assurer que les données sont comparables entre elles, ce qui est fondamental dans les analyses morphométriques où des différences minimales peuvent avoir des implications significatives. Dans l'analyse morphométrique, l'alignement des formes est une étape préliminaire nécessaire pour minimiser les différences de position, d'orientation et d'échelle avant de procéder à des comparaisons significatives des formes (ROHLF et SLICE, 1990; BOOKSTEIN, 1992). Cet alignement implique la superposition des formes de manière à ce

que les variations entre les différents échantillons soient principalement attribuées aux différences morphologiques plutôt qu'à des artefacts liés à la position ou à l'échelle. Par exemple, dans l'analyse de forme 3D d'otolithes, des différences subtiles dans l'orientation ou la taille peuvent fausser les résultats de l'analyse si les formes ne sont pas correctement alignées. L'utilisation d'algorithmes de procrustes généralisés, par exemple, permet de superposer les formes en minimisant les écarts de translation, de rotation et de mise à l'échelle, garantissant ainsi que les différences observées entre les formes sont véritablement représentatives des différences biologiques et non des artefacts de mesure (ZELDITCH *et al.*, 2004). Ces étapes sont particulièrement utiles dans le contexte de l'apprentissage automatique, où des algorithmes comme les réseaux de neurones sont très sensibles aux écarts de grande amplitude dans les données d'entrée. En les standardisant, on peut améliorer la convergence des algorithmes automatique et réduire les risques de sur-apprentissage, ce qui permet une meilleure généralisation des modèles (LECUN *et al.*, 2012). Par conséquent, ces étapes sont non seulement vitales pour la qualité des données, mais elles accélèrent également le processus d'apprentissage et augmentent l'efficacité des inférences effectuées par les modèles. Ces processus de standardisation et d'alignement sont essentiels pour plusieurs raisons pratiques. Tout d'abord, ils améliorent considérablement la qualité des données pour des tâches telles que le nettoyage des données, où il est crucial de détecter et de corriger les anomalies. Ensuite, dans le cadre du profilage et de l'appariement des données, ces techniques permettent une correspondance plus précise des formes et des caractéristiques morphométriques, ce qui est essentiel dans les études de diversité et de classification des formes. En outre, ces processus facilitent la mise en correspondance des données différentes (non standardisées), rendant possible des études comparatives à grande échelle qui seraient autrement biaisées par des variations non pertinentes dans les données.

L'utilisation des Ellipses Sphériques de Fourier (SPHARM), comparable aux ellipses de Fourier pour les analyses 2D, permet d'analyser de manière très précise la morphologie des otolithes en 2D et 3D à partir de la même méthode d'extraction de l'information contenue dans la forme externe. Comme le souligne ce chapitre, ce passage à une analyse tridimensionnelle résout les limitations des méthodes traditionnelles et permet une caractérisation plus robuste des otolithes (DUAN *et al.*, 2019).

Dans un contexte plus large, cette standardisation facilite l'utilisation de l'apprentissage profond pour la classification automatisée (intelligence artificielle), une avancée cruciale pour l'automatisation de l'âge, qui nécessite des bases de données massives et homogènes (BENZER *et al.*, 2022; POLITIKOS *et al.*, 2021). Le protocole développé dans cette thèse peut, en effet, traiter jusqu'à une image par seconde, surpassant de loin le temps requis par les méthodes manuelles (jusqu'à quatre minutes par image). Une telle efficacité est essentielle pour répondre aux besoins de standardisation entre les centres de recherche qui analysent des dizaines de milliers d'images par an, comme c'est le cas au pôle national de Sclérochronologie de l'Ifremer.

En conclusion, ce chapitre démontre les processus d'acquisition et de standardisation des images d'otolithes (figure 1.2). Elle sont fondamentales pour garantir la qualité et la comparabilité des données dans les études morphométriques et les applications d'intelligence artificielle. Les améliorations apportées par ce protocole ouvrent la voie à une classification plus précise et rapide, ainsi qu'à des analyses avancées des formes externes des otolithes en 3D, qui pourront se généraliser à d'autres domaines de la vision par ordinateur et de l'analyse morphologique (LEE *et al.*, 2017; FOLMSBEE *et al.*, 2019; MISZTAL *et al.*, 2020). Les analyses ultérieures réalisées dans cette thèse s'appuieront entièrement sur ces protocoles d'acquisition et de standardisation des données. Ces étapes préliminaires sont essentielles pour garantir la qualité et la cohérence des données avant

d'aborder les phases suivantes. Les travaux porteront ensuite sur la classification et l'exploration détaillée de la forme des otolithes, avec plusieurs axes d'étude. Parmi ceux-ci figurent l'analyse de l'asymétrie des otolithes, l'identification des stocks de poissons, et la reconnaissance des différentes espèces. Ces études permettront de mieux comprendre les relations entre la morphologie des otolithes et les caractéristiques biologiques et écologiques des poissons.

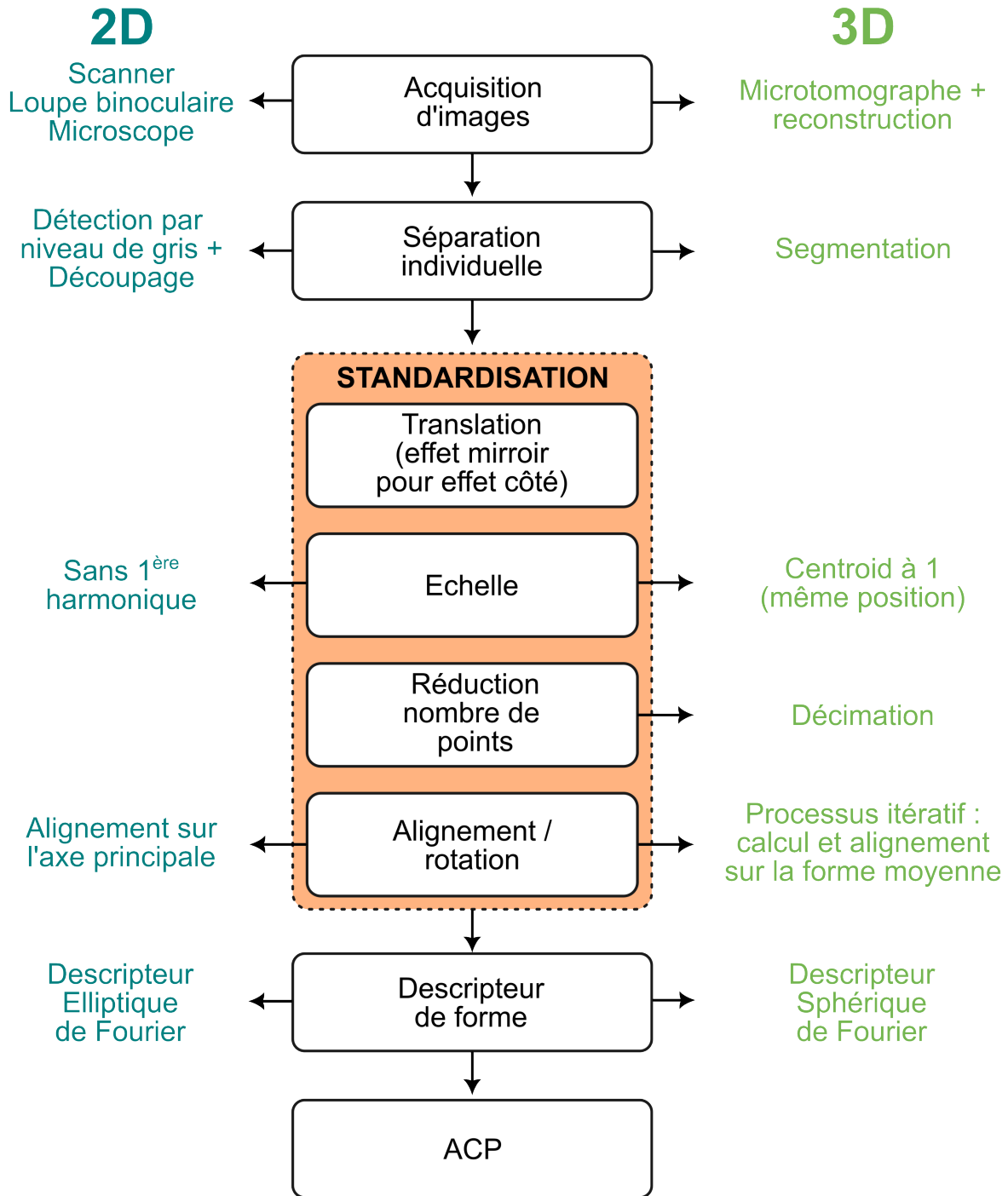


FIGURE 1.2 – Synthèse des méthodes d’analyse 2D et 3D pour la standardisation des otolithes. En 2D, les étapes incluent la détection par niveau de gris, découpage, et avec un alignement sur l’axe principal. Les descripteurs de forme sont obtenus par analyse de Fourier elliptique. En 3D, la reconstruction est effectuée avec un microtomographe, suivie de la segmentation et d’un processus de décimation. Le centrage est assuré par un calcul itératif et un alignement sur la forme moyenne. Les descripteurs de forme sont obtenus par analyse de Fourier, suivie d’une ACP pour les deux approches.

Chapitre 2 Effet de l'asymétrie directionnelle entre otolithes gauche et droit observé et comparé en 2D et en 3D

2.1 Introduction du chapitre 2

Après avoir développé dans le Chapitre 1, des protocoles de standardisation pour l'analyse des images d'otolithes en 2D et 3D, ce second chapitre s'intéresse à l'influence de l'asymétrie bilatérale qui peut entraîner une différence et donc un biais significatif sur les conclusions des études d'analyse morphologique des otolithes pour discriminer les stocks de poissons pour certaines espèces de poissons plats et ronds (MAHÉ, 2019). Cette asymétrie bilatérale individuelle se caractérise par des formes significativement différentes entre les otolithes gauche et droit pour un même individu.

La connaissance précise des limites des unités de stock (permettant d'identifier la taille ou l'emprise géographique des stocks) est essentielle à une gestion durable des ressources halieutiques, car chaque stock réagit différemment à la pression de pêche et aux mesures de gestion (BEGG et WALDMAN, 1999; BERG *et al.*, 2021). Une mauvaise identification des stocks peut mener à une exploitation excessive et compromettre la viabilité des ressources (BEGG et WALDMAN, 1999; BERG *et al.*, 2021). La forme des otolithes, influencée par des facteurs environnementaux et génétiques (WILSON, 1985; MORALES-NIN, 1987; MOSEGAARD *et al.*, 1988; SECOR et DEAN, 1989; CAMPANA et CASSELMAN, 1993; LOMBARTE et LLEONART, 1993; BEGG *et al.*, 2001; LOMBARTE *et al.*, 2003; CARDINALE *et al.*, 2004; VIGNON et MORAT, 2010; VIGNON, 2015; MAHÉ, 2019), constitue un indicateur clé pour distinguer des populations de poissons, surtout dans le contexte des méthodes d'identification des stocks, où l'analyse morphologique se révèle moins coûteuse que les analyses génétiques et permet donc d'utiliser souvent des nombres d'individus très grands par rapport aux analyses génétiques pouvant ainsi augmenter la puissance statistique des analyses (CADRIN *et al.*, 2014).

De plus, la représentation 2D d'un otolithe, utilisée jusqu'à maintenant se base sur l'hypothèse que cette vue 2D est représentative de l'otolithe 3D mais cela peut introduire un biais potentiel dans l'analyse de sa forme, car cette projection 2D ne capte qu'un seul plan de l'objet 3D (BIRD *et al.*, 1986). Il devient donc nécessaire d'évaluer et de comparer les données en 2D et en 3D pour identifier ce biais potentiel pour le prendre en compte dans le futur. Par ailleurs, des asymétries observées entre les otolithes gauche et droit chez plusieurs espèces ajoutent un niveau de complexité pour la discrimination des stocks (MILLE *et al.*, 2015; MILLE, 2015; PALMER, 2016; MAHÉ *et al.*, 2018). Ce chapitre se concentre ainsi sur la comparaison de l'asymétrie en 2D et en 3D des otolithes du rouget barbet, espèce représentative économiquement de la mer Méditerranée, afin de vérifier si le taux d'asymétrie observé en 2D est comparable à celui en 3D des mêmes individus et donc de la robustesse de l'utilisation de la forme 2D comme proxy de la forme globale 3D (figure 2.1). Deux études plus conventionnelles ont été réalisées et sont présentées en Annexe de cette thèse sur l'asymétrie observée en 2D chez 2 espèces présentes dans les eaux chaudes de l'Afrique de l'Ouest (golfe de Guinée).

Ce chapitre propose ainsi d'explorer comment l'asymétrie directionnelle peut affecter la mor-

phologie des otolithes et la précision de leur utilisation dans l'identification des limites géographiques des stocks de poissons (figure 2.1). C'est la première fois qu'une étude compare les résultats 2D et 3D de forme de l'otolithe pour des mêmes individus chez une espèce. Elle offre ainsi une transition essentielle entre la standardisation méthodologique du premier chapitre et l'application de ces protocoles à des fins de recherche appliquée en écologie et gestion halieutique du troisième chapitre de cette thèse.

Rouget barbet de vase



Asymétrie (gauche & droit) ?

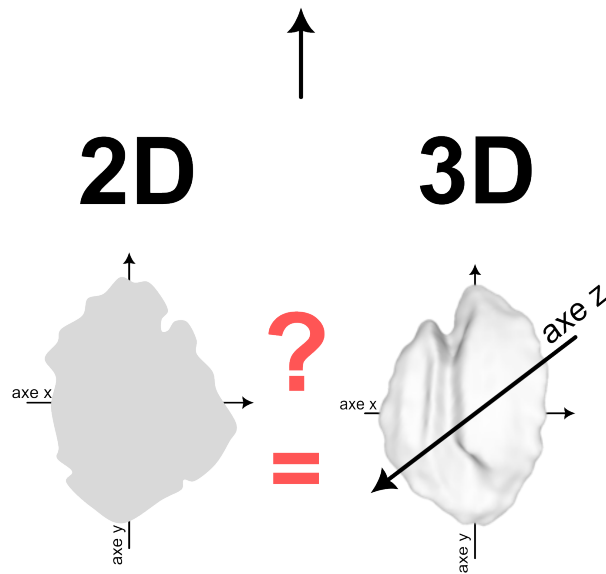



FIGURE 2.1 – Analyse de l'asymétrie entre otolithes gauche et droit du rouget barbet de vase, pour évaluer d'éventuelles différences de forme en 2D et en 3D. La comparaison des otolithes en 2D et en 3D permet d'étudier cette asymétrie, avec pour objectif de déterminer si les deux méthodes fournissent des résultats équivalents en termes de précision et de représentation de la forme.

2.2 Asymétrie de la forme de l'otolithe sagittal en fonction du côté de l'oreille interne testée sur le rouget barbet de vase en Méditerranée (*Mullus barbatus*)

L'article suivant a été publié dans la revue Symmetru en 2023. Il étudie si il existe un effet côté dans les otolithes d'une même espèce.

Article

Asymmetry of Sagittal Otolith Shape Based on Inner Ear Side Tested on Mediterranean Red Mullet (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758): Comparative Analysis of 2D and 3D Otolith Shape Data

Nicolas Andrialovanirina^{1,2}, Émilie Poisson Caillault¹, Sébastien Couette^{3,4}, Rémi Laffont⁴, Lauriane Poloni^{3,4}, Camille Lutet-Toti^{4,5} and Kélig Mahé^{2,*} 

- ¹ UR 4491, LISIC, Laboratoire d'Informatique Signal et Image de la Côte d'Opale, University of the Littoral Côte d'Opale, 62100 Calais, France; nicolas.andrialovanirina@ifremer.fr (N.A.); emilie.poisson@univ-littoral.fr (É.P.C.)
- ² IFREMER, Fisheries Laboratory, 150 quai Gambetta, 62321 Boulogne-sur-Mer, France
- ³ Ecole Pratique des Hautes Etudes, PSL Université, 75014 Paris, France; sebastien.couette@ephe.psl.eu (S.C.); lauriane.poloni@ephe.psl.eu (L.P.)
- ⁴ UMR CNRS 5561 Biogéosciences, Université de Bourgogne, 6 Bld Gabriel, 21000 Dijon, France; remi.laffont@u-bourgogne.fr (R.L.); camille_lutet-toti@etu.u-bourgogne.fr (C.L.-T.)
- ⁵ Alma Mater, Studiorum–Università di Bologna, 40126 Bologna, Italy
- * Correspondence: kelig.mahé@ifremer.fr; Tel.: +33-321-995-600



Citation: Andrialovanirina, N.; Caillault, É.P.; Couette, S.; Laffont, R.; Poloni, L.; Lutet-Toti, C.; Mahé, K. Asymmetry of Sagittal Otolith Shape Based on Inner Ear Side Tested on Mediterranean Red Mullet (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758): Comparative Analysis of 2D and 3D Otolith Shape Data. *Symmetry* **2023**, *15*, 1067. <https://doi.org/10.3390/sym15051067>

Academic Editor: John H. Graham

Received: 15 April 2023

Revised: 29 April 2023

Accepted: 4 May 2023

Published: 11 May 2023



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

Abstract: Sagittal otolith shape analysis is one of the most widespread techniques worldwide to discriminate fish stock units, as this proxy integrates both environmental and genetic factors. All previous otolith shape studies have been carried out using two-dimensional (2D) images, a partial representation of the whole shape of the otolith. However, prior to the identification of stock unit boundaries, the influence of other potential drivers controlling the otolith shape must be analysed to limit their bias. In this study, the presence of asymmetry in otolith shape depending on the inner ear side (i.e., left versus right inner ears) was tested by comparing the approaches of 2D and three-dimensional (3D) sagittal otolith shape analyses. Eighty-two red mullet adults (*Mullus barbatus*) from three locations in the eastern part of the Mediterranean Sea were studied. Fourier harmonic descriptors computed from 2D outlines and spherical harmonic descriptors computed from 3D meshes were used to evaluate otolith shape variation. The results of a multivariate mixed-effects model from 2D images showed that there was no asymmetry effect of inner ear side on the otolith shape in any location. There was, however, a significant geographical effect for the 2D otolith shape between the Adriatic Sea and the Levantine Sea. In contrast, 3D information showed that both side effects and geographical differences were significant. This is the first study comparing 2D and 3D data showing different results on the same sample of red mullet. These results demonstrate the importance of 3D otolith shape analysis for stock discrimination.

Keywords: otolith shape; Fourier analysis; 2D; 3D; effect of inner ear side

1. Introduction

The level of fishery resource exploitation remains high, with stocks fished at biologically sustainable levels falling from 90% to 65.8% between 1974 to 2017 [1]. A fish stock unit (called “stocks” in this study) is defined by all individuals presenting similar phenotypic and genetic compositions [2–4]. Around 59.6% of fisheries stocks are at the maximum sustainable level of exploitation; however, the global catch trend has been relatively stable since 1980 [1]. In 2020, 52% of stocks caught by French vessels were healthy fish stock or sustainable (9% of stocks were healthy fish stock in 2000) [5]. Efforts to implement fishery management measures and research developments on fish stocks and resources

have enabled these advances in sustainability. The effectiveness of fishery management depends on the correct delineation of the stocks, which is a prerequisite for the study of the dynamics and structure of fishery management units [3,4,6–8]. Each stock responds differently to fishing pressure and management measures. Misidentification of stock units can lead to poor management results, increasing overfishing risks [9,10]. In addition, these stocks are considered the basic unit for evaluation of fishery resources and their sustainable levels of exploitation [1,11–13].

There are several methods to define fish stocks [14], including genetic markers [15,16], natural markers such as parasites [17–19], growth rates and fatty acids in tissues [20], life history traits, external tags, or microchemistry [4,6]. Sagittal otolith shape and microchemistry are widely used proxies for stock identification in many fish species, employed either separately or in combination [4,6,14,21]. Otolith shape is a very efficient tool to identify the stock structure of fishes [14], as it results from a combination of environmental conditions [22–27], genetic heritage [8,26–32], and ontogenetic evolution [8,33,34]. Additionally, variations in the shape of otoliths between the inner ear can provide interspecific [35] and intraspecific [36] fish differentiating.

The otolith is a calcified structure located in the vestibular system of the inner ear. Otoliths are metabolically inert structures, i.e., they cannot be altered or generally resorbed [37]. The primary research use of the otolith is to provide the age data necessary for age-structured models. Since Reibisch (1899) [38], many studies have used otoliths as tools in fishery sciences. These structures are regarded as natural archives, meaning that past environmental and climatic information, together with the life history of the individual, are recorded permanently [26,39].

Recent advances in image analysis, processing, and free libraries [40] have reinforced the use of otoliths for fish research. Importantly, otolith shape analysis is much less costly than genetic analysis for stock identification purposes [6]. The main method used to describe the shape of an otolith is standardized elliptic Fourier analysis, which integrates the real external outline [14]. Otolith shape is generally extracted from the two-dimensional (2D) images [41], but a 2D image represents only one projection plane of a three-dimensional (3D) object. A potential bias could therefore exist due to the object position during 2D acquisition. Consequently, the comparison of 2D and 3D data needs to be performed in order to estimate this potential bias. Several previous studies have used otolith weight as an estimator of shape proxy [42–47], but otoliths can have different shapes for a given weight. However, stock discrimination using the 3D shape of the otolith has not yet been performed. Studies on the 3D otolith have been focused on scans and/or extraction of otolith shape in three dimensions [48–52], and on understanding the functional role and evolution of the inner ear and the otolith with sound effects [53–56].

In contrast to flatfish, roundfishes generally show no asymmetry between left and right otoliths, caused mainly by the developmental canalization process [8,57]. Some of those studied species do, however, have a significant difference between the left and right otolith shapes [8,58,59]. Such differences could lead to misidentification of stock, as shown in the Mediterranean Sea for bogue (*Boops boops* Linnaeus, 1758) [60]. For red mullet (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758), only one study has been carried out in the gulf of Lions (North-West of Mediterranean Sea), where 2D analysis showed that the left and right otoliths are symmetrical [57].

The aims of this paper are (1) to test the potential bias of inner ear side differences in comparing left and right inner ear sagittal otoliths of the specimens between 2D and 3D approaches, and (2) to compare morphological variation of otoliths according to the geographical effect (i.e., boundaries of the stock units) analysed in two and three dimensions. The case study species is the red mullet (*Mullus barbatus*), which is one of the main commercial fish species in the Mediterranean Sea [61].

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

Sampling was carried out during the Mediterranean International Trawl Survey (MED-ITS survey) from 2019 [62]. Eighty-two fish were sampled, distributed over three geographical sub-areas (GSAs defined by the General Fisheries Commission for the Mediterranean, GFCM) in the eastern part of the Mediterranean: 29 individuals in the Adriatic Sea (GSA-18c), 30 individuals in the Aegean Sea (GSA-22b), and 23 individuals in the Levantine basin (GSA-27b) (Figure 1). To minimize any ontogenetic effect on the otolith shape, all individuals were selected in the total length range between 141 and 212 mm (mean = 167 ± 16 mm), corresponding to young mature fishes. Both left and right whole sagittal otoliths were collected for each individual. The otolith extraction was performed by an experienced person to prevent breaking. The otoliths were carefully cleaned and transported to the laboratory using micro-tubes to avoid damage and/or dirt.

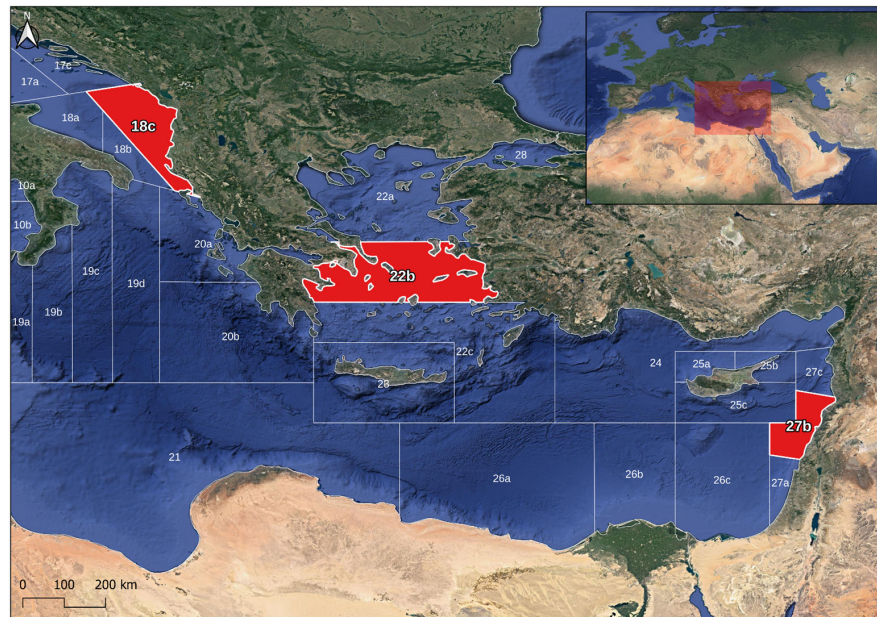


Figure 1. Fish sampling distribution in Mediterranean Sea in red areas; numbers correspond to the General Fisheries Commission for the Mediterranean GSA and letters to the subdivision of GSA.

2.2. Two-Dimensional Outlines and Three-Dimensional Surfaces

Prior to image acquisition, sagittal otoliths were cleaned in water. A binocular microscope (Leica MZ6, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) was used to acquire the calibrated images with 1.6 magnification (SONY XCD-U100CR Camera, Sony, Tokyo, Japan) under reflected light. An R algorithm was developed to standardize all otolith images [63]. This algorithm consists of several steps: similar orientation and binarization, application of mirror effect to the right otolith images (Figure 2), and outline extraction of binarized images.

Acquisition of 3D sagittal otolith images was carried out with an X-ray microtomograph. Two-dimensional X-ray images of the otolith were acquired at different angles (with regular rotation step from 0° to 180°) expressing differences in density between the otoliths and the air. Supplementary Table S1 shows the scan parameters used in this study with μ CT Skyscan 1174 (Bruker, Kontich, Belgium), with $800 \mu\text{A}$ intensity, 50 kV of tension, and $29.2 \mu\text{m}$ of voxel size.

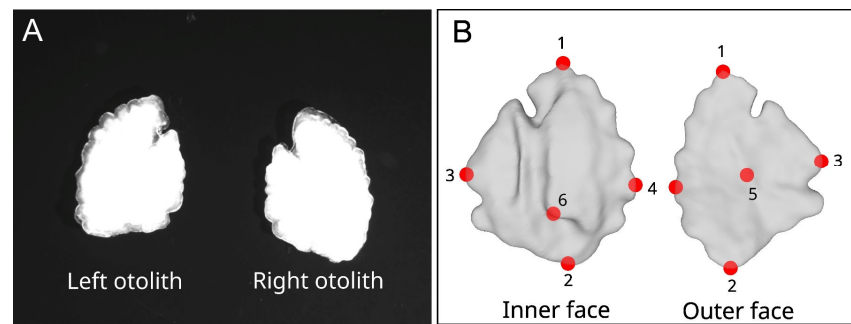


Figure 2. (A) 2D image with left and right inner ear side otoliths; (B) 3D volumes with left otolith in inner and outer face with six landmarks (red points, 1 on the *rostrum*, 2 on the *postrostrum*, 3 at the end of dorsal, 4 at the tip of ventral, 5 on the middle of outer face of the otolith, 6 on top of the *sulcus acusticus*).

Then, reconstruction was performed with Nrecon software (Bruker, Kontich, Belgium) to transform the X-ray images into virtual slices. Fiji software was used to compress and combine images into a single file (.nifti) while preserving the image properties. A segmentation was finally performed with 3D Slicer to extract the otolith isosurfaces as 3D meshes. A mirror transform was also applied to the right otoliths.

Six landmarks were digitized on the sagittal otolith meshes using digit3DLand [64] (Figure 2). Those landmarks will be used in the Spharm analyses [65] (Matlab functions using the Spharm analysis has been translated to R language) to pre-align the meshes.

2.3. Two-Dimensional and Three-Dimensional Extraction of Shape Information

Elliptic Fourier analysis [66,67] was performed on the outlines of each otolith in order to analyse them in 2D. Momocs R-package version 1.3.2 [68] was used to compute all the elliptic Fourier descriptors (EFDs) from the otolith contours. To standardize the outlines, a constant number of points was taken with the same distance between the points ($n = 200$; coefficients may be biased if the number of points per contour is different). Each contour was described by the signals given by the parametric functions $x(\Theta)$ and $y(\Theta)$ [68], passing through all points from the same starting point of the otolith (on the *rostrum*). For each otolith, the first 99 elliptical Fourier harmonics (H) were extracted, normalized to the first harmonic, and made invariant to otolith size, rotation, and starting point of contour description [66]. The cumulated Fourier Power (F) for each individual otolith was calculated as a measure of the precision of contour reconstruction obtained with n harmonics (i.e., the proportion of variance in contour coordinates accounted for by the n_k harmonics) to determine the number of harmonics required to reconstruct the otolith outline:

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

where A_i , B_i , C_i , and D_i are the coefficients of the H_i harmonic. $F(n_k)$ and n_k were calculated for each individual otolith k to ensure that the contours were reconstructed with a precision of 99.99% [67]. The maximum number of harmonics, $n = \max(n_k)$ across all otoliths, was then used to reconstruct the contours of each individual otolith and all the 2D analysis.

To extract the 3D Fourier coefficients, the Spharm analysis with Matlab function was coded in the R language. First, the surface of each mesh was described using three parameterized variables, $x(\Theta, \Phi)$, $y(\Theta, \Phi)$, and $z(\Theta, \Phi)$ [69] (as shown in Figure 3). Next, each mesh was mapped onto a reference unit sphere using the CALD spherical parameterization algorithm [70]. In order to make the surfaces homologous between otoliths, the meshes were registered using six landmarks. A global average shape for each side (left or right) was calculated iteratively, and all individuals were aligned to this reference shape. Finally,

the spherical Fourier coefficients were calculated from the otoliths mapped onto a sphere and aligned using the six homogenous points. The standardization process for all of these methods involved using 502 vertices per otolith, with 1000 triangles with 325 decimations, 11 harmonics (or degree), and 4 icosahedral subdivisions.

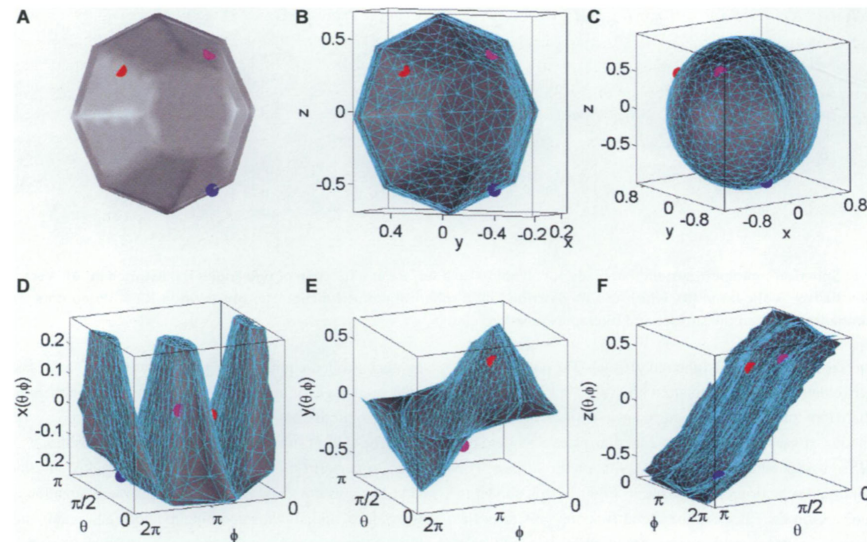


Figure 3. 3D object shape described by three spherical functions $x(\theta, \Phi)$, $y(\theta, \Phi)$, and $z(\theta, \Phi)$ (made by [69]). (A) A sample object surface (i.e., a bowl), (B) its mesh representation, (C) its spherical parameterization, and (D–F) three spherical functions that describe the bowl. Coloured dots show the mappings among the object surface, the parameterization, and the three spherical functions.

2.4. Statistical Analysis

The Euclidean distance (Ed) [68] was calculated on both the 2D and 3D EFDs to measure the difference in otolith shape between the left and right inner ear of each individual:

$$Ed = \sqrt{\sum_{i=1}^n (\text{left.signal}_i - \text{right.signal}_i)^2} \quad (2)$$

where n is the number of signals, the distance between each left and right otolith signal was calculated. An average of these distances was then calculated per geographical location (GSA).

Two steps were processed in order to analyse how 2D or 3D otolith shapes depend on inner ear side or fish location. Firstly, Principal Components Analysis (PCA) was applied to the EFDs matrix from 2D and 3D images of the otolith [71]. Significant principal components (PCs) were then selected as otolith shape descriptors according to the broken stick model [72]. The method was based on the assumption that the distribution of the variance is random, and the components were selected in order of their contribution to the total variance [72]. The significant PCs are those that exceed the expected value of the variance based on the random distribution. This procedure allowed decreasing of the number of variables used to describe otolith shape variability while ensuring that the main sources of shape variation were kept, and to avoid co-linearity between shape descriptors [71]. This technique allows the main sources of variation in shape to be retained.

Secondly, a multivariate mixed-effects model was used to test the inner ear side (*SI*) and geographical zone (*GSA*) effects on the shape of the otolith in 2D and 3D analysis (*O*, i.e., the matrix of selected PCs):

$$O \sim \alpha_0 + \alpha_1 SI + \alpha_2 GSA + \alpha_3 SI.GSA \quad (3)$$

where side effect (*SI*) and geographical effect (*GSA*) and their interactions were considered fixed effects (only the slope has been tested, not the origin), while individual was considered a random effect on the slope. The analysis of variance (ANOVA) was performed using the mixed-effects model and generates a statistical test known as “Chi-square” (or χ^2). This statistic measures the difference between the estimated variance of the random effects of the model and the residual variance (or error). A pairwise test was performed on the geographical location to determine if there were any shape differences between each *GSA*s. Statistical analyses were performed using the following packages in the statistical environment R [40]: ‘abind’ [73], ‘car’ [74], ‘digit3Dland’ [64], ‘effects’ [75], ‘ggplot2’ [76], ‘lme4’ [77], ‘Matrix’ [78], ‘Momocs’ [68], ‘nlme’ [79,80], ‘pracma’ [81], ‘rgeos’ [82], ‘rgl’ [83], ‘Rvcg’ [84], ‘sp’ [85], ‘vegan’ [86].

3. Results

The acquisition of 2D images took about two minutes per otolith, while the acquisition time was about 11 min per otolith for 3D images. In addition, image analysis time was two minutes and four minutes per otolith for 2D and 3D images, respectively. However, it should be taken into account that these calculation times depend on the performance of the 3D scan device and computer used.

The first 33 harmonics were used in 2D images on EFDs analysis, and 11 harmonics in 3D images. After performing PCA on the EFDs mentioned earlier, the broken-stick model was used to select 24 and 15 PCs in 2D and 3D, respectively. This approach helped to retain the main sources of variation in shape by reducing the number of variables used. In 2D analysis, 24 PCs explained 72% of the total variance of the otolith shape, whereas in the 3D EFDs, 15 PCs explained 68% of the variance.

Table 1 showed the results of the multivariate mixed-effects models from 2D and 3D analysis.

Table 1. Results of multivariate mixed-effects models on the otolith shape matrix *O*.

Type of Data	Response Variable	Explanatory Variable	χ^2	Df	<i>p</i> -Values
2D	PCs	PCs	436,088.849	24	<0.001 ***
		PCs:SI	27.216	24	0.290
		PCs:GSA	921.882	48	<0.001 ***
		PCs:SI:GSA	66.359	48	0.087
3D	PCs	PCs	0.289	15	0.134
		PCs:SI	42.967	15	<0.001 ***
		PCs:GSA	83.682	30	<0.001 ***
		PCs:SI:GSA	67.176	30	<0.001 ***

*** highly significant effect.

The model showed that there was no significant effect of inner ear side (left/right, *SI*) on the otolith shape in 2D ($\chi^2 = 27.216$, *p*-value = 0.290 with Anova). Two-dimensional analysis showed a significant geographical effect (i.e., *GSA*) on the otolith shape. For 2D otolith shape, the side effect increased from the central area to the eastern part of the Mediterranean Sea (Figure 4). The difference in shape between the left and right inner ear otoliths was relatively consistent for the red mullets located in the west (18c) and centre (22b), while the specimens in the eastern *GSA* (27b) exhibited a greater difference than those in the other two sub-areas (Figure 4). The pairwise test showed that all geographical

locations had a significant difference between them (p -value < 0.001 for all with Anova). However, there was no significant interaction of side (SI) with sub-areas (GSA) on the shape of the otolith in 2D analysis ($\chi^2 = 66.359$, p -value = 0.087 with Anova).

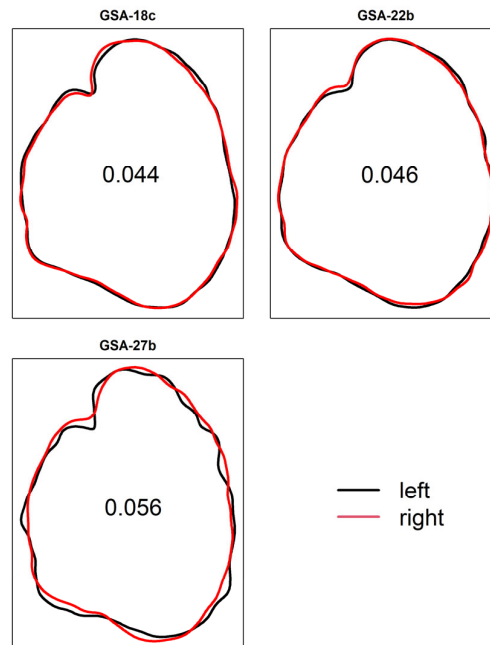


Figure 4. Average difference between the left and right otolith by geographical location of red mullet in a 2D image with Euclidean distance.

The model for the 3D analysis of the shape showed that the side effect (SI) had a significant effect on the shape ($\chi^2 = 42.967$, p -value < 0.001 with Anova). The results from the 3D analysis also indicated a notable influence of geographic location on the shape of the otolith ($\chi^2 = 83.682$, p -value < 0.001 with Anova). There was a significant interaction between the inner ear side (SI) and the geographical location (GSA) on otolith shape ($\chi^2 = 67.176$, p -value < 0.001 with Anova). This interaction was observed through both their Euclidean distance visualization (Figure 5) and the pairwise comparison tests. Specifically, the comparison between the left and right inner ear otolith shapes indicated a similar value for the western (18c) and central (22b) sub-areas, while the eastern geographical location (27b) exhibited a smaller difference compared to the other sub-areas (Figure 5). This trend was also confirmed by the pairwise test, as the western and central geographical locations showed no significant difference ($\chi^2 = 24.457$, p -value = 0.067 with Anova), while the eastern sub-area exhibited significant differences compared to the other two sub-areas (p -value < 0.001 for both with Anova).

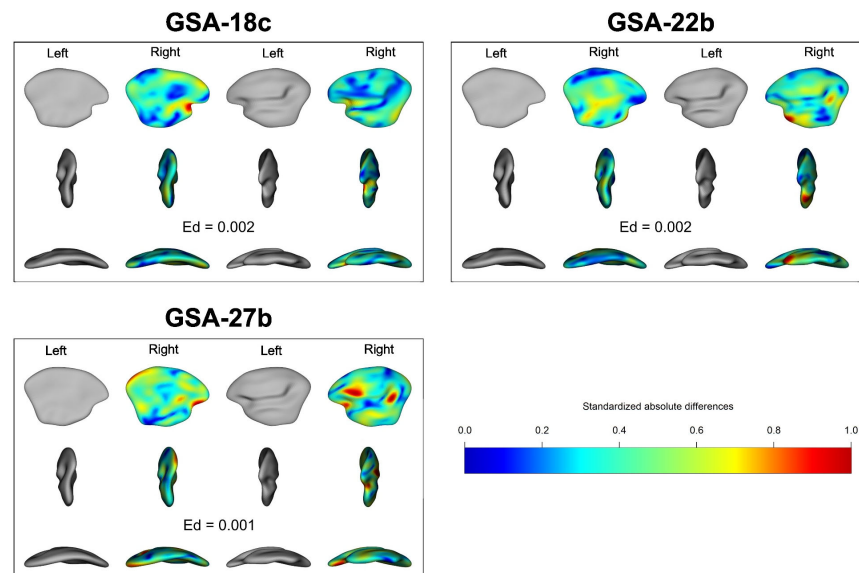


Figure 5. Average difference between the left and right otolith of red mullet by location in a 3D image. The right otolith is set here in the same orientation as the left one, and its colour shows its shape difference between both left and right otoliths (blue area = no difference, red area = very significant differences; Ed = Euclidean distance).

4. Discussion

Various techniques have been developed to discriminate stocks, including genetic analysis, analysis of biological markers, and otolith shape analysis (e.g., [6,87–91]). Otolith shape is species-specific [35] and can indicate intra-specific [36] geographic differences, making it a commonly used tool for delimiting stocks. However, to date, otolith shape has only been extracted from 2D images, which do not take into account the whole shape. Multivariate approaches, such as Fourier, wavelet transform, and geometric morphometric analysis, are commonly used to investigate otolith outlines [14,92–95]. In this study, EFDs computed from 2D outlines and Spherical EFDs computed from 3D meshes were used to compare otolith shape, because this is an efficient method for describing the variation in the shape contours [96] without bias from the information extraction. For 3D shape analysis, other methods are often used with landmarks, but for the sagittal otolith, the Spherical EFDs were found to be relevant for extracting shape information from a closed 3D object.

Only nine otolith studies have been identified to date using 3D data, and these studies have only been conducted since 2014. Most of these studies have all focussed on otolith scanning methods [48–52]. The present study continues in this direction, analysing the signals from these 3D scans. Other 3D imaging studies have focused on the role of the otolith within the fish, including hearing [53,55,56] and the roles and evolution of the otolith throughout the life of the fish to better understand the ontogenetic effect [54]. To date, however, no 3D studies have investigated the influence of factors that control the shape of the otolith. In this paper, the EFD database from 2D and 3D otolith shapes was used to test the effect of inner ear side (left/right) and the stock structure within the red mullet in the Mediterranean Sea. This first approach, using only three geographical locations to discriminate the stock units, aimed to show whether EFDs from 3D images can be used as a tool to identify stock units in the same way as EFDs from 2D images. This study showed that these spherical EFDs from 3D data can be an efficient method to discriminate fish stocks. The geographical effect on the 2D and 3D approaches showed similar results, with significant differences among these three GSAs from the Adriatic Sea to the Levantine Sea. However, while the 2D analysis revealed significant differences between

all sub-areas (GSAs), the 3D analysis indicated that GSAs 18c and 22b were similar to each other, but different from GSA 27b. This finding was also supported by visualizing the Euclidean distance between the left and right inner ear otolith shapes in both 2D and 3D analysis. Specifically, red mullets from GSAs 18c and 22b exhibited small differences in otolith shape between the left and right inner ears, while those from GSA 27b showed significant differences compared to the other two GSAs. This suggests that the 3D analysis retained more information than the 2D analysis. Visually and using simple Euclidean distance calculations in either 2D or 3D, GSA 27b stood out from the other two GSAs (18c and 22b). However, the 2D model failed to demonstrate this division through shape analysis of the otolith. The previous study on the EFDs corroborated this same division of red mullet in Mediterranean Sea, which identified several differences in otolith shape linked to the sampled geographical areas (Gulf of Lions, Aegean Sea and Black Sea [97]). Moreover, a recent study on the European hake (*Merluccius merluccius* Linnaeus, 1758) identified the same boundary of two stock units (i.e., Central Mediterranean Sea and Eastern Mediterranean Sea) that separated the Adriatic Sea (GSA 18c and 22b in this study) and the Eastern Mediterranean Sea (GSA 27b in this study) [21]. Analyses of the stock structure of red mullet could be expanded in the future by adding other geographical areas to these three GSAs.

The side effect (i.e., the difference in shape between the left and right otoliths of an individual fish) was tested, and the results of this study showed that this factor is significant for the 3D otolith shape, while it was not found to be significant for the 2D otolith shape. This result suggests that the accuracy of the 2D outline was not sufficient to detect the differences observed in the whole otolith shape (i.e., 3D otolith shape). The 2D image is just one projection plane of the 3D image (i.e., with a 3D image, multiple 2D images can be generated from different projections). While a difference in shape was noticed between the left and right inner ear otoliths in this projection, Figure 5 (in the results section) showed that differences can be found throughout the whole otolith, not just at the edge as seen in 2D projection plane (as shown in Figure 4 in the results section). In fact, the most significant differences were found in parts of the otolith that cannot be illustrated in 2D projections. This is the first study combining 2D and 3D otolith shapes, and so this result should be tested for other species for which the 2D data show no asymmetry. Additionally, the spherical EFDs analysis showed that the interaction between geographical and inner ear side effects was significant. Consequently, the difference between the shapes of the left and right otoliths observed in 3D space could significantly change the stock structure, as observed in the 2D analysis of bogue in the Mediterranean Sea [60]. Generally, for roundfish, left and right otolith shapes are symmetrical in 2D space (i.e., no significant side effect, [44,57,94,98–100]). In roundfish, it is therefore expected that no asymmetry is the norm and is maintained through homeostatic processes [101]. Asymmetry is often linked to stress and/or variations in the environment, and is viewed as a marker of developmental instability [102,103]. For red mullet, otoliths do not show asymmetry from 2D analysis [57] as corroborated by this work from 2D data. This same study of the otolith shape from 3D data showed a significant asymmetry between left and right otoliths in this species. Consequently, it is possible that this new 3D approach may show that many species are ultimately asymmetrical, and that this asymmetry has been underestimated by the 2D approach.

The significant effect of the inner ear side that was found using 3D analysis, but not 2D, could lead to inaccurate stock unit identification (i.e., significant interaction between geographical and side effect). As bogue in the Mediterranean Sea and common sole (*Solea solea* Linnaeus, 1758) in the eastern English Channel and the southern North Sea showed potential boundary separation according to the mean level of bilateral asymmetry in 2D analysis [104], this approach could be developed from 3D data with greater accuracy than previously obtained by 2D images. It is currently unclear whether the variation in directional asymmetry of otolith shape across geographical locations is due to adaptive or passive phenotypic plasticity, or adaptive or neutral genetic differentiation. This study has

revealed that there is a greater difference between left and right otolith shapes in sub *GSA* 27b, which is located in the east of the Mediterranean in the Levantine basin. This difference in shape was also observed in the European hake in the same area [21]. This could indicate that the European hake and red mullet are particularly affected by environmental or other factors that are driving this difference in shape. Otolith shape asymmetry, whether it is fluctuating or directional, can lead to dysfunction of the vestibular sensing system [105]. It can also impact the fish's ability to process sound and self-orient [106], and influence its swimming patterns [105,107,108]. Currently, however, there is currently no known advantage to otolith asymmetry, which suggests that it may be non-adaptive, regardless of its origin (plastic or genetic).

In addition to providing more detailed and accurate information about the shape and structure of otoliths, the use of 3D imaging and analysis can also have important implications for stock identification. Furthermore, 3D analysis can also be used to investigate the surface texture and microstructure of the otolith, which can provide additional information about the fish stock of origin. This extra information can be used to identify different stocks of fish that may have similar otolith shape but different surface texture and microstructure. The analysis of the shape of the otolith from a 2D image represents only the outline of the otolith on a single projection plane, while 3D images have several projection planes. The sulcus acusticus (cavity on the inner side of the otolith, which connects the otolith to the sensorial macula, [109]) cannot be described in a 2D image, whereas it can with 3D analysis. The projection described by Gonçalves et al. [110] was mainly used in 2D shape analysis to identify stocks, but it cannot be used to analyse the sulcus acusticus. Previous studies have attempted to examine the size and shape of this part of the otolith using 2D shape analysis [111–113]. However, these approaches have limitations, as they do not take into account the depth of this structure. In contrast, 3D analysis provides a more comprehensive view of the sulcus acusticus by enabling the extraction of both depth and volume measurements. This additional information can provide a more complete characterization of otolith shape, which can in turn aid in distinguishing between different fish species or populations. All other shape microstructures, either on the inner or outer side of the otolith, can be analysed with 3D images. Not all shape microstructures may be important for all cases, however, and the added complexity of 3D imaging and analysis may not be necessary depending on the research question.

It is important to note the difference in processing time between 2D and 3D imaging and analysis, with 3D taking longer than 2D, which may be a factor to consider in choosing the best method of shape analysis. This study has shown that 3D analysis provides more detail on the shape of the otolith because the results differ between the average shape for each analysis. It should also be noted that the method used (i.e., spherical EFDs) has errors in 3D, especially for unclosed meshes [69]. These images could not be processed because they cannot be mapped onto a sphere, hence why the number of samples for each *GSA* is different.

The 3D analysis of sagittal otoliths provides a new dimension to the shape analysis method, but still remains to be optimised (time-consuming, issues with otoliths with holes or non-manifolds). From this study, however, stock delimitation for the red mullet is possible by using the effect of 3D otolith asymmetry between inner ear sides, and could be further improved by adding more geographical locations to test the variability within and between stock units. To further improve the accuracy and precision of stock identification, multiple methods of analysis should be incorporated with 3D analysis, such as genetic analysis, otolith microchemistry, and stable isotope analysis. Several studies [14,21] have used 2D analysis and have reported successful results using this approach. Additionally, incorporating environmental data such as temperature, salinity, and dissolved oxygen levels can provide a better understanding of the environmental factors that may influence the distribution and migration patterns of fish stocks. It is also recommended to analyse otoliths from different life stages of fish, including larvae and juveniles, in addition to adults, to gain a more comprehensive understanding of stock structure and dynamics.

Lastly, it is important to collect and analyse a large number of otolith samples from different locations and time periods to increase the statistical power of the analysis and reduce the potential for bias. By incorporating these suggestions, the accuracy and precision of stock identification can be improved, which can ultimately lead to better fisheries management and conservation efforts.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/sym15051067/s1>, Table S1: Scan parameters on the μ CT Skyscan 1174 (Bruker).

Author Contributions: N.A., É.P.C., S.C. and K.M. designed the research; N.A., L.P. and C.L.-T. realized the sampling; N.A., É.P.C., S.C., R.L. and K.M. organized the image analysis; N.A., É.P.C., S.C., R.L., C.L.-T. and K.M. performed the statistical analysis. N.A. wrote the paper, and all authors provided critical comments and were involved in the writing of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work has benefited from the grant “ANR-21-EXES-00 11” as part of the IFSEA graduate school (which originates from National Research Agency under the Investments for the Future program), the French Federative Research Structure (SFR Campus de la mer, project No. 2022.7) and the Specific Contract No. 03_EASME/EMFF/2017/1.3.2.3/01/SI2.793201 (MED_UNITS) financed by the European Union. This work was also supported by the Institut Français de Recherche et d’Exploitation de la Mer and the ULCO University (doctoral support to N. ANDRIALOVANIRINA, 2021–2024). This work is a contribution to the e-Col+ project funded by the Programme d’Investissements d’Avenir (ANR 21 ESRE 0053).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors thank all scientists who carried out the samples. The authors would especially like to thank Kirsteen MacKenzie for valuable help in editing this manuscript. The authors warmly thank the GISMO platform and its staff (Biogéosciences, University Bourgogne Franche-Comté, UMR CNRS 6282, France), which manages and maintains the analytical equipment used in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020; Sustainability in Action*; FAO: Rome, Italy, 2020; ISBN 978-92-5-132755-5.
2. Wagner, G.P.; Booth, G.; Bagheri-Chaichian, H. A Population Genetic Theory of Canalization. *Evolution* **1997**, *51*, 329–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Cadrin, S.X. Defining Spatial Structure for Fishery Stock Assessment. *Fish. Res.* **2020**, *221*, 105397. [[CrossRef](#)]
4. Cadrin, S.X.; Maunder, M.N.; Punt, A.E. Spatial Structure: Theory, Estimation and Application in Stock “Assessment Models”. *Fish. Res.* **2020**, *229*, 105608. [[CrossRef](#)]
5. Biseau, A. *Diagnostic 2021 sur les Ressources Halieutiques Débarquées par la Pêche Française (Métropolitaine)*; “Ifremer Ref. RBE/EDERU/RS/2022/1 2022”; Ifremer: Brest, France, 2022; 40p.
6. Cadrin, S.; Kerr, L.; Mariani, S. *Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science*, 2nd ed.; Elsevier Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014; ISBN 978-0-12-397258-3.
7. Avigliano, E.; Maichak de Carvalho, B.; Leisen, M.; Romero, R.; Velasco, G.; Vianna, M.; Barra, F.; Volpedo, A.V. Otolith Edge Fingerprints as Approach for Stock Identification of *Genidens barbatus*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **2017**, *194*, 92–96. [[CrossRef](#)]
8. Mahé, K. Sources de Variation de La Forme Des Otolithes: Implications Pour La Discrimination Des Stocks de Poissons. Ph.D. Thesis, Université du Littoral Côte d’Opale, Dunkirk, France, 2019.
9. Begg, G.A.; Waldman, J.R. An Holistic Approach to Fish Stock Identification. *Fish. Res.* **1999**, *43*, 35–44. [[CrossRef](#)]
10. Berg, F.; Østgaard, H.D.; Slotte, A.; Andersson, L.; Folkvord, A. A Combination of Genetic and Phenotypic Characterization of Spring- and Autumn-Spawning Herring Suggests Gene Flow between Populations. *ICES J. Mar. Sci.* **2021**, *78*, 694–703. [[CrossRef](#)]
11. Sherman, K.; Sissenwine, M.; Christensen, V.; Duda, A.; Hempel, G.; Ibe, C.; Levin, S.; Lluch-Belda, D.; Matishov, G.; McGlade, J.; et al. A Global Movement toward an Ecosystem Approach to Management of Marine Resources. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2005**, *300*, 275–279. [[CrossRef](#)]
12. Spalding, M.D.; Fox, H.E.; Allen, G.R.; Davidson, N.; Ferdaña, Z.A.; Finlayson, M.; Halpern, B.S.; Jorge, M.A.; Lombana, A.; Lourie, S.A.; et al. Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience* **2007**, *57*, 573–583. [[CrossRef](#)]

13. Palomares, M.L.D.; Froese, R.; Derrick, B.; Meeuwig, J.J.; Noël, S.-L.; Tsui, G.; Woroniak, J.; Zeller, D.; Pauly, D. Fishery Biomass Trends of Exploited Fish Populations in Marine Ecoregions, Climatic Zones and Ocean Basins. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **2020**, *243*, 106896. [CrossRef]
14. ICES. Stock Identification Methods Working Group (SIMWG). *ICES Sci. Rep.* **2022**, *4*, 66. [CrossRef]
15. Cruz, T.A.; Thorpe, J.P.; Pullin, R.S.V. Enzyme Electrophoresis in *Tilapia zillii*: A Pattern for Determining Biochemical Genetic Markers for Use in *Tilapia* Stock Identification. *Aquaculture* **1982**, *29*, 311–329. [CrossRef]
16. Beacham, T.D. Parentage-Based Tagging Combined with Genetic Stock Identification Is a Cost-Effective and Viable Replacement for Coded-Wire Tagging in Large-Scale Assessments of Canadian Salmon Fisheries. *Fish. Res.* **2021**, *239*, 105920. [CrossRef]
17. Lester, R.J.G.; MacKenzie, K. The Use and Abuse of Parasites as Stock Markers for Fish. *Fish. Res.* **2009**, *97*, 1–2. [CrossRef]
18. Pascual, S.; Abollo, E.; González, A.F. Biobanking and Genetic Markers for Parasites in Fish Stock Studies. *Fish. Res.* **2016**, *173*, 214–220. [CrossRef]
19. Vasconcelos, J.; Hermida, M.; Saraiva, A.; González, J.A.; Gordo, L.S. The Use of Parasites as Biological Tags for Stock Identification of Blue Jack Mackerel, *Trachurus Picturatus*, in the North-Eastern Atlantic. *Fish. Res.* **2017**, *193*, 1–6. [CrossRef]
20. Grahl-Nielsen, O. Chapter Twelve—Fatty Acid Profiles as Natural Marks for Stock Identification. In *Stock Identification Methods*, 2nd ed.; Cadrin, S.X., Kerr, L.A., Mariani, S., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2014; pp. 235–256. ISBN 978-0-12-397003-9.
21. Morales-Nin, B.; Pérez-Mayol, S.; MacKenzie, K.; Catalán, I.A.; Palmer, M.; Kersaudy, T.; Mahé, K. European Hake (*Merluccius merluccius*) Stock Structure in the Mediterranean as Assessed by Otolith Shape and Microchemistry. *Fish. Res.* **2022**, *254*, 106419. [CrossRef]
22. Wilson, R.R. Depth-Related Changes in Sagitta Morphology in Six Macrourid Fishes of the Pacific and Atlantic Oceans. *Copeia* **1985**, *1985*, 1011–1017. [CrossRef]
23. Morales-Nin, B.Y.O. The Influence of Environmental Factors on Microstructure of Otoliths of Three Demersal Fish Species Caught off Namibia. *S. Afr. J. Mar. Sci.* **1987**, *5*, 255–262. [CrossRef]
24. Mosegaard, H.; Svedäng, H.; Taberman, K. Uncoupling of Somatic and Otolith Growth Rates in Arctic Char (*Salvelinus alpinus*) as an Effect of Differences in Temperature Response. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1988**, *45*, 1514–1524. [CrossRef]
25. Secor, D.H.; Dean, J.M. Somatic Growth Effects on the Otolith–Fish Size Relationship in Young Pond-Reared Striped Bass, *Morone saxatilis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1989**, *46*, 113–121. [CrossRef]
26. Campana, S.E.; Casselman, J.M. Stock Discrimination Using Otolith Shape Analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1993**, *50*, 1062–1083. [CrossRef]
27. Begg, G.; Overholtz, W.; Munroe, N. The Use of Internal Otolith Morphometrics for Identification of Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) Stocks on Georges Bank. *Fish. Bull.* **2001**, *99*, 1–14.
28. Lombarte, A.; Leonart, J. Otolith Size Changes Related with Body Growth, Habitat Depth and Temperature. *Environ. Biol. Fishes* **1993**, *37*, 297–306. [CrossRef]
29. Lombarte, A.; Torres, G.J.; Morales-Nin, B. Specific Merluccius otolith growth patterns related to phylogenetics and environmental factors. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **2003**, *83*, 277–281. [CrossRef]
30. Cardinale, M.; Doering-Arjes, P.; Kastowsky, M.; Mosegaard, H. Effects of Sex, Stock, and Environment on the Shape of Known-Age Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **2004**, *61*, 158–167. [CrossRef]
31. Vignon, M.; Morat, F. Environmental and Genetic Determinant of Otolith Shape Revealed by a Non-Indigenous Tropical Fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2010**, *411*, 231–241. [CrossRef]
32. Vignon, M. Disentangling and Quantifying Sources of Otolith Shape Variation across Multiple Scales Using a New Hierarchical Partitioning Approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2015**, *534*, 163–177. [CrossRef]
33. Simoneau, M.; Casselman, J.M.; Fortin, R. Determining the Effect of Negative Allometry (Length/Height Relationship) on Variation in Otolith Shape in Lake Trout (*Salvelinus namaycush*), Using Fourier-Series Analysis. *Can. J. Zool.* **2000**, *78*, 1597–1603. [CrossRef]
34. Monteiro, L.R.; Benedetto, A.P.M.D.; Guillermo, L.H.; Rivera, L.A. Allometric Changes and Shape Differentiation of Sagitta Otoliths in Sciaenid Fishes. *Fish. Res.* **2005**, *74*, 288–299. [CrossRef]
35. D'Iglio, C.; Natale, S.; Albano, M.; Savoca, S.; Famulari, S.; Gervasi, C.; Lanteri, G.; Panarello, G.; Spanò, N.; Capillo, G. Otolith Analyses Highlight Morpho-Functional Differences of Three Species of Mullet (Mugilidae) from Transitional Water. *Sustainability* **2021**, *14*, 398. [CrossRef]
36. Trojette, M.; Abderraouf, B.F.; Fatnassi, M.; Marsaoui, B.; Mahouachi, N.E.H.; Chalh, D.A.; Jean-pierre, Q.; Trabelsi, M. Stock Discrimination of Two Insular Populations of *Diplodus annularis* (Actinopterygii: Perciformes: Sparidae) along the Coast of Tunisia by Analysis of Otolith Shape. *Acta Ichthyol. Piscat.* **2015**, *45*, 363–372. [CrossRef]
37. Casselman, J.M. Determination of Age and Growth. In *The Biology of Fish Growth*; Weatherley, A.H., Gill, H.S., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1987; pp. 209–242.
38. Reibisch, J. *Ueber die Eizahl bei Pleuronectes Platessa und die Altersbestimmung Dieser Form Aus den Otolithen. Nebst Bemerkung zu Vorstehender Arbeit von Dr. V. Hensen*; Wiss. Meeresunt: Kiel, Germany, 1899; pp. 233–248.
39. Campana, S.E.; Neilson, J.D. Microstructure of Fish Otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1985**, *42*, 1014–1032. [CrossRef]
40. R Foundation for Statistical Computing. *R Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2022; Available online: <https://www.R-project.org> (accessed on 10 May 2022).

41. Bird, J.L.; Eppler, D.T.; Checkley, D.M., Jr. Comparisons of Herring Otoliths Using Fourier Series Shape Analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1986**, *43*, 1228–1234. [[CrossRef](#)]
42. Pawson, M.G. Using Otolith Weight to Age Fish. *J. Fish Biol.* **1990**, *36*, 521–531. [[CrossRef](#)]
43. Worthington, D.O.; Doherty, P.J.; Fowler, A.J. Variation in the Relationship between Otolith Weight and Age: Implications for the Estimation of Age of Two Tropical Damselfish (*Pomacentrus moluccensis* and *P. wardi*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1995**, *52*, 233–242. [[CrossRef](#)]
44. Cardinale, M.; Arrhenius, F. Using Otolith Weight to Estimate the Age of Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*): A Tree Model Application. *J. Appl. Ichthyol.* **2004**, *20*, 470–475. [[CrossRef](#)]
45. Francis, R.I.C.C.; Harley, S.J.; Campana, S.E.; Doering-Arjes, P.; Francis, R.I.C.C.; Harley, S.J.; Campana, S.E.; Doering-Arjes, P. Use of Otolith Weight in Length-Mediated Estimation of Proportions at Age. *Mar. Freshw. Res.* **2005**, *56*, 735–743. [[CrossRef](#)]
46. Sadighzadeh, Z.; Valinassab, T.; Vosugi, G.; Motallebi, A.A.; Fatemi, M.R.; Lombarte, A.; Tuset, V.M. Use of Otolith Shape for Stock Identification of John’s Snapper, *Lutjanus johnii* (Pisces: Lutjanidae), from the Persian Gulf and the Oman Sea. *Fish. Res.* **2014**, *155*, 59–63. [[CrossRef](#)]
47. Dos Santos, J.B.Q.; Chiessi, C.M.; Crivellari, S.; de Vasconcelos Filho, J.E.; Pereira, N.S.; Freitas, M.O.; Ferreira, B.P. Identification of Western South Atlantic Stocks of the Lane Snapper (*Lutjanus synagris*) from an Otolith Based Multi-Proxy Approach. *Fish. Res.* **2022**, *253*, 106356. [[CrossRef](#)]
48. Zitek, A.; Mayrhofer, B.; Oehm, J.; Irrgeher, J.; Prohaska, T. Affordable 3D Scanning of Small Otoliths for Improved Shape Analysis by Photogrammetry Techniques. In Proceedings of the 5th International Otolith Symposium 2014, Mallorca, Spain, 22 October 2014.
49. Mapp, J.J.I.; Fisher, M.H.; Atwood, R.C.; Bell, G.D.; Greco, M.K.; Songer, S.; Hunter, E. Three-Dimensional Rendering of Otolith Growth Using Phase Contrast Synchrotron Tomography. *J. Fish Biol.* **2016**, *88*, 2075–2080. [[CrossRef](#)]
50. Marti-Puig, P.; Danés, J.; Manjabacas, A.; Lombarte, A. New Parameterisation Method for Three-Dimensional Otolith Surface Images. *Mar. Freshw. Res.* **2016**, *67*, 1059. [[CrossRef](#)]
51. Vasconcelos-Filho, J.E.; Thomsen, F.S.L.; Stosic, B.; Antonino, A.C.D.; Duarte, D.A.; Heck, R.J.; Lessa, R.P.T.; Santana, F.M.; Ferreira, B.P.; Duarte-Neto, P.J. Peeling the Otolith of Fish: Optimal Parameterization for Micro-CT Scanning. *Front. Mar. Sci.* **2019**, *6*, 728. [[CrossRef](#)]
52. Quindazzi, M.J.; Summers, A.P.; Juanes, F. Efficiency Is Doing Things Right: High-Throughput, Automated, 3D Methods in the Modern Era of Otolith Morphometrics. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **2022**, *79*, 7. [[CrossRef](#)]
53. Schulz-Mirbach, T.; Olbinado, M.; Rack, A.; Mittone, A.; Bravin, A.; Melzer, R.R.; Ladich, F.; Heß, M. In-Situ Visualization of Sound-Induced Otolith Motion Using Hard X-Ray Phase Contrast Imaging. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 3121. [[CrossRef](#)]
54. Schulz-Mirbach, T.; Ladich, F.; Plath, M.; Heß, M. Enigmatic Ear Stones: What We Know about the Functional Role and Evolution of Fish Otoliths. *Biol. Rev.* **2019**, *94*, 457–482. [[CrossRef](#)]
55. Schulz-Mirbach, T.; Ladich, F.; Mittone, A.; Olbinado, M.; Bravin, A.; Maiditsch, I.P.; Melzer, R.R.; Krysl, P.; Heß, M. Auditory Chain Reaction: Effects of Sound Pressure and Particle Motion on Auditory Structures in Fishes. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0230578. [[CrossRef](#)]
56. Wei, C.; McCauley, R.D. Numerical Modeling of the Impacts of Acoustic Stimulus on Fish Otoliths from Two Directions. *J. Acoust. Soc. Am.* **2022**, *152*, 3226–3234. [[CrossRef](#)]
57. Mille, T.; Mahe, K.; Villanueva, M.C.; De Pontual, H.; Ernande, B. Sagittal Otolith Morphogenesis Asymmetry in Marine Fishes. *J. Fish Biol.* **2015**, *87*, 646–663. [[CrossRef](#)]
58. Mille, T. Sources de Variation Intra-Populationnelle de La Morphologie Des Otolithes: Asymétrie Directionnelle et Régime Alimentaire. Ph.D. Thesis, Université de Lille 1—Sciences et Technologies, Lille, France, 2015; p. 222.
59. Palmer, A.R. What Determines Direction of Asymmetry: Genes, Environment or Chance? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2016**, *371*, 20150417. [[CrossRef](#)]
60. Mahé, K.; Ider, D.; Massaro, A.; Hamed, O.; Jurado-Ruzafa, A.; Gonçalves, P.; Anastasopoulou, A.; Jadaud, A.; Mytilineou, C.; Elleboode, R.; et al. Directional Bilateral Asymmetry in Otolith Morphology May Affect Fish Stock Discrimination Based on Otolith Shape Analysis. *ICES J. Mar. Sci.* **2018**, *76*, 232–243. [[CrossRef](#)]
61. Conides, A.; Papaconstantinou, C. Commercial Fisheries in the Mediterranean, Focusing on the Environmental Status and the Corresponding Management Measures. *Aquac. Fish. Stud.* **2020**, *2*. [[CrossRef](#)]
62. Spedicato, M.T.; Zupa, W.; Carbonara, P.; Fiorentino, F.; Follesa, M.; Galgani, F.; Garcia, C.; Jadaud, A.; Ioakeimidis, C.; Lazarakis, G.; et al. Spatial Distribution of Marine Macro-Litter on the Seafloor in the Northern Mediterranean Sea: The MEDITS Initiative. *Sci. Mar.* **2019**, *83*, 257–270. [[CrossRef](#)]
63. Andrialovanirina, N.; Hache, A.; Mahé, K.; Couette, S.; Caillault, E.P. Automatic Method to Transform Routine Otolith Images for a Standardized Otolith Database Using R. *Cybiu* **2023**, *47*, 31–42. [[CrossRef](#)]
64. Laffont, R.; Navarro, N. Digit3DLand: Digitalization of 3D Landmarks on Mesh. R package version 0.2.3. 2019. Available online: <https://github.com/morphOptics/digit3DLand> (accessed on 13 June 2022).
65. Vicory, J.; Pascal, L.; Hernandez, P.; Fishbaugh, J.; Prieto, J.; Mostapha, M.; Huang, C.; Shah, H.; Hong, J.; Liu, Z.; et al. SlicerSALT: Shape AnaLysis Toolbox. In *Shape in Medical Imaging—ShapeMI 2018*; Reuter, M., Wachinger, C., Lombaert, H., Paniagua, B., Lüthi, M., Egger, B., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018; pp. 65–72.
66. Kuhl, F.P.; Giardina, C.R. Elliptic Fourier Features of a Closed Contour. *Comput. Graph. Image Process.* **1982**, *18*, 236–258. [[CrossRef](#)]

67. Lestrel, P.E. *Fourier Descriptors and Their Applications in Biology*. Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2008; p. 482. ISBN 978-0-521-45201-4.
68. Bonhomme, V.; Picq, S.; Gaucherel, C.; Claude, J. Momocs: Outline Analysis Using R. *J. Stat. Softw.* **2014**, *56*, 1–24. [[CrossRef](#)]
69. Shen, L.; Farid, H.; McPeck, M.A. Modeling Three-Dimensional Morphological Structures Using Spherical Harmonics. *Evolution* **2009**, *63*, 1003–1016. [[CrossRef](#)]
70. Shen, L.; Makedon, F. Spherical Mapping for Processing of 3D Closed Surfaces. *Image Vis. Comput.* **2006**, *24*, 743–761. [[CrossRef](#)]
71. Rohlf, F.J.; Archie, J.W. A Comparison of Fourier Methods for the Description of Wing Shape in Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Syst. Biol.* **1984**, *33*, 302–317. [[CrossRef](#)]
72. Legendre, P.; Legendre, L. *Numerical Ecology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012; ISBN 978-0-444-53869-7.
73. Plate, T.; Heiberger, R. abind: Combine Multidimensional Arrays. R package version 1.4-5. 2016. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=abind> (accessed on 18 July 2022).
74. Fox, J.; Weisberg, S. *An R Companion to Applied Regression*; Sage: Thousand Oaks, CA, USA, 2019; ISBN 978-1-412-97514-8.
75. Fox, J.; Hong, J. Effect Displays in R for Multinomial and Proportional-Odds Logit Models: Extensions to the Effects Package. *J. Stat. Softw.* **2010**, *32*, 1–24. [[CrossRef](#)]
76. Wickham, H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer: New York, NY, USA, 2016.
77. Bates, D.; Mächler, M.; Bolker, B.; Walker, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using Lme4. *J. Stat. Softw.* **2015**, *67*, 1–48. [[CrossRef](#)]
78. Bates, D.; Maechler, M.; Jagan, M. Matrix: Sparse and Dense Matrix Classes and Methods. R package version 1.5-1. 2022. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=Matrix> (accessed on 18 July 2022).
79. Pinheiro, J.C.; Bates, D.M. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*; Springer: New York, NY, USA, 2000. [[CrossRef](#)]
80. Pinheiro, J.C.; Bates, D.M.; R Core Team. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-160. 2022. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme> (accessed on 18 July 2022).
81. Borchers, H. pracma: Practical Numerical Math Functions, R package version 2.4.2. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=pracma> (accessed on 18 July 2022).
82. Bivand, R.; Rundel, C. rgeos: Interface to Geometry Engine—Open Source (‘GEOS’). R package version 0.5-9. 2021. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=rgeos> (accessed on 18 July 2022).
83. Murdoch, D.; Adler, D. rgl: 3D Visualization Using OpenGL. R package version 1.0.1. 2023. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=rgl> (accessed on 18 July 2022).
84. Schlager, S. Chapter 9—Morpho and Rvcg—Shape Analysis in R: R-Packages for Geometric Morphometrics, Shape Analysis and Surface Manipulations. In *Statistical Shape and Deformation Analysis*; Zheng, G., Li, S., Székely, G., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017; pp. 217–256. ISBN 978-0-12-810493-4.
85. Bivand, R.S.; Pebesma, E.; Gomez-Rubio, V. *Applied Spatial Data Analysis with R*, 2nd ed.; Springer: New York, NY, USA, 2013.
86. Oksanen, J.; Simpson, G.; Blanchet, F.; Kindt, R.; Legendre, P.; Minchin, P.; O’Hara, R.; Solymos, P.; Stevens, M.; Szoecs, E.; et al. vegan: Community ecology package. R package version 2.2-0. 2013. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (accessed on 18 July 2022).
87. Pawson, M.G.; Jennings, S. A Critique of Methods for Stock Identification in Marine Capture Fisheries. *Fish. Res.* **1996**, *25*, 203–217. [[CrossRef](#)]
88. Ponton, D. Is Geometric Morphometrics Efficient for Comparing Otolith Shape of Different Fish Species? *J. Morphol.* **2006**, *267*, 750–757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Garcia, A.; Mattiucci, S.; Damiano, S.; Santos, M.N.; Nascetti, G. Metazoan Parasites of Swordfish, *Xiphias gladius* (Pisces: Xiphiidae) from the Atlantic Ocean: Implications for Host Stock Identification. *ICES J. Mar. Sci.* **2011**, *68*, 175–182. [[CrossRef](#)]
90. ICES. *Report of the Stock Identification Methods Working Group (SIMWG)*; ‘‘CES CM 2016/SSGEPI:16’’; ICES: Toronto, ON, Canada, 2016; p. 47. [[CrossRef](#)]
91. Pita, A.; Casey, J.; Hawkins, S.J.; Villarreal, M.R.; Gutiérrez, M.-J.; Cabral, H.; Carocci, F.; Abaunza, P.; Pascual, S.; Presa, P. Conceptual and Practical Advances in Fish Stock Delineation. *Fish. Res.* **2016**, *173*, 185–193. [[CrossRef](#)]
92. Nasreddine, K.; Benzinou, A.; Fablet, R. Shape Geodesics for the Classification of Calcified Structures: Beyond Fourier Shape Descriptors. *Fish. Res.* **2009**, *98*, 8–15. [[CrossRef](#)]
93. Benzinou, A.; Carhini, S.; Nasreddine, K.; Elleboode, R.; Mahé, K. Discriminating Stocks of Striped Red Mullet (*Mullus surmuletus*) in the Northwest European Seas Using Three Automatic Shape Classification Methods. *Fish. Res.* **2013**, *143*, 153–160. [[CrossRef](#)]
94. Duarte-Neto, P.; Lessa, R.; Stosic, B.; Morize, E. The Use of Sagittal Otoliths in Discriminating Stocks of Common Dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) off Northeastern Brazil Using Multishape Descriptors. *ICES J. Mar. Sci.* **2008**, *65*, 1144–1152. [[CrossRef](#)]
95. Mapp, J.; Hunter, E.; van der Kooij, J.; Songer, S.; Fisher, M. Otolith Shape and Size: The Importance of Age When Determining Indices for Fish-Stock Separation. *Fish. Res.* **2017**, *190*, 43–52. [[CrossRef](#)]
96. Cadrin, S.X.; Friedland, K.D. The Utility of Image Processing Techniques for Morphometric Analysis and Stock Identification. *Fish. Res.* **1999**, *43*, 129–139. [[CrossRef](#)]
97. Morat, F.; Letourneur, Y.; Nérini, D.; Banaru, D.; Batjakas, I.E. Discrimination of Red Mullet Populations (Teleostean, Mullidae) along Multi-Spatial and Ontogenetic Scales within the Mediterranean Basin on the Basis of Otolith Shape Analysis. *Aquat. Living Resour.* **2012**, *25*, 27–39. [[CrossRef](#)]

98. Castonguay, M.; Simard, P.; Gagnon, P. Usefulness of Fourier Analysis of Otolith Shape for Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) Stock Discrimination. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1991**, *48*, 296–302. [[CrossRef](#)]
99. Petursdottir, G.; Begg, G.A.; Marteinsdottir, G. Discrimination between Icelandic Cod (*Gadus morhua* L.) Populations from Adjacent Spawning Areas Based on Otolith Growth and Shape. *Fish. Res.* **2006**, *80*, 182–189. [[CrossRef](#)]
100. Mahé, K.; Evano, H.; Mille, T.; Muths, D.; Bourjea, J. Otolith Shape as a Valuable Tool to Evaluate the Stock Structure of Swordfish *Xiphias Gladius* in the Indian Ocean. *Afr. J. Mar. Sci.* **2016**, *38*, 457–464. [[CrossRef](#)]
101. Palmer, A.R. Animal Asymmetry. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, R473–R477. [[CrossRef](#)]
102. Lemberget, T.; McCormick, M.I. Replenishment Success Linked to Fluctuating Asymmetry in Larval Fish. *Oecologia* **2009**, *159*, 83–93. [[CrossRef](#)]
103. Green, A.; Mosaliganti, K.; Swinburne, I.; Obholzer, N.; Megason, S. Recovery of Shape and Size in a Developing Organ Pair. *Dev. Dyn.* **2017**, *246*, 451–465. [[CrossRef](#)]
104. Mahé, K.; MacKenzie, K.; Ider, D.; Massaro, A.; Hamed, O.; Jurado-Ruzafa, A.; Gonçalves, P.; Anastasopoulou, A.; Jadaud, A.; Mytilineou, C.; et al. Directional Bilateral Asymmetry in Fish Otolith: A Potential Tool to Evaluate Stock Boundaries? *Symmetry* **2021**, *13*, 987. [[CrossRef](#)]
105. Hilbig, R.; Knie, M.; Shcherbakov, D.; Anken, R.H. Analysis of Behaviour and Habituation of Fish Exposed to Diminished Gravity in Correlation to Inner Ear Stone Formation-A Sounding Rocket Experiment (TEXUS 45). In Proceedings of the 20th ESA Symposium on Europe Rocket and Balloon Programmes and Related Research, Hyere, France, 22–26 May 2011.
106. Lychakov, D.V.; Rebane, Y.T.; Lombarte, A.; Demestre, M.; Fuiman, L.A. Saccular Otolith Mass Asymmetry in Adult Flatfishes. *J. Fish Biol.* **2008**, *72*, 2579–2594. [[CrossRef](#)]
107. Beier, M.; Anken, R.H.; Rahmann, H. Susceptibility to Abnormal (Kinetotic) Swimming Fish Correlates with Inner Ear Carbonic Anhydrase-Reactivity. *Neurosci. Lett.* **2002**, *335*, 17–20. [[CrossRef](#)]
108. Hilbig, R.; Anken, R.H.; Rahmann, H. On the Origin of Susceptibility to Kinetotic Swimming Behaviour in Fish: A Parabolic Aircraft Flight Study. *J. Vestib. Res.* **2003**, *12*, 185–189. [[CrossRef](#)]
109. Dunkelberger, D.G.; Dean, J.M.; Watabe, N. The Ultrastructure of the Otolithic Membrane and Otolith in the Juvenile Mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *J. Morphol.* **1980**, *163*, 367–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Gonçalves, P.; Mahe, K.; Elleboode, R.; Chantre, C.; Murta, A.; Avila De Melo, A.; Cabral, H. Blue Whiting Otoliths Pair’s Symmetry Side Effect. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* **2017**, *5*, 06–09.
111. Torres, G.J.; Lombarte, A.; Morales-Nin, B. Variability of the *Sulcus Acusticus* in the Sagittal Otolith of the Genus *Merluccius* (Merlucciidae). *Fish. Res.* **2000**, *46*, 5–13. [[CrossRef](#)]
112. Chollet-Villalpando, J.G.; García-Rodríguez, F.J.; De Luna, E.; De La Cruz-Agüero, J. Geometric Morphometrics for the Analysis of Character Variation in Size and Shape of the *Sulcus acusticus* of Sagittae Otolith in Species of Gerreidae (Teleostei: Perciformes). *Mar. Biodiv.* **2019**, *49*, 2323–2332. [[CrossRef](#)]
113. D’Iglio, C.; Famulari, S.; Albano, M.; Carnevale, A.; Fresco, D.D.; Costanzo, M.; Lanteri, G.; Spanò, N.; Savoca, S.; Capillo, G. Intraspecific Variability of the Saccular and Utricular Otoliths of the Hatchetfish *Argyrops leucurus* (Cocco, 1829) from the Strait of Messina (Central Mediterranean Sea). *PLoS ONE* **2023**, *18*, e0281621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

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

2.3 Synthèse du chapitre 2

Ce chapitre a exploré les différences de forme entre les otolithes droits et gauches du rouget barbet de vase en utilisant des analyses en 2D et en 3D, révélant ainsi une asymétrie significative en 3D qui n'apparaissait pas en 2D (figure 2.2). Alors que l'analyse 2D est couramment utilisée pour délimiter les stocks de poissons, elle peut sous-estimer l'importance des asymétries de forme en raison de sa limitation à une seule projection sur un plan 2D. Les techniques de description de la forme telles que les approches de Fourier et les analyses morphométriques géométriques sont en effet efficaces pour analyser les contours des otolithes en 2D, mais elles ne capturent pas la totalité de la morphologie de ces structures tridimensionnelles (PAWSON et JENNINGS, 1996; PONTON, 2006; DUARTE-NETO *et al.*, 2008; NASREDDINE *et al.*, 2009; BENZINOU *et al.*, 2013; CADRIN *et al.*, 2014; PITA *et al.*, 2016; MAPP *et al.*, 2017; ICES, 2024). Cette limitation de la 2D justifie donc l'usage de la 3D, plus représentative, pour des analyses plus précises dans l'identification des unités de stocks.

L'analyse 3D pourrait ainsi révéler des asymétries insoupçonnées, notamment en montrant des différences dans les formes entre otolithes droits et gauches, que l'analyse 2D ne permet pas d'identifier avec précision. Des sections importantes de l'otolithe, telles que le *sulcus acusticus*, ne sont pas visualisées dans les projections 2D, limitant la compréhension des asymétries de forme sur des structures internes profondes (DUNKELBERGER *et al.*, 1980; TORRES *et al.*, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2017; CHOLLET-VILLALPANDO *et al.*, 2019; D'IGLIO *et al.*, 2023). Les asymétries significatives détectées en 3D se concentrent relativement au niveau du *sulcus acusticus* (partie de l'otolithe connectée au cerveau), une structure essentielle pour la fonction auditive et l'orientation des poissons. Cette observation contraste avec l'analyse 2D, qui n'a pas permis de mettre en évidence ces différences, probablement en raison de ses limitations à capturer des détails morphologiques complexes. Par ailleurs, l'analyse 3D permet d'explorer des caractéristiques de texture et de microstructure, importantes pour l'identification des stocks lorsque l'aspect global de la forme est semblable entre des populations différentes.

Les études récentes montrent que l'asymétrie détectée pourrait refléter des réponses aux variations environnementales et des indices de différenciation génétique (ZITEK *et al.*, 2014; MAPP *et al.*, 2016; MARTI-PUIG *et al.*, 2016; VASCONCELOS-FILHO *et al.*, 2019; QUINDAZZI *et al.*, 2022). En particulier, des études utilisant les EFDs sphériques en 3D (Elliptic Fourier Descriptors pour objets tridimensionnels fermés) se sont révélées utiles pour extraire des informations plus complètes de la structure de l'otolithe, permettant une meilleure différenciation des stocks (CADRIN et FRIEDLAND, 1999). Les résultats montrent que l'analyse 3D offre des distinctions géographiques non apparentes en 2D : par exemple, alors que l'analyse 2D indiquait des différences significatives entre tous les sous-zones géographiques étudiées de la mer Méditerranée (appelée GSAs), l'analyse en 3D a révélé des similarités inattendues entre certaines d'entre elles, comme GSAs 18c et 22b, mais une différenciation plus nette avec la GSA 27b, située en mer Méditerranée orientale (MORAT *et al.*, 2012; MORALES-NIN *et al.*, 2022). Ce type d'asymétrie pourrait indiquer des variations environnementales importantes dans cette région, confirmées par des résultats similaires en 2D obtenus chez le merlu européen (*Merluccius merluccius*) dans la même zone (MORALES-NIN *et al.*, 2022).

En conséquence, les résultats de ce chapitre montrent que les asymétries sont significatives en 3D mais non significatives en 2D. Il est essentiel de prendre en compte cette différence pour optimiser l'identification et la bonne gestion des stocks. Cette asymétrie observée en 3D pourrait avoir

un impact sur des fonctions biologiques vitales, telles que l'orientation et l'audition des poissons (BEIER *et al.*, 2002; HILBIG *et al.*, 2011). Cela souligne l'importance d'une approche en 3D plus généralisée pour de futures études sur les otolithes, non seulement pour le rouget barbet de vase, mais également pour d'autres espèces de poissons chez lesquelles l'analyse 2D n'a pas montré d'asymétrie significative. Les 2 études réalisées (voir Annexe de cette thèse) sur l'asymétrie observée en 2D chez 2 espèces présentes dans les eaux chaudes de l'Afrique de l'Ouest (golfe de Guinée) ont montré que dans ces mers chaudes, il pouvait y avoir aussi une asymétrie entre la forme des otolithes gauche et droit des mêmes individus. Ces résultats montrent que l'asymétrie bilatérale peut être observées chez beaucoup d'espèces (MAHÉ, 2019) mais aussi dans beaucoup d'environnements très différents.

En couplant les analyses 3D à d'autres méthodes, comme l'analyse génétique, la microchimie des otolithes et/ou l'analyse isotopiques, il est possible d'améliorer l'exactitude de la délimitation des stocks et la compréhension de leurs réponses aux conditions environnementales locales (MORALES-NIN *et al.*, 2022; ICES, 2024).

Enfin, cette approche pourrait être étendue à d'autres régions géographiques, incluant divers stades de vie des poissons (larves, juvéniles, adultes), afin de renforcer les efforts de conservation et de gestion des pêches à l'aide d'une méthodologie de différenciation des stocks plus robuste et exhaustive.

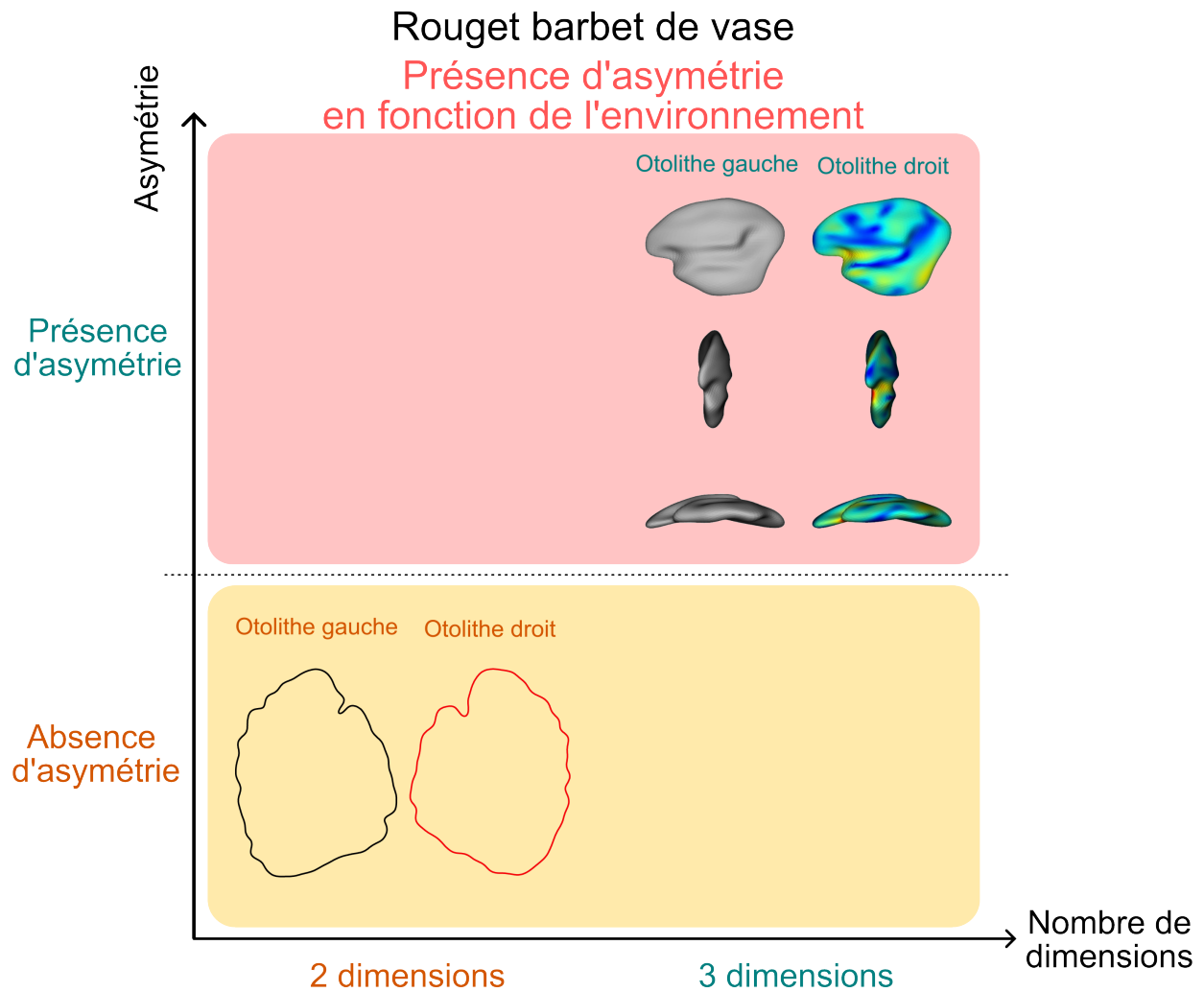


FIGURE 2.2 – Synthèse des résultats sur la présence d’asymétrie en 2D et en 3D. En 3D, une asymétrie est détectée entre les otolithes gauche et droit, visualisée par des différences de forme entière surtout au niveau du *sulcus acusticus*. En 2D, l’absence d’asymétrie est mise en évidence par les formes des otolithes gauche et droit, montrant des contours relativement dissimilaire mais ce n’est pas la forme complète de l’otolithe.

Chapitre 3 Identification et comparaison de la structuration des stocks de poissons à partir des formes 2D et 3D des otolithes et des paramètres physico-chimiques environnementaux

3.1 Introduction du chapitre 3

Le chapitre précédent a posé les bases théoriques et méthodologiques relatives à l'identification des stocks halieutiques à partir de la forme des otolithes, en mettant en lumière l'importance de prendre en compte d'autres effets pouvant modifier la forme de l'otolithe avec l'asymétrie bilatérale entre les otolithes droit et gauche. Ce chapitre 2 a montré aussi l'importance d'utiliser la forme 3D et pas que la représentation 2D de l'otolithe.

Ce chapitre 3 reprend donc la comparaison des données 2D et 3D pour identifier les stocks et compare ces 2 approches aux données extraites de modèles physico-chimiques environnementaux. Ces analyses ont pour but d'évaluer le potentiel biais d'utilisation des données uniquement en 2D pour discriminer les stocks mais aussi de comprendre le gain de précision des résultats en utilisant les données de forme 3D des otolithes. Le dernier objectif de ce chapitre est d'étudier si les limites de stocks observés par la forme des otolithes sont comparables à celles obtenues à partir des paramètres physico-chimiques environnementaux analysés seuls. Toutes ces analyses sont réalisées sur le rouget barbet de vase en mer Méditerranée et donc dans un contexte très différent, une identification des potentiels stocks de poissons concernant 9 espèces a été réalisée sur les côtes de l'île de La Réunion (Océan Indien Ouest). Cette étude plus conventionnelle n'utilisant que des données de forme en 2D a pour but de montrer si à une échelle spatiale très petite, des stocks/ unités de gestion pouvaient être différenciés chez certaines espèces.

L'analyse des formes 2D des otolithes devient aujourd'hui un outil de plus en plus répandu pour la discriminer des stocks halieutiques. La gestion durable des pêches repose sur la définition précise des limites des stocks, permettant d'ajuster les stratégies de pêche en fonction des dynamiques propres à chaque unité (CADRIN *et al.*, 2014). Or, toute erreur dans la délimitation des stocks peut entraîner des conséquences graves pour la durabilité des ressources (SHERMAN *et al.*, 2005). Ce chapitre aborde les délimitations en prenant en compte des paramètres biologiques et environnementaux. Cependant, en mer, notamment dans les zones côtières de La Réunion, les stocks peuvent être complexes et mal définis à cause de leur petite taille géographique et de la diversité des habitats, ce qui rend l'identification des limites des stocks encore plus délicats. Cette question devient centrale dans ce chapitre, si les techniques d'analyse des otolithes en 2D peuvent apporter une réponse claire à cette problématique.

Les deux premières questions abordées dans ce chapitre se focalisent sur la comparaison des limites des stocks définis par les méthodes 2D et 3D pour le rouget barbet de vase en mer Méditerranée. À cette fin, nous nous appuyons sur des recherches récentes montrant que l'analyse tridimensionnelle des otolithes peut offrir une vue plus complète de la structure des populations, en

dévoilant des informations non-identifiées dans les analyses en 2D (ZITEK *et al.*, 2014). Le passage de la 2D à la 3D dans l'analyse des otolithes permet ainsi d'affiner les délimitations des stocks et de mieux comprendre leur dynamique. Toutefois, l'efficacité de ces approches et la pertinence des classifications proposées, notamment par des méthodes supervisées ou non supervisées, demeurent des questions centrales à explorer. Cette réflexion est prolongée par une interrogation sur l'efficacité comparée des différentes méthodes de classification, en particulier entre l'analyse des formes en 2D et 3D. Les méthodes classiques, telles que l'analyse en composantes principales (PCA), ont été largement utilisées pour caractériser les otolithes (CADRIN *et al.*, 2014). Cependant, des techniques plus récentes, comme le clustering hiérarchique ou les forêts aléatoires (Random Forest), pourront peut-être proposer de nouvelles approches pour une identification plus précise et plus rapide des stocks. Ce chapitre s'inscrit ainsi dans une démarche visant à optimiser les outils de gestion halieutique, en testant l'efficacité comparative des méthodes actuelles d'analyse des otolithes à macro-échelles spatiales.

Ce chapitre approfondit les questions liées à la variation de la forme des otolithes au niveau d'une espèce (niveau intraspécifique) en identifiant leur potentiel pour délimiter les stocks à des échelles géographiques très différentes (figure 3.1). La comparaison des méthodes en 2D et 3D, ainsi que des techniques de classification associées, constitue un axe majeur pour délimiter les stocks qui est une question préliminaire essentielle pour améliorer la gestion durable des pêches, particulièrement dans des régions aux contextes écologiques et socio-économiques complexes comme La Réunion et la Méditerranée.

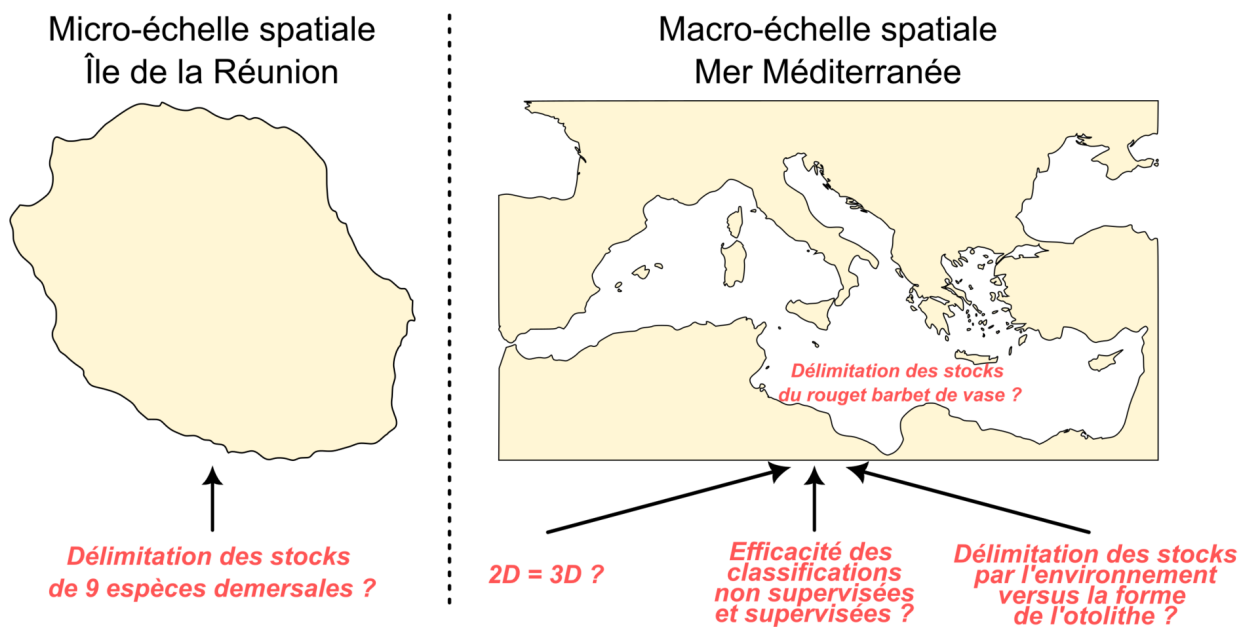


FIGURE 3.1 – Délimitation de stock en micro et macro-échelle géographique en utilisant la forme des otolithes. La partie gauche, c'est la délimitation de stock à micro-échelle spatiale autour de l'île de la Réunion sur 9 espèces de poissons démersaux en utilisant la forme 2D de leurs otolithes. La partie droite, c'est l'identification de stock du rouget barbet de vase à macro-échelle géographique en mer Méditerranée en comparant les délimitations des analyses 2D et 3D sur les classifications supervisées et non supervisées ainsi qu'avec les paramètres environnementaux.

3.2 Structuration spatiale des principaux poissons démersaux autour de l'île de la Réunion (Océan Indien Ouest) à partir de la forme externe de leurs otolithes

Le papier suivant a été publié dans la revue *Cybium*. Il analyse les stocks de plusieurs espèces autour de l'île de la Réunion. Il met en évidence des stocks différenciés par des techniques non supervisées et supervisées de machine learning. Les résultats sont en lien avec la présence de récifs coraliens.

Spatial structuring of the main demersal fish around Réunion Island (Western Indian Ocean) based on the external shape of their otoliths

by

Nicolas ANDRIALOVANIRINA* (1, 2), David ROOS (3), Claire GENTIL (3), Solène TELLIEZ (1), Antoine DUSSUEL (1), Romain ELLEBOODE (1), Kirsteen MACKENZIE (1), Émilie POISSON CAILLAULT (2), Sébastien COUETTE (4) & Kélig MAHÉ (1)



© SFI
Submitted: 18 Mar. 2022
Accepted: 9 Dec. 2022
Editors: E. Dufour, O. Otero

Key words

Otoliths
Stock identification
Elliptic Fourier
descriptors
Classification
La Réunion Island

Abstract. – Knowledge of the spatial structuring of stocks is essential to study the dynamics of fish populations, and thus to manage fisheries. In this study, sagittal otolith shape was used to understand the stock structures of populations of the main commercial species caught around La Réunion Island. A total of 1091 individuals, belonging to nine species of benthopelagic bony fishes (*Aphareus rutilans*, *Cephalopholis aurantia*, *Epinephelus fasciatus*, *Etelis carbunculus*, *Lutjanus kasmira*, *Lutjanus notatus*, *Pristipomoides argyrogrammicus*, *Pristipomoides filamentosus*, *Variola albimarginata*), were analyzed and compared between 10 areas around La Réunion. To describe the external shape of the otolith, normalized Fourier elliptical descriptors were extracted. For each species, the analysis of shape data was performed in two steps. The first step was investigating the potential effects of confounding factors such as fish size, symmetry between right and left otoliths, sexual dimorphism and spatial distribution. When location showed a significant effect on otolith shape, a second step coupling two complementary analyses was performed with hierarchical clustering (unsupervised machine learning) and linear discriminant analysis with jackknifed prediction (supervised machine learning), allowing characterization of the potential stock limits for each of the treated species. The results show that, for the nine species treated, only two species (*Etelis carbunculus* and *Pristipomoides filamentosus*) show spatial structuring around Reunion Island with, for each of them, two stocks potentially separated along a northwest/southeast axis. These results show that some species around La Réunion Island may have local subpopulations.

Résumé. – Structuration spatiale des principaux poissons démersaux autour de l'île de la Réunion (Océan Indien Ouest) à partir de la forme externe de leurs otolithes.

L'identification et la connaissance de la structuration spatiale de stocks sont essentielles pour étudier la dynamique des populations de poissons et ainsi gérer les pêcheries. Dans cette étude, la forme des otolithes sagittales a été employée pour comprendre la structuration des stocks des populations des principales espèces commerciales capturées à l'île de La Réunion. Un total de 1091 individus, appartenant à 9 espèces de poissons osseux benthopélagiques de différents compartiments d'habitats coralliens et profonds (*Aphareus rutilans*, *Cephalopholis aurantia*, *Epinephelus fasciatus*, *Etelis carbunculus*, *Lutjanus kasmira*, *Lutjanus notatus*, *Pristipomoides argyrogrammicus*, *Pristipomoides filamentosus*, *Variola albimarginata*) a été analysé et comparé entre 10 zones réparties autour de la Réunion. Pour décrire la forme externe de l'otolithe, les descripteurs elliptiques de Fourier normalisés ont été extraits. Pour chaque espèce, l'analyse des données de forme a été réalisée en 2 étapes en regardant premièrement les effets potentiels de facteurs confondants que sont la taille du poisson, la symétrie des otolithes droit et gauche, le dimorphisme sexuel et la répartition spatiale. Lorsque ce dernier était significatif sur la forme de l'otolithe, une deuxième étape couplant deux analyses complémentaires a été effectuée avec le regroupement hiérarchique (apprentissage automatique non supervisé) et l'analyse discriminante linéaire avec prédiction jackknifed (apprentissage automatique supervisé) permettant de caractériser les limites des potentiels stocks pour chacune des espèces traitées. Les résultats montrent que pour les 9 espèces traitées, seules 2 espèces profondes (*Etelis carbunculus* et *Pristipomoides filamentosus*) montrent une structuration spatiale autour de l'île de la Réunion avec pour chacune d'elles, deux stocks potentiellement séparés par un axe Nord-Ouest/Sud-Est. Ces résultats montrent que pour certaines espèces, l'île de La Réunion peut présenter des sous-populations locales.

- (1) Ifremer, Laboratoire Ressources Halieutiques, 62321 Boulogne-sur-Mer, France. nicolas.andrialovanirina@ifremer.fr, solene.telliez@ifremer.fr, antoine.dussuel@ifremer.fr, romain.elleboode@ifremer.fr, kirsteen.mackenzie@ifremer.fr, kelig.mahe@ifremer.fr
(2) LISIC, Université Littoral Côte d'Opale (ULCO), 62228 Calais, France. emilie.caillaault@univ-littoral.fr
(3) Ifremer, Délégation Océan Indien, 97822 Le Port cedex, La Réunion. david.roos@ifremer.fr, claire.gentil@ifremer.fr
(4) Ecole Pratique des Hautes Etudes, PSL, Paris & UMR Biogéosciences, université de Bourgogne, 21000 Dijon, France. sebastien.couette@ephe.psl.eu
* Corresponding author

INTRODUCTION

La Réunion Island is a volcanic island of 2,512 km² (Sinclair and Langrand, 2013). La Réunion Island has a high diversity of fishery resources, where, according to Faure (1982) and Chabanet (1994), 320 species of fish have been previously inventoried to date. This island presents a diversity of habitats that could influence the distribution of these species populations, such as coral reefs in the west part of the island (Tedetti *et al.*, 2011) and a lack of reefs on the east coast. Nearly 200 species, belonging to more than 30 families, are of commercial interest (Biais and Taquet, 1992). Over 79% of the fishing vessels of La Réunion Island fish in the shallow coastal waters with a depth range from 0 to 80 m (Weiss *et al.*, 2019; Roos, pers. comm.). La Réunion Island's fishery has traditionally focused on demersal species that are exploitable with hand- and long-lines (Fleury *et al.*, 2012). This fishery has recently evolved towards the exploitation of deeper fish stocks (beyond 200 m), made possible by reels and other power lines (Roos *et al.*, 2001a; Bertrand *et al.*, 2011; Fleury *et al.*, 2012). The Serranidae family contains the most prized species here (with a high commercial value), while the Lutjanidae family is the main catch of this small-scale fishery (Biais and Taquet, 1992). In 2017, the catch of Lutjanidae and Serranidae was 71.57 tons or 3% of the total catch of La Réunion Island (catch largely dominated by swordfish and tuna, at over 90%) (Blanchard *et al.*, 2018). Decreases in catches have been reported in recent years, mainly due to over-exploitation using these new gears (Fleury *et al.*, 2012), but also due to lack of management (Roos *et al.*, 2001b, 2015). In order to implement sustainable fisheries management measures, information on the biology, ecology and stock units is essential, but biological and quantitative fishery data on these commercially important fish families are still lacking (Newman *et al.*, 2016; Halim *et al.*, 2020).

Stock assessment models assume that a group of individuals has homogeneous life history parameters (*e.g.*, growth, maturity, and mortality rates), and has a closed life cycle in which the young fish in the group are produced by previous generations of the same group (Cadrin *et al.*, 2014). To carry out a relevant stock assessment, it is necessary to know the boundaries and size of the fishery management units (Avigliano *et al.*, 2017); effective performance of fishery management therefore requires biologically meaningful delimitation of stocks (Cadrin *et al.*, 2014). Several tools/methods can be used to delimit fish stocks, including genetic markers (Cruz *et al.*, 1982; Beacham, 2021), but also other natural markers such as parasites (Lester and MacKenzie, 2009; Pascual *et al.*, 2016; Vasconcelos *et al.*, 2017), growth rate and fatty acids in tissues (Grahl-Nielsen, 2014), life history traits, external tags or microchemistry (Cadrin *et al.*, 2014). The annual monitoring by the SIMWG (Stock Identifi-

cation Methods Working Group; <https://www.ices.dk/community/groups/Pages/simwg.aspx>) of ICES (the International Council for the Exploration of the Sea), however, has shown that otolith shape analysis is becoming one of the two main tools used, along with genetic analysis, for defining stock limits. The analysis of otolith shape for stock identification was initiated by using Fourier descriptors (Bird *et al.*, 1986; Doering and Ludwig, 1990; Campana and Casselman, 1993). Recent advances in terms of image analysis and data processing reinforced this trend, in particular with the development of statistical tools such as R (R Core Team, 2017) that allow studies to be carried out in greater numbers and at lower cost compared to the genetic tracer approach, and that show generally comparable results (Cadrin *et al.*, 2014).

The otolith is a calcified structure which is located in the vestibular system of the inner ear, which is metabolically inert, *i.e.*, it cannot be altered or generally resorbed, and grows incrementally throughout the life of the fish (Casselman, 1987). Within a species, the otolith shape (or its external outline) is the result of environmental conditions (Wilson, 1985; Morales-Nin, 1987; Mosegaard *et al.*, 1988; Secor and Dean, 1989) and genetic determinism throughout the life of the fish (*i.e.* the effect of ontogeny) (Lombarte and Leonart, 1993; Lombarte *et al.*, 2003; Cardinale *et al.*, 2004; Vignon and Morat, 2010; Vignon, 2015; Mahé, 2019). Consequently, otolith shape is a very efficient tool to identify the stock structure of fishes.

To better delimit the reef fish populations and understand the stock structure of the main commercial species in the families of Serranidae and Lutjanidae around La Réunion Island, sagittal otolith shape was used to analyze the structure of these populations. Nine main demersal species were analyzed according to ten different geographical areas/habitats.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection

Fish samples were collected from 10 locations, as defined by Roos *et al.* (2015), around La Réunion coast from 2018 to 2020 (Fig. 1). Those areas have been divided according to the characterization of coastal water bodies, the nature of the seabed (hard or soft bottoms, coral or basaltic bottoms), the geomorphology of the seabed, the geomorphology of the coast (natural boundary due to the presence of large rocky capes), and freshwater inflows and terrigenous inputs (Roos *et al.*, 2015).

The fish samples originated from professional fishing operations. Sampling was carried out on a large number of catches, but the samples were insufficient for some areas as access was difficult for the fishers (no port nearby for vessels between less than 6 to 12 meters with 20 to 200 kW of

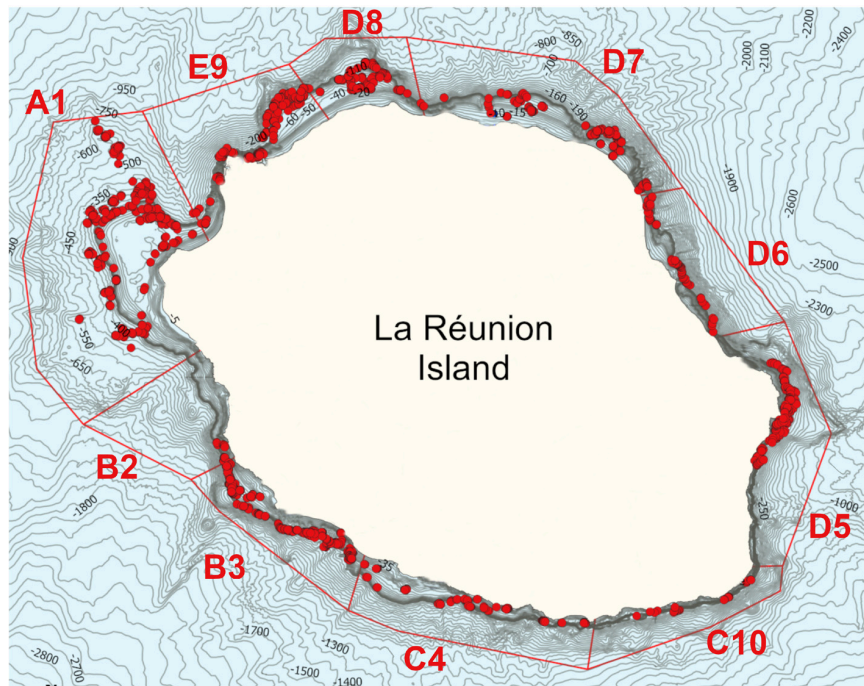


Figure 1. – Map of sampling locations around La Réunion coast from 2018 to 2020. **A:** High bottom, old formation, influenced by the river of the pebbles, the pond of Saint-Paul and the Ravine Saint-Gilles, located between zones of basaltic and coral sands. **B:** Dry zone with hard substratum/sablo-coralian with episodic heavy rain events. **C:** Recent facies on volcanic substratum, strongly watered by underground infiltrations (Grande Anse to Piton Sainte-Rose). **D:** Zone on alluvium and pebbles, strongly watered by permanent superficial streams. **E:** Sandy bay, loaded with organic matter, clean hydrodynamic characteristics, transition zone.

engine power). Furthermore, some species had low abundance or the fishing gear used was not adapted to catch those species.

In the laboratory, 1091 individuals were measured for total length (TL; mm). Sex was determined by macroscopic examination of the gonads, and only mature fish were included in this study to minimize the effect of sexual maturity, which may affect otolith shape (Cardinale *et al.*, 2004). 2150 whole sagittal (left and right) otoliths were then extracted, washed, cleaned in distilled water, and then dried and stored in labelled plastic tubes. Sampling numbers by location for nine species of benthopelagic fishes (*Aphareus rutilans*, Cuvier, 1830; *Cephalopholis aurantia*, Valenciennes, 1828; *Epinephelus fasciatus*, Forsskål, 1775; *Etelis carbunculus*, Cuvier, 1828; *Lutjanus kasmira*, Forsskål, 1775; *Lutjanus notatus*, Cuvier, 1828; *Pristipomoides argyrogrammicus*, Valenciennes, 1831; *Pristipomoides filamentosus*, Valenciennes, 1830; *Variola albimarginata*, Baissac, 1953) are given in Table I.

Otolith shape analysis

A calibrated high-resolution image (3200 dpi) of the proximal face (*sulcus acusticus* facing up) of the whole left and right sagittal otolith was obtained using a scanner with reflected light (Epson V750).

During this process, a fixed single magnification was used to ensure the maximum possible resolution. Image processing was performed using the image analysis system TNPC (Digital processing for calcified structures, version 7) (Mahé *et al.*, 2011) on the proximal face of the otolith. The images were standardized so that all otoliths were in the same orientation and direction, as in Gonçalves *et al.* (2017). To compare left and right otolith shapes, mirror images of left otoliths were used. The length and width of otoliths were automatically extracted as the largest distance along the anteroposterior axis and the ventro-dorsal axis, respectively.

To describe otolith contours, Elliptic Fourier Descriptors (EFDs) analysis (*e.g.*, Lestrel, 2008) was carried out on each otolith delineated and extracted contour after image binarization. All Elliptic Fourier Descriptors (EFDs) were obtained

Table I. – Sampling scheme for nine species of fishes, with the total number of sampled otoliths per species and location.

Species	A1	B2	B3	C4	C10	C5	D6	D7	D8	E9	Total
<i>Aphareus rutilans</i>	10		46		1	6		2	21	9	95
<i>Cephalopholis aurantia</i>	6	8	107	2	2	12	2	17	28	16	200
<i>Epinephelus fasciatus</i>	27	5	87	6	39	5	3	97	4	4	277
<i>Etelis carbunculus</i>	56	1	59	3	1	6		3	8	38	175
<i>Lutjanus kasmira</i>	105	22	103	13	2	48	16	110	128	4	551
<i>Lutjanus notatus</i>	23	3	100	11		40	29	79	22	9	316
<i>Pristipomoides argyrogrammicus</i>	57		65	2	8	3		12	2	30	179
<i>Pristipomoides filamentosus</i>	23	8	96	13	11	9	8	9	16	29	222
<i>Variola albimarginata</i>	63	4	7	6	39	4			12		135
Total	370	51	670	56	103	133	58	329	241	139	2150

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

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

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

Statistical analysis

For each species, the same standardized process was applied with two successive steps. Firstly, the potential effects of total length (TL), sex (S), inner-ear location (side, SI) and sampling location (LO) on otolith shape were tested. Secondly, when LO was found to be significant an investigation of spatial variation in otolith shape, integrating the other potential effects, was carried out to determine the spatial population structure for each species.

Principal Components Analysis (PCA) was applied to the selected EFDs matrix (EFDs as columns and individual otolith as lines) of the otolith contours (Rohlf and Archie, 1984), and a subset of the resulting Principal Components (PCs) was selected as otolith shape descriptors according to the broken stick model (Legendre and Legendre, 2012). This allowed a decrease in the number of variables used to describe otolith shape variability while ensuring that the main sources of shape variation were kept, simultaneously avoiding co-linearity between shape descriptors (Rohlf and Archie, 1984). The relevant PCs were subsequently used as input variables in a partial redundancy analysis (pRDA) with side (left/right) as a potentially influential variable. RDA is an extension of multiple regressions to multivariate response data and an extension of principal components analysis (Legendre and Legendre, 2012), combined with permutation tests (marginal effect, type II; Fox and Weisberg, 2011) on the selected principal components (PC) matrix. Using an RDA, the potential effects of total length, sex, sampling year and geographic area were tested with the explanatory matrix combined with permutation tests on the selected PC matrix. A permutation test (marginal effect, type II) was then used to test the significance of each explanatory variable (Legendre and Legendre, 2012).

To discriminate between fish from the 10 sampled locations based on otolith shape, a Linear Discriminant Analysis (LDA) with jackknifed prediction was applied to the residuals of a redundancy analysis (RDA) of the shape matrix explained by individuals' total length. The use of the residual matrix instead of the shape matrix avoided potential confounding effects due to otolith shape variation across sampling locations related to variations in individuals' size, originating from different size-selectivity of the capture procedure/gear at different sampling sites (Rencher and Christensen, 2012). To begin the stock identification procedure, a cluster analysis using Ward's hierarchical agglomerative algorithm based on squared Euclidean distances was performed on the residual shape matrix to group individuals with similar otolith shapes. Ward's algorithm allowed a classification threshold definition and gave the best overall recovery (Saraçlı *et al.*, 2013) and accuracy (Pakgozar *et al.*, 2021). To evaluate the resulting discriminant functions, the percentage of correct classification of individuals into sampling areas was then calculated using jackknife cross-validation (Klecka *et al.*, 1980) and compared to those obtained from random distribution (supplementary Tab. II). The performance of the discriminant analyses was assessed using Wilks' λ ; this value is the ratio between the intra-group variance and the total variance, and provides an objective way of calculating the percentage of agreement between real and predicted group memberships (supplementary Tab. III). Wilks' λ values range from 0 to 1, and the closer to 0, the better the discriminating power of the RDA.

Statistical analyses were performed using the 'Vegan' (Oksanen *et al.*, 2013), 'MASS' (Ripley *et al.*, 2013), 'CAR' (Fox *et al.*, 2011), 'FactoMineR' (Lê *et al.*, 2008), 'HH' (Heiberger and Heiberger, 2022) and 'Ellipse' (Murdoch *et al.*, 2020) packages in R (R Core Team, 2017).

RESULTS

Potential sources of variation in otolith shape

Among the 99 Fourier harmonics extracted to describe individual otolith contours, the number of first harmonics used (n_k), which explained at least 99.99% of the variation in otolith contour of each individual, varied from 23 for *Pristipomoides argyrogrammicus* (the least complex shape) to 45 for *Aphareus rutilans* (the most complex shape). There was a significant linear relationship between fish length and otolith length for all nine species analysed. In addition to this relationship between fish size and otolith size, all species except *Pristipomoides argyrogrammicus* showed a significantly change in otolith shape with fish length (Tab. II), which effect was integrated for further analysis. Other potential factors were tested by pRDA combined with permutation tests, which showed no significant difference between the

Table II. – Results of partial redundancy analysis on the shape matrix, with the p-value of each explanatory variable (total length: TL, sex: S, inner-ear location: SI and sampling location: LO) (N = fish number; n_h: number of harmonics used; PCs: number of selected Principal Components) (* significant effect).

Species	N	n _h	PCs	TL	SI	S	LO	SI/LO
<i>Aphareus rutilans</i>	95	45	7	0.001*	0.095	0.753	0.001*	
<i>Cephalopholis aurantia</i>	200	31	6	0.001*	0.001*	0.019*	0.113	
<i>Epinephelus fasciatus</i>	277	37	6	0.001*	0.001*	0.191	0.001*	0.001*
<i>Etelis carbunculus</i>	175	29	4	0.001*	0.041*	0.195	0.001*	0.001*
<i>Lutjanus kasmira</i>	551	29	4	0.001*	0.071	0.182	0.001*	
<i>Lutjanus notatus</i>	316	33	7	0.001*	0.082	0.005*	0.001*	
<i>Pristipomoides argyrogrammicus</i>	179	21	4	0.234	0.078	0.010*	0.250	
<i>Pristipomoides filamentosus</i>	222	44	9	0.001*	0.741	0.567	0.009*	
<i>Variola albimarginata</i>	135	36	6	0.001*	0.306	0.616	0.009*	

Table III. – Classification of sampling locations by otolith shape per species with significant geographical effect in pRDA analysis: unsupervised classification with cluster analysis (optimal number of clusters) and supervised classification with LDA (group composition with the name of each location, correct classification rate).

Species	Unsupervised classification	Supervised classification	
	Number of clusters	Group composition	Correct classification rate (%)
<i>Aphareus rutilans</i>	2	D8	80.04
		A1, B3, C5, E9	
<i>Epinephelus fasciatus</i>	2	A1, B3, D8, E9	77.84
		C5	
<i>Etelis carbunculus</i>	2	A1, E9, B3	85.51
		C5, D8	
<i>Lutjanus kasmira</i>	2	A1, B2, D6	80.00
		B3, C4, C5, D7, D8	
<i>Lutjanus notatus</i>	2	B3	67.73
		A1, C4, C5, D6, D7, D8, E9	
<i>Pristipomoides filamentosus</i>	2	A1, B2, B3, C4	54.50
		C5, C10, D7, E9, D6, D8	
<i>Variola albimarginata</i>	2	D8	84.25
		A1, B3, C10, C4	

left and right otolith shape for six species. Only three species (*Cephalopholis aurantia*, *Epinephelus fasciatus* and *Etelis carbunculus*) showed significant directional asymmetry (Tab. II). The pRDA analysis also indicated that the otolith shape was significantly dependent on the sex of the individual in only three species (*Cephalopholis aurantia*, *Lutjanus notatus* and *Pristipomoides argyrogrammicus*). When the otolith shape for one tested species was directly influenced by a confounding factor (*i.e.*, side or sex), its interaction with the geographical factor (*i.e.*, SI/LO or S/LO) was estimated. No significant effect of sex on the relationship between otolith shape and geographical position was found for any species. For the species showing significant asymmetry, the interaction between side and geographical effect was significant for two species (*Epinephelus fasciatus* and *Etelis carbunculus*), for which only the left otolith was subsequently used to analyse the stock structure.

Stock structure inferred from otolith shape

Otolith shape was not affected by the capture location of specimens for only two species (*Cephalopholis aurantia* and *Pristipomoides argyrogrammicus*), ($p > 0.05$; Tab. II), but the effect of sampling location on otolith shape was significant for all other species in the pRDA (significant effect of sampling location; Tab. II). These results suggest geographical variation in otolith shape that could be used to discriminate individuals from different geographical origins. Consequently, other analyses were performed to evaluate with precision the stock structure inferred from otolith shape for these seven species (*Aphareus rutilans*, *Epinephelus fasciatus*, *Etelis carbunculus*, *Lutjanus kasmira*, *Lutjanus notatus*, *Pristipomoides filamentosus* and *Variola albimarginata*). Firstly, unsupervised classification by cluster analysis was applied to these species to optimize the number of groups. The optimal cluster number was two for all species (Tab. III, number of otoliths per sampling area and cluster shown in

supplementary Tab. I). Sampling location was therefore used as an explanatory variable in the subsequent otolith shape-based LDA. For all species, only locations with samples of at least six individuals were included in the LDA. The overall jackknifed classification success was between 67.73% (*Lutjanus notatus*) and 85.51% (*Etelis carbunculus*; Tab. III). These levels of individuals assigned correctly by the LDA were higher than those obtained from random distribution (*i.e.*, 50%). Among seven tested species, four showed a single group from all sampled locations (*Aphareus rutilans*, *Epinephelus fasciatus*, *Lutjanus notatus* and *Variola albimarginata*; Tab. III). Among three species with 2 groups composed of several locations, *Etelis carbunculus* and *Pristipomoides filamentosus* showed that the best overall classification success was obtained by classifying the coastal waters of La Réunion Island into two groups along a north-west / south-east axis (Supplementary Fig. 1). For *Lutjanus kasmira*, two groups were not composed of continuous geographical areas (Supplementary Figs 1, 2 show the anatomical descriptions of the otoliths for these three species). This geographical discontinuity did not explain the stock units.

DISCUSSION

Ontogenetic effect on otolith shape

Before evaluating the boundaries of stock units based on otolith shape, the first step is to measure the potential confounding effects. The first potential confounding effect is the development of the otolith shape in relation to total length throughout the life history of the fish. Our study showed that eight out of nine species of demersal fishes from La Réunion Island (except *Pristipomoides argyrogrammicus*) showed a significant change in otolith shape with fish growth throughout ontogeny. This trend has also been observed in mullet species in the Mediterranean Sea (D'Iglio *et al.*, 2022), common sole (*Solea solea*) in the Southern North Sea (Delerue-Ricard *et al.*, 2019; Randon *et al.*, 2020), giant grenadier (*Albatrossia pectoralis*) in the Northeast Pacific Ocean (Rodgveller *et al.*, 2017), and sable squirrelfish (*Sargocentron spiniferum*) in the Red Sea (Osman *et al.*, 2021). To limit the ontogenetic effects on otolith shape in analyses, several studies used homogenous groups with a small range of the fish length, while other studies interpreted the calcified structures of the fish and selected only individuals from the same age group to better delineate the stocks (which depended mainly on the environment) (*in* Mahé, 2019). However, it should also be considered that fish growth can be influenced by habitat (*i.e.*, the characteristics of the environment such as depth, substrate and live coral coverage, topographic heterogeneity and complexity, physiological effects of water temperature, etc.) (Oda and Parrish, 1981; Gaither *et al.*,

2011). Depending on the analysis and the species, it can be necessary to take into account the effect of fish size.

Asymmetry between left and right otoliths

The asymmetry between the left and right ears and thus their respective otoliths is another potential confounding effect to estimate when using otolith shape for stock identification. In our study, among nine commercial species, only three species (*Cephalopholis aurantia*, *Epinephelus fasciatus*, *Etelis carbunculus*) showed a significant difference in otolith shape between the left and right inner ear from the same individuals. Otolith directional asymmetry affects the acoustic functionality (sensitivity, temporal processing, and sound localization) (Lychakov and Rebane, 2005; Lychakov *et al.*, 2008) and kinetic swimming of fish (aberrant movement pattern or static space sickness) (Anken *et al.*, 1998; Beier *et al.*, 2002; Hilbig *et al.*, 2003, 2011). Otolith asymmetry could be a potential factor of influence for stock identification from otolith shape (Palmer *et al.*, 2010; Mahé *et al.*, 2018, 2021; Delerue-Ricard *et al.*, 2019). This has been seen in *Boops boops*, where Mahé *et al.* (2018) found a difference between predicted stock boundaries depending whether the left or right otolith was used. In our study, among three species showing significant asymmetry, the geographical effect was only significant for two species (*Epinephelus fasciatus*, *Etelis carbunculus*). For these two species, the interaction between side and location effects was significant, therefore the analyses were carried out on both otoliths from the same individuals to integrate this potential effect. To quantify the difference between individuals from several geographical areas, symmetry throughout ontogeny must be measured or integrated into the final analysis to test only the geographical effect.

Otolith shape as a tool for stock identification

After looking at the potential confounding effects of ontogeny and bilateral asymmetry, variation in otolith shape was analyzed according to the environment/geographical difference (*i.e.*, location effect). In a previous study, the otolith shape of *Mulloidichthys flavolineatus* showed significant difference between La Réunion and Maurice Islands, which are geographically close (Pothin *et al.*, 2006), indicating minimal movement between areas. Additionally, another study on the bluestripe snapper (*Lutjanus kasmira*) in Society Archipelago (French Polynesia, south-central Pacific) also showed significant otolith shape differences between groups of fish that were geographically close (Vignon *et al.*, 2008). The observed differences at small geographical scales could be due to species composed of resident individuals with limited local movement, as seen in several tropical reef species. Two species, *Cephalopholis aurantia* and *Pristipomoides argyrogrammicus*, did not show any significant difference in the location effect, and each could therefore be considered

a single population around La Réunion Island. Shimose *et al.* (2020) demonstrated that *P. argyrogrammicus* shows a homogeneous population at the microscale but could have morphometric differences for very different environmental conditions (*e.g.*, China Sea/Indo-West), which could also be the case for the fishes in this study.

The continuity of each delineation proposed by our analyses showed that only two species (*E. carbunculus* and *P. filamentosus*, Supplementary Fig. 1) demonstrated consistent stock discrimination. DeMartini (2016) observed a difference in size at sexual maturity for *Elis carbunculus* at a similarly small geographic scale (*e.g.*, north-western Hawaiian Islands), and suggested that this difference could be related to water temperature, depth or environmental differences. Smith (1992) also showed a difference in otolith morphology between *E. carbunculus* in a micro-scale (study on 4 sites in Hawaii and the French Polynesian islands). For *P. filamentosus*, Gaither *et al.* (2010a, b) demonstrated using genetic and microsatellite markers that there are also micro-scale stock differences in the Hawaiian Islands.

From our study, two clusters along a northwest/southeast axis were observed for both *E. carbunculus* and *P. filamentosus*. According to the habitat typology of La Réunion Island, these species are separated into two habitat types, with coral reef habitat in the northwestern area (sampling locations A1, B2, B3, C4, Supplementary Fig. 1) and no coral reef in the southeastern area (sampling locations E9, D8, D7, D6, C5, C10).

In this study, only two populations were delineated out of nine possible species. Five other species were also delimited but without geographical continuity (*Lutjanus kasmira*, Supplementary Fig. 1) or only one area versus all other areas. For these species, our results must be completed before stock units around La Réunion Island can be meaningfully discussed for these species. These delimitation issues could be an artefact of poor geographic sampling in addition to other confounding effects of otolith shape. To increase the discrimination power of this study, we recommend filling gaps in otolith shape data around La Réunion Island with more extensive sampling by species and location, integrating otolith data at a broader geographic scale, or comparing the results with other stock markers, such as genetics, and performing a combined multi-marker analysis (Randon *et al.*, 2020).

Acknowledgements. – The authors thank all people who helped with the samples. The authors would like to extend their sincere thanks to the reviewers that give relevant recommendation to improve this paper.

This study was supported by the French National Research Agency (ANR-21-EXES-0011), the Data Collection Framework (DCF; EC Reg. 199/2008, 665/2008; Decisions 2008/949/EC and 2010/93/EU), the European Fisheries Fund (EFF 2007-2013), the European Maritime and Fisheries Fund (EMFF 2014-2020) and the French State. This work was supported too by the Institut Français de

Recherche et d'Exploitation de la Mer and the ULCO University (doctoral support to N. Andrialovanirina, 2021-2024).

REFERENCES

- ANKEN R.H., KAPPEL T. & RAHMANN H., 1998. – Morphometry of fish inner ear otoliths after development at 3g hypergravity. *Acta Oto-Otolaryngol.*, 118: 534-539. <https://doi.org/10.1080/00016489850154685>
- AVIGLIANO E., MAICHAK DE CARVALHO B., LEISEN M., ROMERO R., VELASCO G., VIANNA M., BARRA F. & VOLPEDO A.V., 2017. – Otolith edge fingerprints as approach for stock identification of *Genidens barbatus*. *Estuar., Coast. Shelf Sci.*, 194: 92-96. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.06.008>
- BEACHAM T.D., 2021. – Parentage-based tagging combined with genetic stock identification is a cost-effective and viable replacement for coded-wire tagging in large-scale assessments of Canadian salmon fisheries. *Fish. Res.*, 239: 105920. <https://doi.org/10.1111/eva.13203>
- BEIER M., ANKEN R.H. & RAHMANN H., 2002. – Susceptibility to abnormal (kinetotic) swimming fish correlates with inner ear carbonic anhydrase-reactivity. *Neurosci. Lett.*, 335: 17-20. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)01151-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)01151-5)
- BERTRAND G., LE RU L. & EVANO H., 2011. – Données biologiques sur les poissons démersaux profonds capturés au virelign électrique en 2011 à La Réunion (campagnes du projet ANCRE-DMX). Ifremer – Délégation Océan Indien / La Réunion, 40. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00089/20049/18233.pdf>
- BIAIS G. & TAQUET M., 1992. – La pêche locale aux abords de la Réunion. Ifremer, 81. <https://archimer.ifremer.fr/doc/1992/rapport-1455.pdf>
- BIRD J.L., EPPLER D.T. & CHECKLEY Jr D.M., 1986. – Comparisons of herring otoliths using Fourier series shape analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43: 1228-1234. <https://doi.org/10.1139/f86-152>
- BLANCHARD F., GUYADER O., ROOS D., REYNAL L. & WEISS J., 2018. – Connaissance des stocks pêchés par les flottilles des territoires français qui sont aussi régions ultra-périphériques de l'Union européenne (Guadeloupe, Guyane, La Réunion, Martinique, Mayotte, Saint Martin). Réponse à la saisine DPMA 18-13767. DPMA - Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture, La Défense, Ref. DG/2019.275 - saisine DPMA 18-13767, 202. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00506/61723/>
- CADRIN S., KERR L. & MARIANI S. (eds), 2014. – Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science. Second Edition. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-07625-1>
- CAMPANA S.E. & CASSELMAN J.M., 1993. – Stock discrimination using otolith shape analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 1062-1083. <https://doi.org/10.1139/f93-123>
- CARDINALE M., DOERING-ARJES P., KASTOWSKY M. & MOSEGAARD H., 2004. – Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 61: 158-167. <https://doi.org/10.1139/f03-151>
- CASSELMAN J.M., 1987. – Determination of age and growth. In: Weatherley A.H. & Gill H.S. (Eds), *The Biology of Fish Growth*, pp. 209-242. New York.

- CHABANET P., 1994. – Étude des relations entre les peuplements benthiques et les peuplements ichtyologiques sur le complexe récifal de Saint-Gilles - La Saline (Île de la Réunion). PhD Thesis, 235 p. Université Aix-Marseille 3, France.
- CRUZ T.A., THORPE J.P. & PULLIN R.S.V., 1982. – Enzyme electrophoresis in *Tilapia zillii*: a pattern for determining biochemical genetic markers for use in tilapia stock identification. *Aquaculture*, 29: 311-329. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(82\)90145-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(82)90145-4)
- DELERUE-RICARD S., STYNEN H., BARBUT L., MORAT F., MAHÉ K., HABLÜTZEL P.I., HOSTENS K. & VOLCKAERT F.A.M., 2019. – Size-effect, asymmetry, and small-scale spatial variation in otolith shape of juvenile sole in the Southern North Sea. *Hydrobiologia*, 845: 95-108. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-018-3736-3>
- DEMARTINI E.E., 2016. – Body size at sexual maturity in the etelina snappers *Etelis carbunculus* and *Pristipomoides sieboldii*: subregional comparisons between the main and north-western Hawaiian Islands. *Mar. Freshw. Res.*, 68: 1178-1186. <https://doi.org/10.1071/MF16174>
- D'IGLIO C., NATALE S., ALBANO M., SAVOCA S., FAMILARI S., GERVAZI C., LANTERI G., PANARELLO G., SPANÒ N. & CAPILLO G., 2022. – Otolith analyses highlight morpho-functional differences of three species of mullet (Mugilidae) from transitional water. *Sustainability*, 14: 398. <https://doi.org/10.3390/su14010398>
- DOERING P. & LUDWIG J., 1990. – Shape analysis of otoliths – a tool for indirect ageing of eel, *Anguilla anguilla* (L.)? *Int. Rev. ges. Hydrobiol. Hydrogr.*, 75: 737-743. <https://doi.org/10.1002/iroh.19900750607>
- FAURE G., 1982. – Recherches sur les peuplements de Scléractiniaires des récifs coralliens des Mascareignes (Océan Indien occidental). PhD Thesis, 206 p. Université d'Aix-Marseille II, France.
- FLEURY P.G., EVANO H., LE RU L. & AURECHE V., 2012. – Synthèse de l'étude et des campagnes à la mer 2011 sur l'exploitation aux vire-lignes des espèces démersales profondes autour de La Réunion. Ifremer – Délégation Océan Indien / La Réunion, 48. <https://doi.org/10.13155/20902>
- FOX J. & WEISBERG S., 2011. – An R Companion to Applied Regression. Los Angeles: Thousand Oaks.
- FOX J., WEISBERG S., ADLER D., BATES D., BAUD-BOVY G., ELLISON S. & HEILBERGER R., 2011. – Package “car”: Companion to applied regression. R Project.
- GAITHER M.R., TOONEN R.J., ROBERTSON D.R., PLANES S. & BOWEN B.W., 2010a. – Genetic evaluation of marine biogeographical barriers: perspectives from two widespread Indo-Pacific snappers (*Lutjanus kasmira* and *Lutjanus fulvus*). *J. Biogeogr.*, 37: 133-147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2009.02188.x>
- GAITHER M.R., TOONEN R.J., SORENSON L. & BOWEN B.W., 2010b. – Isolation and characterization of microsatellite markers for the Crimson Jobfish, *Pristipomoides filamentosus* (Lutjanidae). *Conserv. Genet. Resour.*, 2: 169-172. <https://doi.org/10.1007/s12686-009-9119-3>
- GAITHER M.R., JONES S.A., KELLEY C., NEWMAN S.J., SORENSON L. & BOWEN B.W., 2011. – High connectivity in the deepwater snapper *Pristipomoides filamentosus* (Lutjanidae) across the Indo-Pacific with isolation of the Hawaiian Archipelago. *PLOS ONE*, 6: e28913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028913>
- GONÇALVES P., MAHE K., ELLEBOODE R., CHANTRE C., MURTA A., AVILA DE MELO A. & CABRAL H., 2017. – Blue whiting otoliths pair's symmetry side effect. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.*, 5(3 Part A): 06-09. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00388/49887/>
- GRAHL-NIELSEN O., 2014. – Chapter Twelve: Fatty acid profiles as natural marks for stock identification. In: Cadrin S.X., Kerr L.A. & Mariani S. (eds), *Stock Identification Methods* (Second Edition), pp. 235-256. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397003-9.00012-6>
- HALIM A., LONERAGAN N.R., WIRYAWAN B., FUJITA R., ADHURI D.S., HORDYK A.R. & SONDIRA M.F.A., 2020. – Transforming traditional management into contemporary territorial-based fisheries management rights for small-scale fisheries in Indonesia. *Mar. Pol.*, 116: 103923. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2020.103923>
- HEIBERGER R.M. & HEIBERGER M.R.M., 2022. – Package ‘HH.’ R Project.
- HILBIG R., ANKEN R.H. & RAHMANN H., 2003. – On the origin of susceptibility to kinetotic swimming behaviour in fish: a parabolic aircraft flight study. *J. Vestib. Res.*, 12: 185-189.
- HILBIG R., KNIE M., SHCHERBAKOV D. & ANKEN R.H., 2011. – Analysis of behaviour and habituation of fish exposed to diminished gravity in correlation to inner ear stone formation: a sounding rocket experiment (TEXUS 45). Proc. of the 20th ESA Symp. on Europe Rocket and Balloon Programmes and Related Research, 22-26 May 2011, Hyere, France.
- KLECKA W.R., IVERSEN G.R. & KLECKA W.R., 1980. – Discriminant Analysis. 76 p. SAGE.
- KUHL F.P. & GIARDINA C.R., 1982. – Elliptic Fourier features of a closed contour. *Comput. Gr. Image Process.*, 18: 236-258. [https://doi.org/10.1016/0146-664X\(82\)90034-X](https://doi.org/10.1016/0146-664X(82)90034-X)
- LÊ S., JOSSE J. & HUSSON F., 2008. – FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.*, 25: 1-18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- LEGENDRE P. & LEGENDRE L., 2012. – Numerical Ecology. 1007 p. Elsevier.
- LESTER R.J.G. & MACKENZIE K., 2009. – The use and abuse of parasites as stock markers for fish. *Fish. Res.*, 97: 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2008.12.016>
- LESTREL P.E., 2008. – Fourier descriptors and their applications in biology. Cambridge: University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511529870>
- LOMBARTE A. & LLEONART J., 1993. – Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. *Environ. Biol. Fish.*, 37: 297-306. <https://doi.org/10.1007/BF00004637>
- LOMBARTE A., TORRES G.J. & MORALES-NIN B., 2003. – Specific *Merluccius* otolith growth patterns related to phylogenetics and environmental factors. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 83: 277-281. <https://doi.org/10.1017/S0025315403007070h>
- LYCHAKOV D.V. & REBANE Y.T., 2005. – Fish otolith mass asymmetry: morphometry and influence on acoustic functionality. *Hear. Res.*, 201: 55-69. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2004.08.017>
- LYCHAKOV D.V., REBANE Y.T., LOMBARTE A., DEMESTRE M. & FUIMAN L.A., 2008. – Saccular otolith mass asymmetry in adult flatfishes. *J. Fish Biol.*, 72: 2579-2594. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01869.x>
- MAHÉ K., 2019. – Sources de variation de la forme des otolithes : implications pour la discrimination des stocks de poissons. PhD thesis, 273 p. Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), France.
- MAHÉ K., FAVE S. & COUTEAU J., 2011. – TNPC User guide. Ifremer – Département Halieutique Manche Mer du Nord, Laboratoire Ressources Halieutiques de Boulogne, 83.

- MAHÉ K., IDER D., MASSARO A., HAMED O., JURADO-RUZAF A., GONÇALVES P., ANASTASOPOULOU A., JADAUD A., MYTILINEOU C., ELLEBOODE R., RAMDANE Z., BACHA M., AMARA R., DE PONTUAL H. & ERNANDE B., 2018. – Directional bilateral asymmetry in otolith morphology may affect fish stock discrimination based on otolith shape analysis. *ICES J. Mar. Sci.*, 76: 232-243. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsy163>
- MAHÉ K., MACKENZIE K., IDER D., MASSARO A., HAMED O., JURADO-RUZAF A., GONÇALVES P., ANASTASOPOULOU A., JADAUD A., MYTILINEOU C., RANDON M., ELLEBOODE R., MORELL A., RAMDANE Z., SMITH J., BEKAERT K., AMARA R., DE PONTUAL H. & ERNANDE B., 2021. – Directional bilateral asymmetry in fish otolith: a potential tool to evaluate stock boundaries? *Symmetry*, 13: 987. <https://doi.org/10.3390/sym13060987>
- MORALES-NIN B.Y.O., 1987. – The influence of environmental factors on microstructure of otoliths of three demersal fish species caught off Namibia. *S. Afr. J. Mar. Sci.*, 5: 255-262. <https://doi.org/10.2989/025776187784522207>
- MOSEGAARD H., SVEDÅNG H. & TABERMAN K., 1988. – Uncoupling of somatic and otolith growth rates in arctic char (*Salvelinus alpinus*) as an effect of differences in temperature response. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45: 1514-1524. <https://doi.org/10.1139/f88-180>
- MURDOCH D., CHOW E.D., MURDOCH M.D. & SUGGESTS M., 2020. – Package ‘ellipse.’ *Am. Stat.*, 50: 178-180.
- NEWMAN S.J., WILLIAMS A.J., WAKEFIELD C.B., NICOL S.J., TAYLOR B.M. & O’MALLEY J.M., 2016. – Review of the life history characteristics, ecology and fisheries for deep-water tropical demersal fish in the Indo-Pacific region. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 26: 537-562. <https://doi.org/10.1007/s11660-016-9442-1>
- ODA D.K. & PARRISH J.D., 1981. – Ecology of commercial snappers and groupers introduced to Hawaiian reefs. Presented at the 4th International Coral Reef Symposium, Manila (Philippines), 18-22 May 1981.
- OKSANEN J., BLANCHET F.G., KINDT R., LEGENDRE P., MINCHIN P.R., O’HARA R.B., SIMPSON G.L., SOLYMO P., STEVENS M.H.H. & WAGNER H., 2013. – Package ‘vegan.’ *Community Ecol.*, Package, version, 2: 1-295.
- OSMAN Y.A.A., MAHÉ K., EL-MAHDY S.M., MOHAMMAD A.S. & MEHANNA S.F., 2021. – Relationship between body and otolith morphological characteristics of sabre squirrelfish (*Sargocentron spiniferum*) from the Southern Red Sea: difference between right and left otoliths. *Oceans*, 2: 624-633. <https://doi.org/10.3390/oceans2030035>
- PAKGOHAR N., ESHAGHI RAD J., GHOLAMI G., ALIJANPOUR A. & ROBERTS D.W., 2021. – A comparative study of hard clustering algorithms for vegetation data. *J. Veg. Sci.*, 32: e13042. <https://doi.org/10.1111/jvs.13042>
- PALMER M., LINDE M. & MORALES-NIN B., 2010. – Distinguishing fluctuating asymmetry from otolith shape. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 399: 261-272. <https://doi.org/10.3354/meps08347>
- PASCUAL S., ABOLLO E. & GONZÁLEZ A.F., 2016. – Biobanking and genetic markers for parasites in fish stock studies. *Fish. Res.*, Spec. issue Adv. in Fish Stock Delineation, 173: 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2015.10.001>
- POTHIN K., GONZALEZ-SALAS C., CHABANET P. & LECOMTE-FINIGER R., 2006. – Distinction between *Mulloidichthys flavolineatus* juveniles from Reunion Island and Mauritius Island (south-west Indian Ocean) based on otolith morphometrics. *J. Fish Biol.*, 69: 38-53. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01047.x>
- R CORE TEAM, 2017. – R Core Team, 2017. – R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- RANDON M., PAPE O.L., ERNANDE B., MAHÉ K., VOLCKAERT F.A.M., PETIT E.J., LASSALLE G., BERRE T.L. & RÉVEILLAC E., 2020. – Complementarity and discriminatory power of genotype and otolith shape in describing the fine-scale population structure of an exploited fish, the common sole of the Eastern English Channel. *PLOS ONE*, 15: e0241429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241429>
- RENCHER A.C. & CHRISTENSEN W.F., 2012. – Methods of multivariate regression analysis (3rd edition). Methods of multivariate analysis, Wiley Series in Probability and Statistics.
- RIPLEY B., VENABLES B., BATES D.M., HORNIK K., GEBHARDT A., FIRTH D. & RIPLEY M.B., 2013. – Package ‘mass.’ *Cran r*, 538: 113-120.
- RODGVELLER C.J., HUTCHINSON C.E., HARRIS J.P., VULSTEK S.C. & GUTHRIE III C.M., 2017. – Otolith shape variability and associated body growth differences in giant grenadier, *Albatrossia pectoralis*. *PLOS ONE*, 12: e0180020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180020>
- ROHLF F.J. & ARCHIE J.W., 1984. – A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Syst. Biol.*, 33: 302-317. <https://doi.org/10.2307/2413076>
- ROOS D., TESSIER E., BERTHIER P. & BERTHIER L., 2001a. – Les métiers de la pêche à la Réunion : description et évolution des techniques de pêche sur les DCP. *FADs Fish. Methods*, 13. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00042/15294/12652.pdf>
- ROOS D., TESSIER E. & TAQUET M., 2001b. – Prospection des ressources côtières démersales profondes autour de La Réunion. Analyse des données des campagnes à la mer réalisée du 23/02/2000 au 28/07/2000. Rapport de synthèse des travaux confiés par le CRPME de La Réunion à l’Ifremer Délégation Océan Indien. RST-DOI/2001-01. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00410/52117/>
- ROOS D., AUMOND Y., HUET J. & BRUCHON F., 2015. – Projet ANCRE-DMX2 : Indicateurs biologiques et écologiques pour une gestion durable des stocks de poissons DéMersaux profonds (100–700 m) d’intérêt halieutique à La Réunion. RST/RBE-DOI/2015-11. <https://doi.org/10.13155/45812>
- SARAÇLI S., DOĞAN N. & DOĞAN İ., 2013. – Comparison of hierarchical cluster analysis methods by cophenetic correlation. *J. Inequal. Appl.*, 203. <https://doi.org/10.1186/1029-242X-2013-203>
- SECOR D.H. & DEAN J.M., 1989. – Somatic growth effects on the otolith-fish size relationship in young pond-reared striped bass, *Morone saxatilis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 113-121. <https://doi.org/10.1139/f89-015>
- SHIMOSE T., SUZUKI N. & IWATSUKI Y., 2020. – *Pristipomoides amoenus* (Snyder 1911), a valid species of jobfish (Pisces, Lutjanidae), with comparisons to *P. argyrogrammicus* (Valenciennes 1832). *Zootaxa*, 4728: 469-476. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4728.4.5>
- SINCLAIR I. & LANGRAND O., 2013. – Oiseaux des îles de L’océan Indien. 266 p. Penguin Random House South Africa.
- SMITH M.K., 1992. – Regional differences in otolith morphology of the deep slope red snapper *Etelis carbunculus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49. <https://doi.org/10.1139/f92-090>
- TEDETTI M., CUET P., GUIGUE C. & GOUTX M., 2011. – Characterization of dissolved organic matter in a coral reef ecosystem subjected to anthropogenic pressures (La Réunion Island, Indian Ocean) using multi-dimensional fluorescence spectroscopy. *Sci. Total Environ.*, 409: 2198-2210. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.058>

VASCONCELOS J., HERMIDA M., SARAIVA A., GONZÁLEZ J.A. & GORDO L.S., 2017. – The use of parasites as biological tags for stock identification of blue jack mackerel, *Trachurus picturatus*, in the North-eastern Atlantic. *Fish. Res.*, 193: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.03.015>

VIGNON M., 2015. – Disentangling and quantifying sources of otolith shape variation across multiple scales using a new hierarchical partitioning approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 534: 163-177. <https://doi.org/10.3354/meps11376>

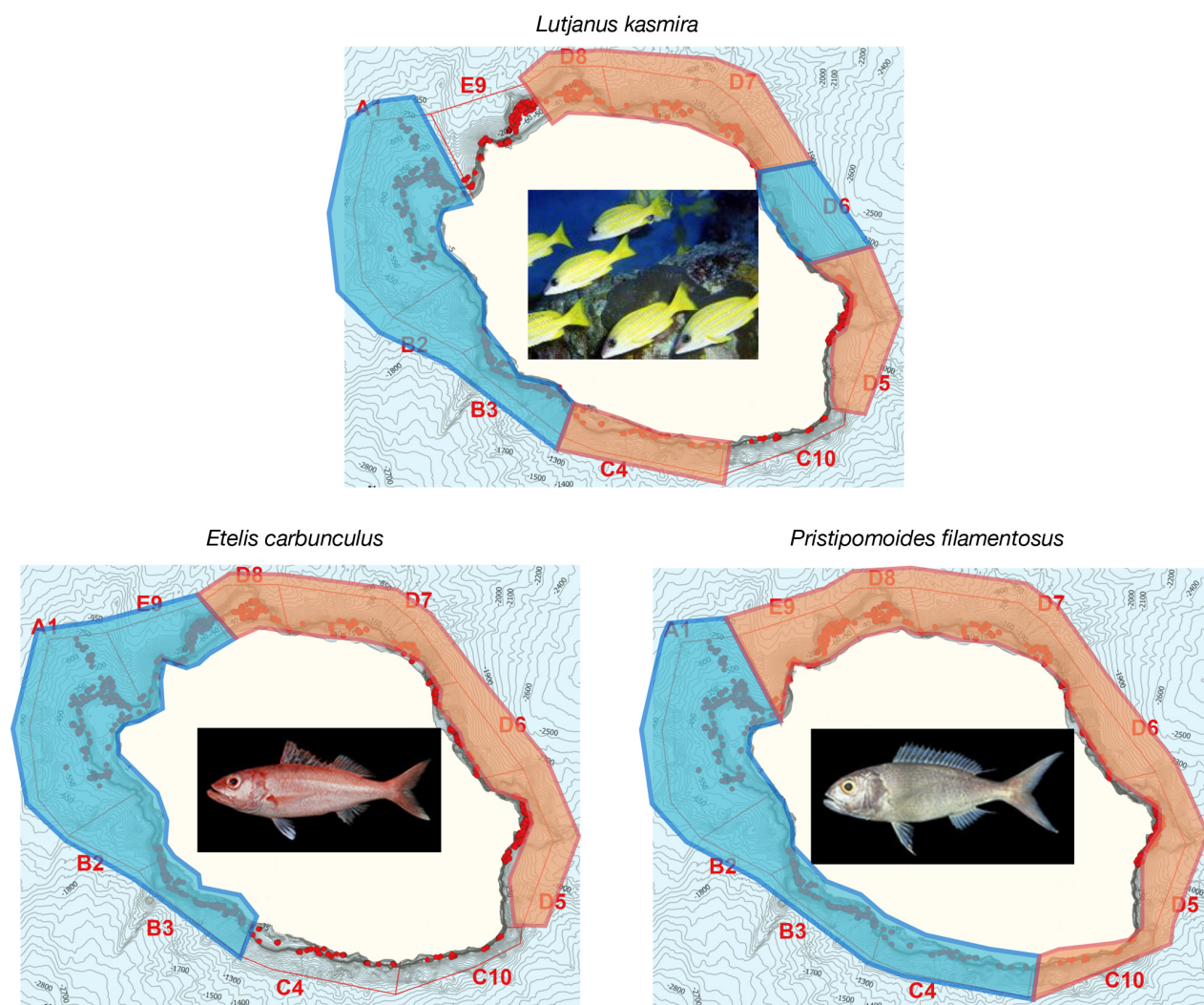
VIGNON M. & MORAT F., 2010. – Environmental and genetic determinant of otolith shape revealed by a non-indigenous tropical fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 411: 231-241. <https://doi.org/10.3354/meps08651>

VIGNON M., MORAT F., GALZIN R. & SASAL P., 2008. – Evidence for spatial limitation of the bluestripe snapper *Lutjanus kasmira* in French Polynesia from parasite and otolith shape analysis. *J. Fish Biol.*, 73: 2305-2320. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02070.x>

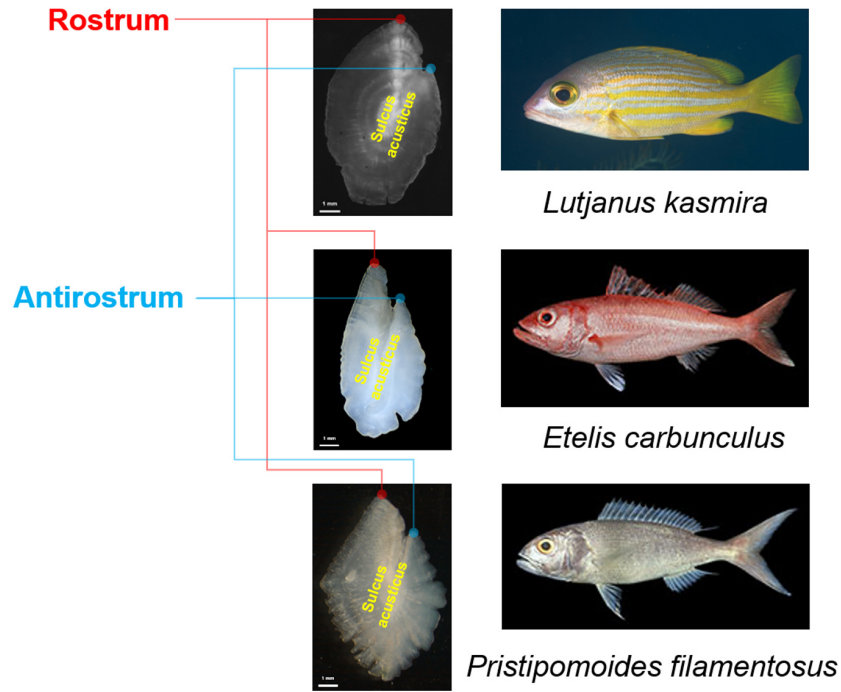
WEISS J., DUCHÊNE J., LE BLOND S., EVANO H., DEMANÈCHE S., LE ROY E. & LEBLOND E., 2019. – Synthèse des pêcheries de Réunion 2018. 19 p. Ifremer-sih-2019.06.

WILSON R.R., 1985. – Depth-related changes in sagitta morphology in six macrourid fishes of the Pacific and Atlantic oceans. *Copeia*, 1985: 1011-1017. <https://doi.org/10.2307/1445256>

Supplementary data



Supplementary figure 1. – Continuity of stock delimitation (*Lutjanus kasmira*, *Etelis carbunculus*, *Pristipomoides filamentosus*).



Supplementary figure 2. – Anatomical descriptions of sagittal otoliths for *Lutjanus kasmira*, *Etelis carbunculus* and *Pristipomoides filamentosus*.

Supplementary table I. – Distribution of otoliths according to area sampling and cluster.

Species	Area	Cluster 1	Cluster 2
<i>Aphareus rutilans</i>	A1	7	3
	B3	39	7
	C5	4	2
	D8	5	16
	E9	7	2
<i>Epinephelus fasciatus</i>	A1	12	15
	B3	35	52
	C10	5	34
	C4	6	0
	D7	85	12
<i>Etelis carbunculus</i>	A1	25	31
	B3	40	19
	C5	1	5
	D8	4	4
	E9	14	24
<i>Lutjanus kasmira</i>	A1	75	30
	B2	17	5
	B3	8	95
	C4	3	10
	C5	9	39
	D6	13	3
	D7	27	83
	D8	26	102

Species	Area	Cluster 1	Cluster 2
<i>Lutjanus notatus</i>	A1	12	11
	B3	11	89
	C4	7	4
	C5	16	24
	D6	21	8
	D7	30	49
	D8	4	18
	E9	2	7
	<i>Pristipomoides filamentosus</i>	A1	13
B2		5	3
B3		57	39
C10		4	7
C4		11	2
C5		7	2
D6		4	4
D7		3	6
D8		8	8
<i>Variola albimarginata</i>	A1	47	16
	B3	7	0
	C10	36	3
	C4	5	1
	D8	5	7

Supplementary table II. – Confusion matrix between sample areas and predicted areas (blue boxes show correct classification).

Species	Jackknifed matrix		Predicted area				
			A1	B3	C5	D8	E9
<i>Aphareus rutilans</i>	Actual area	A1	1	2	3	2	2
		B3	4	27	4	5	6
		C5	1	1	3	1	0
		D8	1	5	3	10	2
		E9	1	1	1	2	4
<i>Epinephelus fasciatus</i>	Actual area	A1	3	4	9	3	8
		B3	6	35	20	5	21
		C10	5	10	14	8	2
		C4	1	0	0	4	1
		D7	9	11	5	7	65
<i>Etelis carbunculus</i>	Actual area	A1	23	13	5	6	9
		B3	10	26	8	9	6
		C5	1	1	3	1	0
		D8	3	2	1	0	2
		E9	14	5	3	6	10

Supplementary table II. – Continued.

<i>Lutjanus kasmira</i>	Jackknifed matrix		Predicted area									
			A1	B2	B3	C4	C5	D6	D7	D8		
	Actual area	A1	25	27	14	5	2	16	3	13		
		B2	3	14	0	0	0	2	0	3		
		B3	3	3	33	17	16	1	16	14		
		C4	0	0	1	5	2	1	1	3		
		C5	6	0	5	9	18	0	3	7		
		D6	3	4	0	1	0	6	0	2		
		D7	8	6	26	13	13	12	14	18		
D8		12	10	24	20	13	3	7	39			
<i>Lutjanus notatus</i>	Jackknifed matrix		Predicted area									
			A1	B3	C4	C5	D6	D7	D8	E9		
	Actual area	A1	1	2	3	2	7	1	5	2		
		B3	6	36	0	6	3	10	27	12		
		C4	0	1	6	0	2	0	1	1		
		C5	4	2	6	7	8	4	5	4		
		D6	1	1	8	2	13	2	1	1		
		D7	3	20	14	4	9	6	14	9		
		D8	1	10	1	1	1	1	3	4		
E9		3	0	0	2	2	2	0	0			
<i>Pristipomoides filamentosus</i>	Jackknifed matrix		Predicted area									
			A1	B2	B3	C10	C4	C5	D6	D7	D8	E9
	Actual area	A1	3	5	0	3	1	3	1	5	1	1
		B2	1	2	0	0	3	0	0	1	1	0
		B3	7	1	17	13	4	14	13	4	9	14
		C10	1	0	3	0	0	1	3	2	1	0
		C4	1	2	1	1	4	1	0	1	2	0
		C5	0	1	1	0	3	2	1	0	0	1
		D6	0	0	1	0	0	0	1	1	4	1
		D7	2	0	0	0	0	1	1	2	3	0
D8		2	2	2	0	3	1	3	0	0	3	
E9	3	1	3	5	3	5	3	0	3	3		
<i>Variola albimarginata</i>	Jackknifed matrix		Predicted area									
			A1	B3	C10	C4	D8					
	Actual area	A1	13	18	10	11	11					
		B3	2	0	3	2	0					
		C10	10	7	9	12	1					
		C4	2	2	2	0	0					
D8		4	2	0	1	5						

Supplementary table III. – Hypothesis tested to obtain the best rate of correct classification.

Species	Hypothesis	Area composition	Correct classification rate (%)
<i>Aphareus rutilans</i>	1	D8	80.04*
		A1, B3, C5, E9	
	2	D8, E9	70.06
		A1, B3, C5	
	3	D8, E9, A1	71.74
		B3, C5	
	4	D8, E9, C5	70.06
		A1, B3	
<i>Epinephelus fasciatus</i>	1	A1, E9	68.26
		B3, C5, D8	
	2	A1, B3, E9	64.07
		C5, D8	
	3	A1, D8, E9	69.46
		B3, C5	
	4	A1, B3, D8, E9	77.84*
		C5	
<i>Etelis carbunculus</i>	1	A1, E9	84.05
		B3, C5, D8	
	2	A1, E9, B3	85.51*
		C5, D8	
	3	A1, E9, D8	73.91
		B3, C5	
<i>Lutjanus kasmira</i>	1	A1, B2, D6	80.00*
		B3, C4, C5, D7, D8	
	2	B3, C4, C5	65.70
		A1, B2, D6, D7, D8	
	3	A1, B2, B3, C4	57.00
		C5, D6, D7, D8	
<i>Lutjanus notatus</i>	1	B3, D8, E9	67.09
		A1, C4, C5, D6, D7	
	2	A1, B3, C5, D8, E9	65.08
		C4, C5, D6, D7	
	3	D8, E9	54.63
		A1, B3, C4, C5, D6, D7	
4	B3	67.73*	
	A1, C4, C5, D6, D7, D8, E9		
<i>Pristipomoides filamentosus</i>	1	A1, B2, B3, C10, C4, C5	49.54
		D6, D7, D8, E9	
	2	A1, B2, B3, C4, C5, D6, D8	52.70
		C10, D7, E9	
	3	A1, B2, B3, C4, C5	54.40
		C10, D7, E9, D6, D8	
	4	A1, B2, B3, C4	54.5*
		C5, C10, D7, E9, D6, D8	
	5	A1, B2, B3	49.50
		C4, C5, C10, D7, E9, D6, D8	

Supplementary table III. – Continued.

Species	Hypothesis	Area composition	Correct classification rate (%)
<i>Variola albimarginata</i>	1	D8	84.25*
		A1, B3, C10, C4	
	2	A1, D8	62.99
		B3, C10, C4	
	3	D8, C10	49.61
		A1, B3, C4	
	4	D8, C4	74.80
		A1, B3, C10	

3.3 Identification du stock de rougets barbet de vase sans référence en utilisant la forme de leurs otolithes

L'article suivant publié dans la suite des articles (proceedings) de conférence RFIAP 2024 décrit différentes approches de Machine Learning pour identifier les stocks de Rouget Barbet de vase (*Mullus Barbatus*).

Red mullet stock identification without any reference using otolith shape

N. Andrialovanirina^{1,2}

É. Poisson Caillault¹

K. Mahé²

¹ Univ. Littoral Côte d'Opale, UR 4491, LISIC, F-62100 Calais, France

² IFREMER, Unité HMMN, 150 quai Gambetta, F-62321 Boulogne-sur-Mer, France

nicolas.andrialovanirina@ifremer.fr ; emilie.poisson@univ-littoral.fr ; kelig.mahe@ifremer.fr

Résumé

Dans le cadre d'une pêche durable, subissant un changement global, la connaissance préalable des limites géographiques de chaque population étudiée est requise. Dans cette étude, l'analyse automatique innovante de la forme tridimensionnelle (3D) des otolithes des rougets barbets de la Mer Méditerranée a été comparée à l'analyse conventionnelle en bidimensionnel (2D). Il a été conclu que cette nouvelle technique tridimensionnelle de la forme était plus précise pour délimiter le stock, que ce soit en utilisant une classification non supervisée ou supervisée.

Mots Clef

Clustering, classification, otolithe de poisson, 3D, harmoniques de Fourier, structure de population

Abstract

In the context of sustainable fishing, amidst global change, prior knowledge of the geographic boundaries of each studied population is required. In this study, innovative automated analysis of the three-dimensional (3D) shape of red mullet otoliths from the Mediterranean Sea was compared to conventional two-dimensional (2D) analysis. This new three-dimensional shape technique was found to be more accurate in delineating the stock, whether using unsupervised or supervised classification.

Keywords

Clustering, classification, fish otolith, 3D, Fourier harmonics, population structure.

1 Introduction

Stocks serve as the fundamental unit for assessing fishery resources and establishing sustainable exploitation levels [29]. Effective fishery management depends critically on accurately delineating fish stocks, which is a fundamental requirement for analysing the dynamics and structure of fishery management units [6]. Each distinct stock responds uniquely to fishing pressure and management interventions. Misidentifying stock units can result in suboptimal management outcomes, heightening the risks of overfishing and hampering sustainability efforts [2]. Various

methods exist for defining fish stocks (see summary in [13, 6]), including genetic markers, natural indicators (such as parasites), growth rates, fatty acids in tissues, life history traits, external tags, and microchemistry. Among these, sagittal otolith shape and microchemistry have emerged as widely used proxies for stock identification across diverse fish species [13, 6].

Otoliths, also known as "ear stones", are incrementally grown calcified structures [9]. Their shape and size vary from species to species, playing a crucial role in fish balance and hearing [9]. As individual markers, otoliths can be used to study fish growth, migration, and population dynamics [6, 13], while they also offer valuable insights into fish stock structure. Otolith shape results from a complex interplay of environmental conditions, genetic heritage, and ontogenetic evolution [7, 35]. Variations in otolith shape between individuals can even distinguish between interspecific and intraspecific fish. Otoliths are metabolically inert structures, without post-deposition alteration or resorption [9]. Recent advancements in image analysis, processing, and freely available libraries have significantly bolstered the use of otoliths as powerful tools in fish research. Notably, otolith shape analysis offers distinct advantages over genetic analysis for stock identification, primarily due to its cost-effectiveness with fast and efficient analysis [6]. There are various methods for analysing the shape of otoliths. Fourier analysis stands as a prevalent method employed to represent otolith shape [13], providing a detailed analysis of its contours and features. Another valuable technique for analysing otolith shape is wavelet analysis [24, 16]. This method provides a localized frequency description of the shape, making it particularly adept at identifying localized features [16]. By capturing variations in shape at different scales, wavelet analysis offers insights into both global and fine-scale features of the otolith. Geometric analysis entails identifying specific points (landmarks) on the otolith that correspond to biological or structural features [16]. In contrast to landmark analysis, outline analysis focuses on capturing the entire outline of the otolith rather than specific landmarks. This approach provides a holistic view of the otolith shape and can be implemented using various methods, includ-

ing Fourier Harmonics and wavelet descriptors [16]. Outline analysis allows researchers to assess shape variation across the entire contour of the otolith, offering valuable insights into its morphological characteristics [16]. However, the primary method employed to describe and to compare otolith shape is standardised Elliptical Fourier Descriptors (EFDs) [13], which serve as a potential tool for describing and comparing two-dimensional (2D) shapes.

Typically, otolith shape is extracted from two-dimensional images [6]. This view is, however, incomplete, using only one plane projection of a three-dimensional (3D) object. Potential bias may therefore arise during 2D acquisition due to the object’s position. With advancements in imaging technology, 3D shape analysis of otoliths has become feasible. This approach provides a more comprehensive representation of otolith shape compared to traditional 2D analysis. By capturing the spatial arrangement and curvature of the otolith in three dimensions, 3D shape analysis offers enhanced insights into its structural complexity and biological significance. This method unveils features not discernible in 2D analysis, thereby expanding our understanding of otolith morphology and its ecological implications. Existing research on 3D otoliths are primarily focused on: scanning and/or extracting otolith shape in three dimensions [40, 18, 19, 34, 25]; understanding the functional role and evolution of the inner-ear and otoliths, particularly concerning sound effects and equilibration (*i.e.* individual spatial location) [26, 37]. A recent study on the red mullet demonstrated that 3D analysis effectively addresses significant asymmetry in otolith shape originating from the inner-ear side (*i.e.* left versus right ear) that was not observed in 2D analysis from the same dataset [1].

After characterizing the otolith shapes, the subsequent step involves classification techniques to discriminate fish stocks. No paper in the recent literature mentions 3D automatic classification. In 2D, Principal Component Analysis (PCA) is used mainly as a dimensionality reduction preprocessing step [13, 6]. The principal components facilitate visualisation and classification of otoliths. Unsupervised approaches encompass Hierarchical Clustering [39] and K-means Clustering [15], while supervised methods include Linear Discriminant Analysis (LDA) [8], Random Forests [38], and Support Vector Machines (SVM) [33] and, recently, some Deep Neural Network for age estimation [3]. This article aims to apply automatic classification approaches on the same 2D and 3D dataset to define stock structure. The case study is the red mullet (*Mullus barbatus*), a main important commercial fish species in the Mediterranean Sea. Beyond the 2D conventional stock identification approaches based on otolith shape, additional unsupervised classification methods, including density-based and spectral clustering with recursive version, alongside supervised basic pattern matching as K-Nearest-Neighbors were used. Two objectives are studied: (1) the efficiency of 3D shape analysis compared with 2D analysis in stock delimitation, and (2) the efficiency of ba-

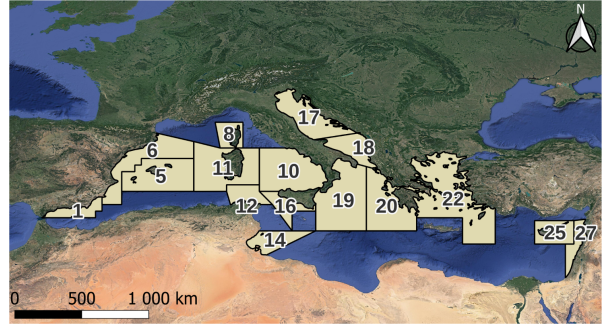


Figure 1: Segmentation of the Mediterranean Sea into the 16 geographical sub-areas (GSAs) used

sic unsupervised and/or supervised classification methods for stock identification. This paper is divided into three main parts. Section 2 is the experimental protocol from data acquisition to classification. Section 3 shows the results followed by the discussion section.

2 Methodology

2.1 Sampling and label references

316 individual fish specimens were collected from 16 geographical sub-areas (GSAs), as defined by the General Fisheries Commission for the Mediterranean (GFCM). These GSAs represent diverse marine ecosystems within the Mediterranean Sea (see figure 1 and table 1). These

n° GSA	2-stocks GFCM	3-stocks	n samples
1	1	1	7
5	1	1	23
6	1	1	12
8	1	1	12
10	1	1	13
11	1	1	5
12	1	1	19
14	1	1	16
16	1	2	58
17	1	2	8
18	2	2	30
20	2	2	20
22	2	2	36
23	2	3	18
25	2	3	24
27	2	3	27

Table 1: Sampling distribution by geographical sub-areas (GSAs) and proposal cuts of over fish stocks defined by expert groups [20, 21]

GFCM experts proposed two stocks described in table 1 based on other species’ knowledge. The first proposal delimited 2 stocks according to 16-17 GSA boundaries [20]. The second proposed stock definition adds another stock built from 22-23 GSA [21]. The sampling campaign was

conducted during the 2019 international MEDiterranean International Trawl Survey (MEDITS survey), a substantial effort to assess fish populations and their habitats in the Mediterranean Sea [30]. The MEDITS survey provides a valuable dataset for understanding the distribution and characteristics of fish species. To ensure robustness in this analysis, potential ontogenetic effects on otolith shape are considered. Consequently, the sampling is restricted to young mature fishes (*i.e.* fish after their first sexual maturity and aged between 3 and 5 years old) within a total length range from 141 to 212 mm (with a mean length of 167 ± 16 mm). Furthermore, only left otoliths (sagittae) are selected to avoid asymmetry factors. These choices ensure uniformity in our dataset and facilitate accurate comparisons across individuals. Environmental pa-

Parameter Name	Feature (M/R)	Unit
Alkalinity	M/R	mol eq kg^{-1}
Chlorophyll concentration (as carbon)	M	mg(C) m^{-3}
Molar ammonium concentration	M	mmol m^{-3}
Molar nitrate concentration	M	mmol m^{-3}
Molar dissolved molecular oxygen concentration	M/R	mmol m^{-3}
pH	M	
Molar phosphate concentration	M/R	mmol m^{-3}
Net primary production of biomass per day	M	$\text{mg m}^{-3} \text{ day}^{-1}$
Salinity	M	psu
Temperature	M	$^{\circ}\text{C}$
Velocity module	M	m s^{-1}

Table 2: Retained environmental parameters (M: Median, R: Range)

rameters have been integrated along side stock divisions (GSAs), using data extracted from models generated by the E.U. Copernicus Marine Service. Salinity, temperature, and velocity modules were derived from the Mediterranean Sea Physics Reanalysis (product identifier MEDSEA_MULTIYEAR_PHY_006_004) spanning from 1987 to 2019 [10]. These parameters were obtained from a grid with a horizontal resolution of $1/24^{\circ} \times 1/24^{\circ}$ and 125 vertical levels, increasing in thickness with depth. The model assimilates satellite sea surface temperature and sea level, along with in-situ temperature-salinity profiles. Additionally, ten other variables were sourced from the Mediterranean Sea Biogeochemistry Reanalysis (product identifier MEDSEA_MULTIYEAR_BGC_006_008) covering the period from 1999 to 2019 [31]. These variables were acquired from a grid with the same horizontal resolution and vertical levels as the previous model. The biogeochemistry model assimilates satellite chlorophyll data and is driven by physical forcing fields from the Mediterranean physical model. Values relevant to the habitat of red mullet (typically found at depths between 20 and 300 meters) were extracted and summarized as median and range val-

ues (calculated as the difference between the third and first quantiles) across three temporal windows: 5 years (2014-2018), 3 years (2016-2018), and 1 year (2018). This was done based on the age range of the sampled red mullet (3-5 years; sampled in April 2019). Parameters exhibiting weak correlations (below 0.75) were retained for further analysis (table 2), the 1-year period year was selected due to the redundancy information.

Leveraging these environmental parameters, a recursive spectral analysis [23] was conducted to generate division labels based on environmental conditions. Spectral recursive analysis stops the segmentation in 5 levels. Upon partitioning the environmental data using spectral recursive methodology, the initial division yielded two labels, while the final division resulted in seven labels (2).

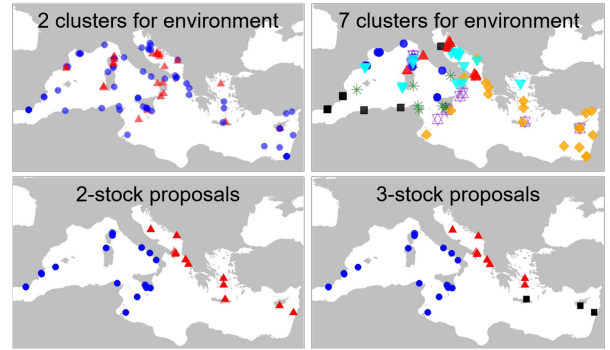


Figure 2: Delimitation by environmental data clustering and 2-stock or 3-stock units proposal by experts (groups are distinguished by a specific color and form)

2.2 Two-dimensional outlines and three-dimensional surfaces acquisition

Calibrated 2D images were taken using a binocular microscope (Leica MZ6) equipped with a 1.6x magnification and a SONY XCD-U100CR Camera. These images were captured under reflected light to reveal clear details of the otoliths. To ensure consistency in our otolith images, an R algorithm was developed to involve several essential steps. We carefully aligned all otoliths to ensure a consistent orientation. This step minimized any variations due to rotation or positioning. The grayscale otolith images were modified into binary representations, effectively creating black-and-white images. Binarization step simplified the shape representation and facilitated subsequent analyses. From the binarized images, we extracted the outlines that precisely represented the otolith shape. These outlines were used in the subsequent shape analysis. Otolith 3D images were acquired using an X-ray microtomograph. The process involved capturing two-dimensional X-ray images of the object at varied angles (covering a full rotation from 0° to 180°). These X-ray images revealed density disparities between the object and the surrounding air. We used the μCT Skyscan 1174 (Bruker). X-ray microtomograph

parameters included 800 μA intensity, 50 kV tube voltage (Tension) and 29.2 μm voxel size. After acquiring the X-ray images, the reconstruction of 3D images was performed using Nrecon software (Bruker). This process converted the X-ray images into a stack of virtual slices while preserving their spatial relationships. 3D Slicer facilitated segmentation, allowing us to extract the otolith isosurfaces as 3D meshes.

2.3 Two-dimensional and three-dimensional extraction of shape information

To ensure consistency, we selected a fixed number of points along each otolith contour, maintaining equal distances between these points ($n=200$). This approach mitigated potential bias arising from different point densities across contours. Each otolith contour was mathematically described by parametric functions $x(\theta)$ and $y(\theta)$ [14], which traced through all points starting from the otolith’s rostrum. Elliptical Fourier Descriptors (EFD) were used. We extracted the first 99 elliptical Fourier harmonics (H) for each otolith. These harmonics were normalized to the first harmonic and made invariant to otolith size, rotation, and the starting point of contour description. To determine the optimal number of harmonics needed to reconstruct the otolith outline with a precision of 99%, the cumulated Fourier Power was used [27]. Across all otoliths, we employed a maximum of 33 harmonics ($\max(nk)$) to reconstruct individual otolith contours and perform subsequent 2D analyses. The 3D otolith meshes were standardized to 10,000 triangles with 5,002 vertices per otolith. After this preliminary step, the mean shape for all individuals was rebuilt, and all individual images were aligned from this mean shape. Fourier coefficients were extracted automatically using the SPHARM analysis [4, 27] implemented in R via a custom-coded Matlab function [1]. The meshes were characterized by 35 harmonics (or degree) and 4 icosahedral subdivisions. The surface of each mesh was mathematically described using three parameterized variables: $x(\theta, \phi)$, $y(\theta, \phi)$, and $z(\theta, \phi)$ [28]. Spherical Fourier Descriptors (SFD) were used.

2.4 Shape-based classification

Firstly, Principal Components Analysis (PCA) was applied to the EFD and SFD matrix from 2D and 3D images of otolith. Only a limited number of PCs were used, with 25, 50, 75 and 100 percent of explained variance (figure 3). By reducing dimensionality, only the significant principal components (PCs) were retained.

Unsupervised classifiers. Unsupervised classification methods aim to uncover hidden structures in unlabeled data. In this study, the groups were identified based on their shapes using k prior class information identical with both environmental clusters, other stock proposals and GSAs. So each method requiring the number of clusters is tested for $k=[2,3,7,16]$.

Agglomerative Hierarchical clustering (Ward.d2) [36] was

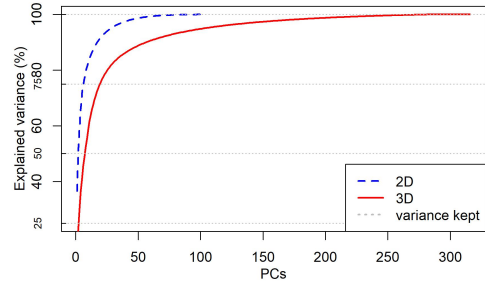


Figure 3: Number of PCs according to the percentage of explained variance for 2D and 3D shape analysis

used to construct a cluster tree by successively merging groups. At the beginning, each data point starts as a singleton cluster, then they are merged iteratively to obtain a unique cluster. This method allows the exploration of different levels of granularity in clustering, and provides a hierarchical representation of the data, enabling the identification of clusters at multiple scales.

K-means [17] was used to partition the data into k clusters by minimizing intra-cluster variance. This method iteratively assigns each data point to the nearest cluster centroid and updates the centroids based on the mean of the data points assigned to each cluster. It is simple, fast, and effective for grouping similar shapes, and works well when clusters are well-separated and roughly spherical.

DBSCAN [11] was used to identify areas of high density and form clusters around them. This method defines clusters as areas of high density separated by areas of low density. An epsilon between 0.025 and 1 was used and the number of minimum points required was 2. This method is robust to non-spherical shapes and can handle noise effectively. It does not require the user to specify the number of clusters in advance and can identify clusters of arbitrary shapes and sizes.

Spectral K-medoid Clustering (Spectral-PAM) [23] was used, also with a recursive version. This method uses the eigenvalues of the Laplacian matrix to cluster the data. It projects the data into a lower-dimensional space using eigenvectors corresponding to the smallest eigenvalues of the Laplacian matrix and then applies K-medoid clustering in the projected space. Spectral Clustering is effective in capturing complex and non-linear structures. It can identify clusters that may not be well-separated or spherical in shape and is particularly useful for data with intricate geometric structures. The first third levels were applied for the spectral recursive version. For each combination of data dimensions, number of PCAs and clustering method, the Adjusted Rand index (ARi) was applied to evaluate the similarity between predicted and other information on the stock structure (GSAs, other stock proposals and environment clusters).

Supervised classifiers. Supervised classification methods use prior learning information to predict classes. In

this case study, information on the stock structure from the expert group (GSAs, other stock proposals) was applied to train the different models. The dataset was split in two equal groups with 50% per GSA of dataset to train the model, and the other 50% to test the model.

Linear Discriminant Analysis (LDA) [12] was used to find a linear combination of features that gave the best boundary to discriminate the classes by maximizing the between-class variance and minimizing the within-class variance. LDA is particularly useful when the classes are linearly separable and assumes that the data are normally distributed within each class. It provides a simple and interpretable solution for classification tasks.

K-Nearest Neighbors (KNN) [47] (with $K=[1,3,5,10]$) was used to assign a class to a data point based on the majority vote of its k nearest neighbors in the feature space. It calculates the distance between data points to determine similarity. This method is a non-parametric, lazy learning algorithm that does not make any assumptions about the underlying data distribution. It is particularly effective for data with complex decision boundaries and can handle both numerical and categorical data.

Random Forest [5] (number of trees= $[10, 50, 100, 200]$ and $\text{split}=1$) was used to build multiple decision trees during training and combine their predictions through a majority vote to classify. It is an ensemble learning method that is robust to overfitting and noise in the data. It can handle high-dimensional data and interactions between features, making it suitable for a wide range of classification tasks.

Support Vector Machine (SVM) [49] (kernel= $[\text{linear}, \text{radial}, \text{sigmoid}]$) was used to find the optimal hyperplane that separates classes in the feature space. For linear SVM, it seeks a linear decision boundary, while for Radial Basis Function (RBF), it uses a non-linear decision boundary. RBF SVM can capture complex relationships between features. SVM with different kernel functions, including linear, radial, and sigmoid, was used allowing flexibility in modeling various types of distributions. SVM is effective in high-dimensional spaces and is suitable for both linear and non-linear classification tasks. For each shape data (2D and 3D), principal component count, and chosen supervised classifier technique, we computed accuracy metrics to assess the correspondence between predicted outcomes and various information on the stock structure (such as GSAs, other stock proposals).

3 Results

Unsupervised classifier. From unsupervised classifications, the results were quite similar whether using otolith shape with 2D or 3D images (figure 4). None of the two dimensions (*i.e.* 2D and 3D descriptors) stands out significantly. However, the stock structure seems to be optimised with 2 clusters. In fact, the Adjusted Rand index (ARi) value is higher than other divisions whatever the prior information group (*i.e.* environment clustering or ex-

pert groups or GSAs), as shown in figure 4. When using 2D shape analysis, the DBSCAN method appears to have the highest ARi, followed by K-means. In 3D, however, the results are quite similar for most classifiers (figure 4). Depending on the labels used, sometimes DBSCAN stands out slightly. Despite the higher ARi values obtained with DBSCAN, however, a considerable set of the data is unclassified. In most cases, approximately half of the data was classified as noise, with 176 ± 137 and 210 ± 83 of noise, respectively, in 2D and 3D analysis. DBSCAN was, therefore, no longer used for the remainder of the analysis of the results. Furthermore, to streamline the presentation of re-

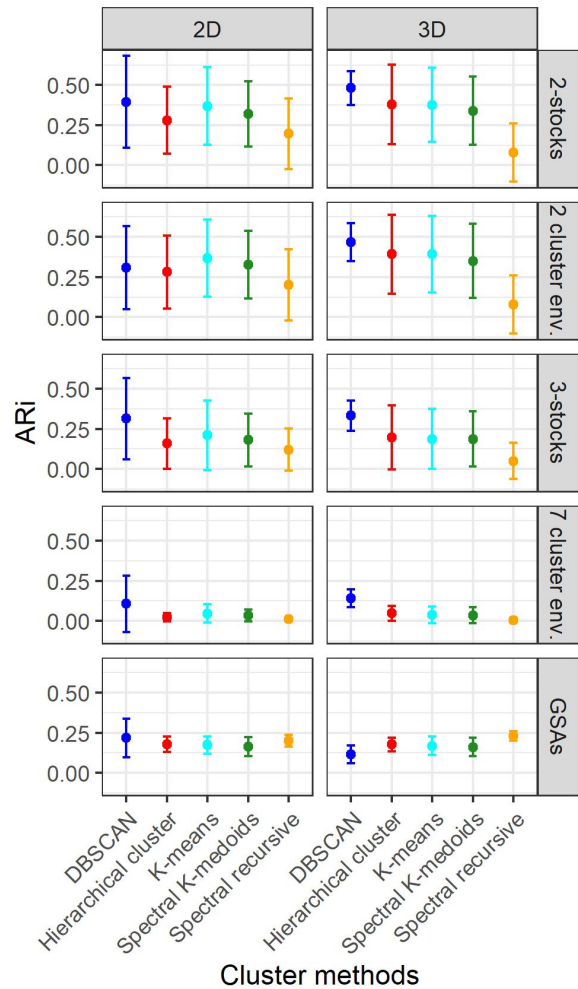


Figure 4: Adjusted Rand index mean and range between prior knowledge and clusters per shape descriptor (2D or 3D) and per clustering method

sults, the ARi values were compared to clusters with only 2 stocks, as they exhibited the highest average ARi values, namely 0.36 ± 0.26 and 0.43 ± 0.17 , respectively, for 2D and 3D. With all the clustering methods used, increasing the parameter k resulted in higher ARi values (*i.e.* with the

highest ARI values, which were observed with the highest k values; figure 5). However, the number of PCs did not

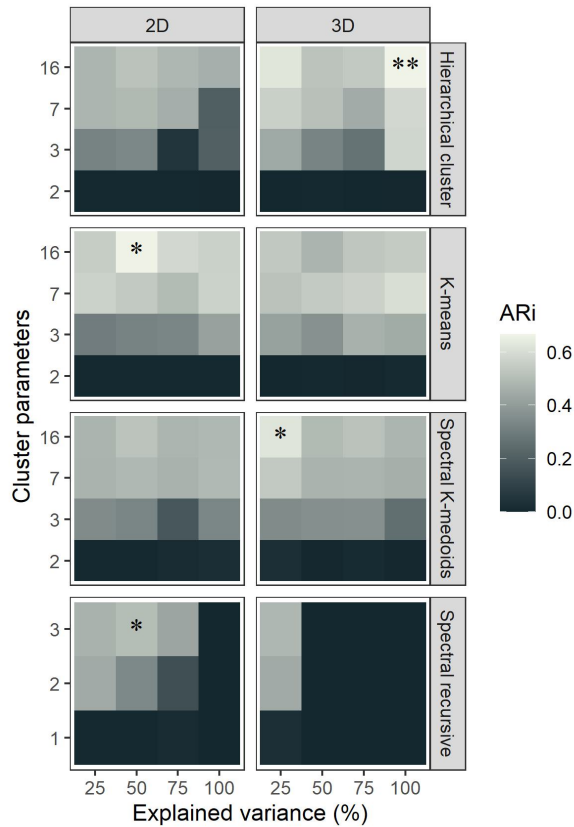


Figure 5: Adjusted Rand index compared by prior 2-stocks division (* represent the highest ARI on the cluster, ** shows the highest ARI among all clustering methods) according to the total explained variance per shape descriptor (2D or 3D) and per clustering method

significantly affect the results, except for the spectral recursive method. The higher the variance with this method, the lower the ARI value (figure 5). To achieve pair matching as close as possible to the prior 2-stocks division ($ARI=0.67$), the use of 3D otolith shape seemed to be optimal, especially with hierarchical clustering (figure 5). As a secondary option ($ARI=0.66$), for better classification of the 2D otolith shape, the K-means method was the most relevant. However, even when using the highest ARI value, the predicted clusters did not align with the prior 2-stocks division (figure 6). There was considerable confusion in the predicted clusters across different longitudinal values (as illustrated in figure 6 and other methods and parameters used).

Supervised classifier. Of all the models, KNN with $k=1$ and all Random Forest (RF) with all ntrees tested performed the best learning rate, achieving an accuracy superior to 99%. In contrast, the other methods exhibited an average accuracy of only 60% (as 3NN). Similarly, among the

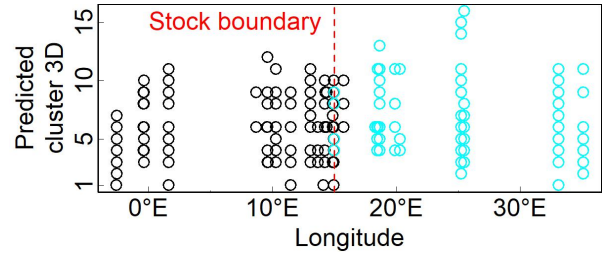


Figure 6: Distribution of individual fish according to the longitude for HC label obtained with $K=16$ -cut. The red line represents the stock boundary. The 2-stocks division are represented by the color (black/cyan).

supervised methods, those employing labels with 2 stocks were the most effective, mirroring the performance seen in the unsupervised methods (figure 7). In the testing set, accuracies of $53\pm 5\%$ and $57\pm 5\%$ were achieved in 2D and 3D, respectively. Notably, the Random Forest (RF) classification method demonstrated distinct characteristics compared to the other methods (figure 7). Furthermore, 3D descriptors showed substantial, positive differences compared to the 2D descriptors (*i.e.* with about 10% gap of successful recognition for RF). This tendency seems to be confirmed for the other methods. When delineating into two stocks, 3D shape analysis consistently demonstrated the highest accuracy irrespective of the classification method employed, except KNN with $k=5$ and $k=10$ (figure 8). For several methods, including Random Forest, LDA and all SVMs, increasing the explained variance of the data used resulted in improved model efficiency. Notably, Random Forest with $ntree=50$ using 3D otolith shape was the most accurate method for delineating stocks into 2 (figure 8). However, even with this improved method, visualizing the stock boundary remains relatively challenging. A significant amount of confusion was still observed when examining the predicted labels (figure 9).

4 Discussions

This study aimed to evaluate the effectiveness of shape analysis dimensions (2D and 3D) and several types of classification for delimiting red mullet stocks in the Mediterranean Sea. With objective (1), the 3D shape analysis of the otoliths yielded results that were relatively similar to those obtained from the 2D analysis during unsupervised classification. However, the 3D analysis consistently exhibited the highest ARI values. Additionally, across all the supervised classification methods tested, the 3D analysis consistently demonstrated superior accuracy compared to the 2D analysis. Therefore, whether employing supervised or unsupervised classifications, 3D analysis of otolith shape emerges as more relevant and efficient than 2D for stock delimitation. Regarding objective (2), in unsupervised classifications, DBSCAN exhibited the highest ARI, but it generated significant noise, undermining the reliability of the

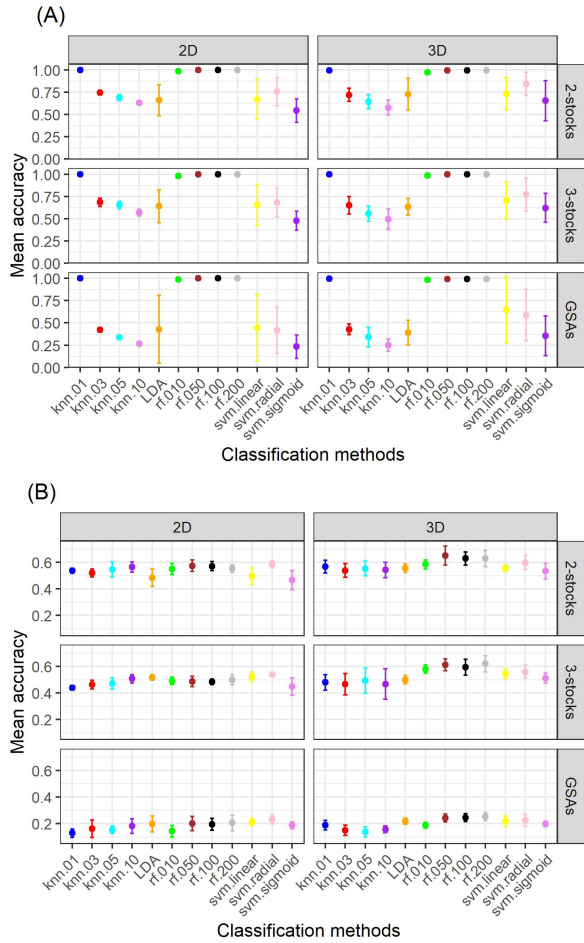


Figure 7: Mean accuracy according to explained variance percent for the training (A) and the testing (B) datasets by shape descriptor (2D or 3D), label comparison, and cluster methods

classification outcomes. This underscores the necessity for robust unsupervised clustering algorithms capable of effectively handling noisy data. Alternatively, hierarchical, K-means, and spectral K-medoids classifications appeared relatively similar, particularly in 3D. Unsupervised classification merely indicated the number of stock divisions present in our samples without revealing their spatial distribution. Despite achieving the highest ARI in tests, locating the spatial division of the 2 stocks was challenging due to considerable confusion among the classifiers. This confusion persisted in supervised classifications; however, they also confirmed the division of stocks into 2. Among the classification methods, Random Forest stood out as the most accurate, particularly when utilising 3D shapes. However, the problem of stock classifications has proved complex, as evidenced by the confusion encountered in identifying the stock boundaries. One hypothesis to consider is that spatial sampling may not have been optimal, which

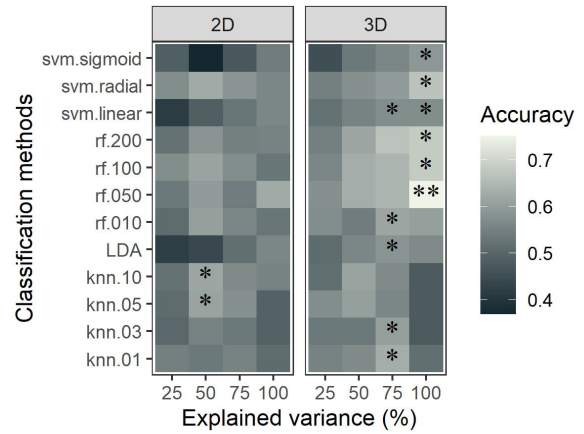


Figure 8: Accuracy of the testing set compared by label with 2 stocks (* represents the highest accuracy on a classification, ** shows the highest accuracy among all methods)

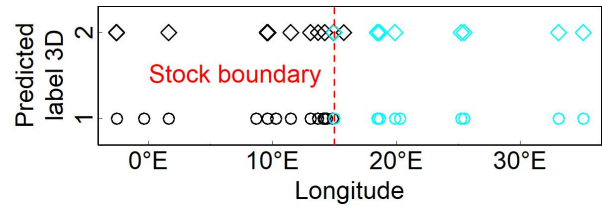


Figure 9: Longitudinal distribution of individual fish according to Random forest with ntree=50; the red line represents the stock boundary. The 2-stocks division are represented by color (black/cyan).

could explain some of the difficulties encountered in stock delineation. It is interesting to note that in supervised classifications, KNN with $k=1$ showed a higher learning rate than with other k (i.e. 3,5,10), suggesting that the model was more sensitive to noise and less robust against atypical samples. Samples closer together may be more effective for classification.

To improve this study, several perspectives could be explored. It is possible that the number of samples used in the study was not sufficient to obtain precise and representative results of the fish population studied. In fact, Random Forest showed overfitting when ntree covered more than 33% of the number of samples. A larger sample size might have led to better coverage of otolith shape variability, resulting in more reliable and generalisable results. Additionally, the distribution of samples by GSAs may have a significant influence on the study's outcomes. Uneven sample distribution among different GSAs could introduce bias into the analysis, as environmental conditions and fish population characteristics may vary from one GSAs to another. Therefore, a balanced distribution of samples by GSAs would be advisable to obtain representative and generalisable results.

Although PCA is commonly used to reduce the dimensionality of data and explore its structure. PCA may struggle to capture nonlinear and complex relationships between variables, leading to significant information loss. In contrast, newer methods like UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) are designed to capture nonlinear structures and may therefore be a more suitable alternative for exploring otolith shape data [32].

The use of Fourier harmonics for otolith shape analysis has been a commonly employed approach in scientific literature due to its ability to decompose shapes into a series of sinusoidal components. This method has yielded significant results in characterizing otoliths and has contributed to our understanding of their shape and structure. However, it is important to recognize that Fourier analysis may have limitations in capturing all subtle variations in otolith shape [22]. Indeed, it is more suited for representing regular or periodic shapes. For non-periodic or complex shapes, other shape analysis methods may be necessary. Therefore, to further explore the diversity of otolith shapes and improve classification accuracy, it would be beneficial to consider combining Fourier harmonics with other complementary shape descriptors. For example, wavelets or landmark-based descriptors could offer alternative approaches for characterizing complex shapes. Many fishes must migrate for feeding and reproduction. These migrations can result in potential stock overlap [20, 21]. This characteristic makes delineating red mullet stocks particularly challenging, as individuals can move over long distances and interact with different populations. There is a need to develop robust stock delineation methods tailored to this case. This could involve using spatially explicit models and advanced data analysis techniques to account for the dynamics of movement and interactions among red mullet populations. By integrating these considerations into the analysis of red mullet otoliths, it would be possible to enhance the accuracy and reliability of stock delineation methods for this species. However, testing other fish species with different life characteristics (habitats, morphology, diet) could be interesting to test their effect on stock delimitation or on otolith shape.

A promising approach to improve stock delineation would be to conduct multi-tracer analysis, combining data on otolith shape, otolith microchemistry, and fish genetics. Another study has already tested the combination of 2D otolith shape with microchemistry, which showed more effective results compared to shape analysis alone [20]. This integrated approach would gather complementary information on stock structure and provide a more holistic view of fish population variability. Otolith shape data would offer insights into the morphology of otolith structures, allowing for the identification of distinctive features among fish populations. Otolith microchemistry data would provide information about the environment in which the fish lived. This information could be used to reconstruct fish movements and life history. Otolith genetic data would enable

the identification of genetic differences among fish populations, providing information on their genetic diversity and genetic structure. This approach would delineate stocks based on their genetic composition and identify populations with high levels of relatedness or genetic differentiation. By combining these different data sources, multi-tracer analysis could compensate for the individual limitations of each method and provide a more comprehensive and accurate picture of stock structure. This integrated approach could assist fishery managers in making more informed decisions regarding conservation and fish stock management, taking into account their genetic diversity, life history, and environment. However, chemical and genetic approaches are time-consuming and expensive. 2D and 3D approaches are easier for data collection and much less costly, but require tools adapted to the small amount of data and their unbalanced distribution.

Acknowledgements. This work has benefited from the grant “ANR-21-EXES-00 11” as part of the IFSEA graduate school (which originates from National Research Agency under the Investments for the Future program), the French Federative Research Structure (SFR Campus de la mer, project No. 2022.7). The otoliths come from the Specific Contract No. 03_EASME/EMFF/2017/1.3.2.3/01/SI2.793201 (MED_UNITS) financed by the European Union. Vinko Bandelj, Fabrizio Gianni and Anna Teruzzi provided the environmental data in the framework of MED-Units Task 4.2. The Sclerochronology team of IFREMER acquired all otoliths 2D images. The authors warmly thank the GISMO platform and its staff (Biogéosciences, University Bourgogne Franche-Comté, UMR CNRS 6282, France) and the team of UMR Transfrontalière BioEcoAgro N°1158, which manages and maintains the analytical equipment used in this study.

References

- [1] N. Andrialovanirina et al. “Asymmetry of Sagittal Otolith Shape Based on Inner Ear Side Tested on Mediterranean Red Mullet (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758): Comparative Analysis of 2D and 3D Otolith Shape Data”. In: *Symmetry* 15.5 (May 2023). P. 1067. ISSN: 2073-8994.
- [2] G. A. Begg and J. R. Waldman. “An holistic approach to fish stock identification”. In: *Fisheries Research* 43.1 (Oct. 1, 1999), pp. 35–44. ISSN: 0165-7836.
- [3] I. M. Benson et al. “The future of fish age estimation: deep machine learning coupled with Fourier transform near-infrared spectroscopy of otoliths”. In: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 80.9 (Sept. 2023). Pp. 1482–1494. ISSN: 0706-652X.

- [4] C. Brechbühler, G. Gerig, and O. Kübler. “Parametrization of Closed Surfaces for 3-D Shape Description”. In: *Computer Vision and Image Understanding* 61.2 (Mar. 1, 1995), pp. 154–170. ISSN: 1077-3142.
- [5] L. Breiman. “Random Forests”. In: *Machine Learning* 45.1 (Oct. 1, 2001), pp. 5–32. ISSN: 1573-0565.
- [6] S. Cadrin, L. Kerr, and S. Mariani. *Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science: Second Edition*. Elsevier Academic Press, Amsterdam. 2014. 588 pp. ISBN: 978-0-12-397258-3.
- [7] S. E. Campana and J. M. Casselman. “Stock Discrimination Using Otolith Shape Analysis”. In: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50.5 (May 1, 1993), pp. 1062–1083. ISSN: 0706-652X, 1205-7533.
- [8] L. Cañas et al. “Use of the otolith shape analysis in stock identification of anglerfish (*Lophius piscatorius*) in the Northeast Atlantic”. In: *ICES Journal of Marine Science* 69.2 (Mar. 1, 2012), pp. 250–256. ISSN: 1054-3139.
- [9] J. M. Casselman. “Determination of age and growth, In: Weatherley, A.H., Gill, H.S. (Eds.), *The Biology of Fish Growth*”. In: *Determination of age and growth, In: Weatherley, A.H., Gill, H.S. (Eds.), The Biology of Fish Growth*. Academic Press. New York, 1987, pp. 209–242.
- [10] R. Escudier et al. “Mediterranean Sea Physical Reanalysis (CMEMS MED-Currents) (Version 1) [Data set: doi.org/10.25423/CMCC/MEDSEA_MULTIYEAR_PHY_006_004_E3R1]”. In: *Copernicus Monitoring Environment Marine Service (CMEMS)* (2020).
- [11] M. Ester, H-P. Kriegel, and X. Xu. “A Density-Based Algorithm for Discovering Clusters in Large Spatial Databases with Noise”. In: *Institute for Computer Science* (1996), p. 6.
- [12] R. A. Fisher. “The Use of Multiple Measurements in Taxonomic Problems”. In: *Annals of Eugenics* 7.2 (1936). Pp. 179–188. ISSN: 2050-1439.
- [13] ICES. “ICES Stock Identification Methods Working Group (SIMWG)”. In: 5.101 (2023), p. 153.
- [14] F. Kuhl and C. Giardina. “Elliptic Fourier features of a closed contour”. In: *Computer Graphics and Image Processing* 18.3 (Mar. 1, 1982), pp. 236–258. ISSN: 0146-664X.
- [15] W. Li et al. “Otolith Shape Analysis as a Tool to Identify Two Pacific Saury (*Cololabis saira*) Groups from a Mixed Stock in the High-Seas Fishing Ground”. In: *Journal of Ocean University of China* 20.2 (Apr. 1, 2021), pp. 402–408. ISSN: 1993-5021.
- [16] L. A. Libungan and S. Pálsson. “ShapeR: An R Package to Study Otolith Shape Variation among Fish Populations”. In: *PLOS ONE* 10.3 (Mar. 24, 2015). e0121102. ISSN: 1932-6203.
- [17] S. P. Lloyd. “Least squares quantization in PCM”. In: *Technical Report RR-5497, Bell Lab* (Sept. 1957).
- [18] J. J. I. Mapp et al. “Three-dimensional rendering of otolith growth using phase contrast synchrotron tomography”. In: *Journal of Fish Biology* 88.5 (2016). Pp. 2075–2080. ISSN: 1095-8649.
- [19] P. Marti-Puig et al. “New parameterisation method for three-dimensional otolith surface images”. In: *Marine and Freshwater Research* 67.7 (2016), p. 1059. ISSN: 1323-1650.
- [20] B. Morales-Nin et al. “European hake (*Merluccius merluccius*) stock structure in the Mediterranean as assessed by otolith shape and microchemistry”. In: *Fisheries Research* 254 (Oct. 1, 2022), p. 106419. ISSN: 0165-7836.
- [21] F. Morat et al. “Discrimination of red mullet populations (Teleostean, Mullidae) along multi-spatial and ontogenetic scales within the Mediterranean basin on the basis of otolith shape analysis”. In: *Aquatic Living Resources* 25.1 (Jan. 2012), pp. 27–39. ISSN: 0990-7440, 1765-2952.
- [22] J. Neves et al. “Comparing otolith shape descriptors for population structure inferences in a small pelagic fish, the European sardine *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792)”. In: *Journal of Fish Biology* 102.5 (May 2023), pp. 1219–1236. ISSN: 1095-8649.
- [23] A.Y. Ng, M.I. Jordan, and Y. Weiss. “On Spectral Clustering: Analysis and an algorithm.” In: *NIPS*. Ed. by Thomas G. Dietterich, Suzanna Becker, and Zoubin Ghahramani. MIT Press, 2001, pp. 849–856.
- [24] V. Parisi-Baradad et al. “Otolith shape contour analysis using affine transformation invariant wavelet transforms and curvature scale space representation”. In: *Marine and Freshwater Research* 56.5 (2005), p. 795. ISSN: 1323-1650.
- [25] M. J. Quindazzi, A. Summers, and F. Juanes. “Efficiency is doing things right: high-throughput, automated, 3D methods in the modern era of otolith morphometrics”. In: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 79 (2022), p. 7.
- [26] T. Schulz-Mirbach et al. “Auditory chain reaction: Effects of sound pressure and particle motion on auditory structures in fishes”. In: *PLOS ONE* 15.3 (Mar. 27, 2020). e0230578. ISSN: 1932-6203.
- [27] L. Shen, H. Farid, and M. McPeck. “Modeling three-dimensional morphological structures using spherical harmonics”. In: *Evolution* 63.4 (Apr. 2009), pp. 1003–1016. ISSN: 00143820, 15585646.

- [28] L. Shen and F. Makedon. “Spherical mapping for processing of 3D closed surfaces”. In: *Image and Vision Computing* 24.7 (July 1, 2006), pp. 743–761. ISSN: 0262-8856.
- [29] K. Sherman et al. “A global movement toward an ecosystem approach to management of marine resources”. In: *Marine Ecology Progress Series* 300 (2005). Pp. 275–279. ISSN: 0171-8630.
- [30] M. T. Spedicato et al. “Spatial distribution of marine macro-litter on the seafloor in the northern Mediterranean Sea: the MEDITS initiative”. In: *Scientia Marina* 83 (Dec. 1, 2019).
- [31] A. Teruzzi et al. “Mediterranean Sea Biogeochemical Reanalysis (CMEMS MED-Biogeochemistry, MedBFM3 system) (Version 1) [Data set: doi.org/10.25423/CMCC/MEDSEA_MULTIYEAR_BGC_006_008_MEDBFM3]”. In: *Copernicus Monitoring Environment Marine Service (CMEMS)* (2021).
- [32] K. Al-Thelaya et al. “InShaDe: Invariant Shape Descriptors for visual 2D and 3D cellular and nuclear shape analysis and classification”. In: *Computers & Graphics* 98 (Aug. 1, 2021), pp. 105–125. ISSN: 0097-8493.
- [33] V. Tuset et al. “Paradox of otolith shape indices: routine but overestimated use”. In: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 78.6 (June 2021). Pp. 681–692. ISSN: 0706-652X.
- [34] J. Vasconcelos-Filho et al. “Peeling the Otolith of Fish: Optimal Parameterization for Micro-CT Scanning”. In: *Frontiers in Marine Science* 6 (2019). ISSN: 2296-7745.
- [35] M. Vignon. “Disentangling and quantifying sources of otolith shape variation across multiple scales using a new hierarchical partitioning approach”. In: *Marine Ecology Progress Series* 534 (Aug. 27, 2015), pp. 163–177. ISSN: 0171-8630, 1616-1599.
- [36] J. H. Ward Jr. “Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function”. In: *Journal of the American Statistical Association* 58.301 (Mar. 1, 1963). Pp. 236–244. ISSN: 0162-1459.
- [37] C. Wei and R. McCauley. “Numerical modeling of the impacts of acoustic stimulus on fish otoliths from two directions”. In: *The Journal of the Acoustical Society of America* 152.6 (Dec. 2022). Pp. 3226–3234. ISSN: 0001-4966.
- [38] C. Zhang et al. “Population structure of Japanese Spanish mackerel *Scomberomorus niphonius* in the Bohai Sea, the Yellow Sea and the East China Sea: evidence from random forests based on otolith features”. In: *Fisheries Science* 82.2 (Mar. 1, 2016), pp. 251–256. ISSN: 1444-2906.
- [39] L. Zhuang, Z. Ye, and C. Zhang. “Application of otolith shape analysis to species separation in *Sebastes* spp. from the Bohai Sea and the Yellow Sea, northwest Pacific”. In: *Environmental Biology of Fishes* 98.2 (Feb. 1, 2015), pp. 547–558. ISSN: 1573-5133.
- [40] A. Zitek et al. “Affordable 3D scanning of small otoliths for improved shape analysis by photogrammetry techniques”. In: 5th International Otolith Symposium 2014 (IOS2014). Mallorca, Spain, Oct. 22, 2014.

3.4 Synthèse du chapitre 3

Le chapitre 3 présente une analyse détaillée des stocks de poissons en se concentrant sur l'étude de la forme des otolithes à partir d'approches en 2D et 3D et en tenant compte de l'influence de l'environnement et des méthodologies appliquées (figure 3.2). La taille d'un stock de poissons peut varier considérablement en fonction des caractéristiques spécifiques de l'espèce, de ses besoins écologiques, de son environnement, et de son comportement social.

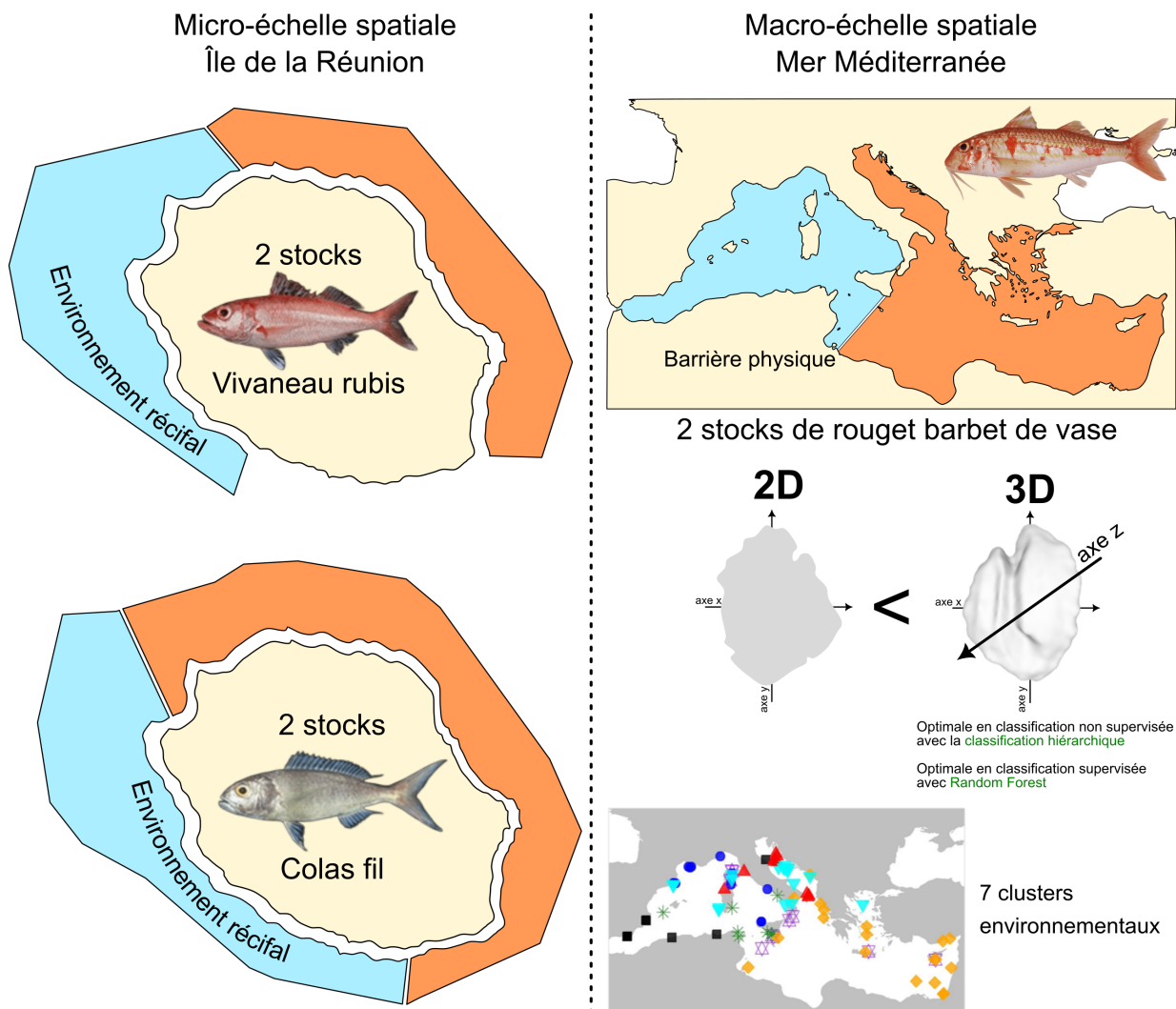


FIGURE 3.2 – Analyse multi-échelle géographique des stocks de poissons à l’Île de la Réunion (micro-échelle) et en Méditerranée (macro-échelle). En micro-échelle spatiale, l’étude met en évidence la séparation des stocks en fonction des environnements récifaux pour deux espèces démersales. En macro-échelle spatiale, la délimitation des stocks du rouget barbet de vase est influencée par la barrière physique près du Sicile en Méditerranée. La comparaison des approches 2D et 3D montre une délimitation optimale en 3D. 7 clusters environnementaux ont été observés et sont relativement regroupés en 2 stocks.

Pour des espèces tropicales, même à petite échelle géographique comme l'île de La Réunion, l'analyse a montré 2 stocks le long d'un axe nord-ouest/sud-est pour le vivaneau rubis (*Etelis carbunculus*) et le colas fil (*Pristipomoides filamentosus*) (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2023c). En fonction de la typologie des habitats de l'île de La Réunion, ces espèces sont réparties en deux types d'habitats distincts : un habitat récifal corallien dans la région nord-ouest et un habitat non récifal dans la région sud-est. Dans la littérature, DEMARTINI, 2016 a constaté des variations de la taille à la maturité sexuelle du vivaneau rubis dans des zones géographiques restreintes, telles que le nord-ouest des îles Hawaï, suggérant que ces variations pourraient être associées à des facteurs tels que la température de l'eau, la profondeur ou d'autres conditions environnementales. SMITH, 1992 a également observé des différences dans la morphologie des otolithes du vivaneau rubis à une échelle très locale, lors d'une étude menée sur quatre sites à Hawaï et dans les îles de la Polynésie française. Par ailleurs, GAITHER *et al.*, 2010 ; GAITHER *et al.*, 2011, ont identifié à partir de marqueurs génétiques (de type microsatellites), des stocks à micro-échelle géographique du colas fil dans les îles hawaïennes. Ces stocks à petite échelle géographique pourraient s'expliquer par la présence d'espèces composées d'individus résidents avec des mouvements locaux restreints, typiques de plusieurs espèces de récifs tropicaux. VIGNON, 2015 a démontré que les influences des facteurs environnementaux locaux sont aussi déterminantes pour la variabilité morphologique des otolithes que les variations environnementales à grande échelle, et ce, indépendamment du niveau d'observation. Dans la littérature, des délimitations à micro-échelle géographique ont également été observées chez d'autres espèces. Par exemple, la forme des otolithes de *Mulloidichthys flavolineatus* présente une variation significative entre La Réunion et l'île Maurice, qui sont pourtant géographiquement proches, suggérant un faible échange entre ces zones (POTHIN *et al.*, 2006). De même, une étude sur le vivaneau (*Lutjanus kasmira*) dans l'archipel de la Société (Polynésie française) a révélé des différences notables dans la forme des otolithes entre des populations géographiquement proches (VIGNON *et al.*, 2008). SHIMOSE *et al.*, 2020 ont également montré que, bien que *Pristipomoides argyrogrammicus* forme une population homogène à une échelle microscopique, il peut présenter des différences morphométriques sous des conditions environnementales très diverses, telles que celles entre la mer de Chine et l'Indo-Pacifique Ouest. Le poisson-clown (*Amphiprioninae*), qui est associé de manière symbiotique aux anémones de mer, se retrouve dans des stocks à très petite échelle géographique. Les populations de poissons-clowns sont souvent limitées à des zones spécifiques où les anémones sont présentes, ce qui crée des unités de stocks très localisées. Dans ce cas, un stock peut être restreint à un récif particulier ou même à une seule anémone, en raison de la territorialité marquée et du lien étroit avec leur habitat (CHAMBEL *et al.*, 2015).

À l'autre extrême, certaines espèces pélagiques très migratoires comme par exemple le thon (*Thunnus spp.*) présentent des stocks de taille (ou emprunte géographique) beaucoup plus vaste, souvent à l'échelle de l'océan. L'étude sur l'espadon (*Xiphias gladius*) dans la partie ouest de l'océan Indien n'a montré d'un seul stock pour cette vaste zone géographique (MAHÉ *et al.*, 2016b). Les trajectoires migratoires de l'espadon comptent parmi les plus complexes observées chez ces espèces pélagiques (PALKO *et al.*, 1981 ; SEDBERRY et LOEFER, 2001), avec des déplacements qui pourraient traverser des fronts hydrographiques (KADAGI, 2011). Ces espèces pélagiques hautement migratoires, parcourent de grandes distances souvent en suivant les courants marins dans les océans pour se nourrir et/ou se reproduire. En raison de ce mode de vie mobile, leurs stocks couvrent de vastes régions géographiques, et leur gestion nécessite une coordination internationale pour assurer une exploitation durable (BLOCK *et al.*, 2011). Les différences de taille des stocks

entre des espèces comme le poisson-clown et le thon ne sont donc pas simplement une question de taille physique des individus, mais plutôt une question d'adaptation à leur mode de vie et à l'étendue de leur habitat naturel. Les modes de vie des espèces influencent non seulement la taille des stocks mais aussi leur résilience aux perturbations environnementales. Les espèces à petite unité géographique, comme le poisson-clown, peuvent être plus vulnérables aux changements environnementaux locaux, tels que la destruction des récifs coralliens ou la pollution marine. En revanche, les espèces à large distribution, comme le thon, peuvent être plus résilientes aux perturbations locales et/ou étendues comme le changement climatique global.

Les comportements sociaux jouent également un rôle crucial dans la taille des stocks, comme c'est le cas pour les mérours (*Epinephelinae*). Ces poissons sont connus pour leurs structures sociales complexes, où un seul mâle peut dominer un groupe composé de plusieurs femelles. Ce comportement de harem est souvent associé à des zones géographiques spécifiques où les mérours se regroupent pour se reproduire. En conséquence, les stocks de mérours peuvent être relativement grands, englobant plusieurs groupes sociaux qui interagissent dans un même espace (SADOVY *et al.*, 2013). La taille du stock est donc influencée non seulement par l'habitat mais aussi par la dynamique sociale des espèces.

Parmi les 9 principales espèces démersales, d'intérêt économique majeur, vivant autour de l'île de La Réunion, 2 espèces montrent une séparation en 2 unités de gestion distinctes appelées stocks halieutiques, suggérant la présence de barrières physiques qui délimitent ces zones. Cette séparation est particulièrement marquée chez les espèces tropicales et récifales, confirmant que les unités de stocks peuvent être très petites spatialement. Ce phénomène est également observé chez le rouget barbet de vase en mer Méditerranée, où une distinction claire entre 2 stocks est faite à partir de l'analyse des otolithes en 2D, cette conclusion étant renforcée par les résultats de l'analyse en 3D. Cette dernière a été plus optimale par rapport à celle de l'analyse en 2D, et la frontière entre les 2 stocks est marquée par la barrière physique du détroit de Sicile.

En ce qui concerne les méthodes de classification utilisées pour identifier les stocks, le chapitre souligne que la classification hiérarchique s'avère optimale parmi les approches non supervisées, tandis que la méthode Random Forest est la plus optimale dans les approches supervisées. Ces résultats montrent que l'approche 3D permet d'améliorer la délimitation des stocks, bien que des difficultés subsistent en raison d'un échantillonnage géographique limité. Cette limitation pourrait être responsable de la confusion observée dans la détection des frontières des stocks, soulignant ainsi la nécessité d'un échantillonnage plus étendu et équilibré géographiquement.

Les groupes d'individus classés par leurs facteurs environnementaux identifiés ne correspondent pas toujours aux unités de gestion des stocks. Malgré les performances accrues de l'analyse 3D, certaines confusions persistent dans la délimitation des stocks (comme le révèlent les figures 6 et 9, ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2023a). Ces confusions sont en partie attribuables à la complexité des frontières spatiales entre stocks et aux possibles chevauchements dus aux migrations des poissons. Par exemple, la figure 6 (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2023a) montre que les prédictions des frontières de stocks ne correspondent pas toujours aux divisions initiales basées sur les zones géographiques (GSAs), ce qui souligne les défis liés à la variabilité environnementale et à la répartition des échantillons. De même, la figure 9 (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2023a) révèle une confusion significative dans les prédictions de classification supervisée, même lorsque des méthodes performantes comme les forêts aléatoires sont utilisées. Cela peut s'expliquer par les mouvements/migrations géographiques des poissons au cours de leur vie et la difficulté de com-

parer des données environnementales fixes avec un poisson en mouvement. Pour répondre à ce lien entre facteurs environnements et forme de l'otolithe, l'approche expérimentale contrôlée doit compléter les études *in situ*.

Une autre problématique importante abordée dans ce chapitre est que la méthode DBSCAN a montré des performances initiales prometteuses avec des indices ARI élevés, mais elle s'est avérée peu fiable pour une classification robuste. L'une des principales limitations de DBSCAN est sa sensibilité aux paramètres, notamment à la distance ϵ et au nombre minimum de points requis pour former un cluster. Dans notre étude, DBSCAN a généré une proportion importante de données classifiées comme du bruit (échantillons non assignés à un cluster), ce qui a réduit son utilité pratique. Par exemple, près de la moitié des données ont été exclues comme bruit, rendant difficile l'interprétation des clusters restants. Cela souligne les limites de cette méthode pour des données complexes comme celles des otolithes, où les clusters peuvent ne pas être bien séparés ou avoir des formes irrégulières.

D'autres limitations subsistent pour l'analyse 3D. Tout d'abord, le temps et les coûts liés à l'acquisition et au traitement des données tridimensionnelles sont supérieurs à ceux de l'analyse 2D. En comparaison, l'approche 2D reste utile pour des études préliminaires grâce à sa rapidité et à son coût réduit, bien qu'elle soit insuffisante pour capturer toute la richesse morphologique. Une optimisation des processus et une automatisation accrue pourraient rendre ces techniques plus accessibles. De plus, les erreurs liées à la reconstruction des maillages pour des otolithes dégradés ou incomplets doivent être minimisées afin d'améliorer la précision des modèles. L'ajout de nouvelles zones géographiques à l'étude, pourrait renforcer la robustesse des conclusions. En complément, le couplage de l'analyse 3D avec des approches telles que la microchimie des otolithes, les isotopes stables ou encore les marqueurs génétiques offrirait une perspective multidimensionnelle et plus exhaustive de la structuration des stocks.

L'analyse en 3D s'avère ainsi plus efficace que l'analyse en 2D, notamment dans le cadre des classifications supervisées, offrant des résultats plus fiables et adaptés à la complexité des données. Cependant, pour améliorer encore la précision des délimitations des stocks, ce chapitre recommande d'élargir la collecte de données sur une échelle géographique plus large et de combiner différentes approches, telles que la génétique et la chimie des otolithes, afin d'obtenir une vision plus complète et précise des unités de stocks. Cette approche intégrée permettrait de surmonter les limites des méthodes individuelles et d'offrir une meilleure compréhension des dynamiques des populations de poissons.

Chapitre 4 Variations de la forme des otolithes entre espèces selon leur stade de développement, leur phylogénie et leur écomorphologie

4.1 Introduction du chapitre 4

Le chapitre 4 s'inscrit dans la continuité des chapitres précédents, qui ont exploré l'utilisation de la forme des otolithes pour identifier des unités de stocks à différentes échelles spatiales et au sein de diverses espèces. Après avoir montré, au chapitre 3, que l'analyse 3D des otolithes était plus précise et robuste que la méthode 2D dans l'identification des stocks, cette approche est maintenant étendue à l'échelle interspécifique pour reconnaître les individus de chaque espèce au sein d'un groupe d'espèces. Ce passage de l'analyse intraspécifique à l'analyse interspécifique permet de répondre à des questions fondamentales sur les liens entre la forme des otolithes et les caractéristiques écologiques, biologiques et phylogénétiques des poissons.

Au chapitre précédent, nous avons vu comment la méthodologie des formes d'otolithes en 2D et en 3D permettait déjà de détecter des différenciations dans les populations au sein d'une espèce, confirmant l'importance de la forme des otolithes comme indicateur de la structure des stocks. Le chapitre 3 a approfondi ces résultats en mettant en évidence la pertinence de l'approche 3D pour une analyse fine et précise de ces stocks. À travers cette progression, il est devenu évident que les otolithes, en raison de leur capacité à refléter l'histoire individuelle et environnementale des poissons, pouvaient offrir des perspectives nouvelles sur les relations entre les espèces, leur environnement et leurs dynamiques de population.

Les otolithes jouent un rôle clé dans l'identification des espèces dans les études de chaînes alimentaires aquatiques. Leur forme unique et spécifique à chaque espèce constitue un outil précieux pour les chercheurs, notamment lorsqu'ils sont retrouvés intacts dans les contenus digestifs des prédateurs. La morphologie des otolithes est suffisamment distincte pour permettre une classification taxonomique précise, même après leur ingestion (CAMPANA, 2004). Les otolithes résistent à la digestion enzymatique, ce qui préserve leurs caractéristiques morphologiques (HARVEY *et al.*, 2000). En s'appuyant sur des bases de données de référence des formes d'otolithes, les scientifiques peuvent reconstituer les réseaux trophiques et mieux comprendre les interactions écologiques dans les écosystèmes aquatiques (TUSET *et al.*, 2008). Ainsi, l'analyse des otolithes représente une méthode fiable et largement utilisée pour élucider les relations prédateur-proie dans les environnements marins et dulcicoles.

Dans ces contextes, le chapitre 4 élargit l'analyse à des questions plus complexes, en cherchant à comprendre si les otolithes peuvent non seulement distinguer les différentes espèces, mais aussi si leur forme reflète des traits écomorphologiques et phylogénétiques plus profonds. En prenant en compte l'effet de l'ontogénie sur la forme des otolithes, ce chapitre se distingue par son approche interspécifique, en tentant d'identifier des patterns communs mais aussi des spécificités propres à chaque espèce. Il représente ainsi une avancée dans l'utilisation des otolithes comme outils de gestion des ressources marines et pour une meilleure compréhension des écosystèmes. Le but de

ce chapitre est d'estimer la précision de la forme 3D de l'otolithe comme outil d'identification de chaque espèce mais aussi de comprendre quels sont les traits ou caractéristiques des espèces permettant ces distinctions (figure 4.1). En conséquence, la finalité de ce chapitre est d'estimer si à partir de la forme 3D de l'otolithe, il est possible et jusqu'à quel niveau d'identifier l'espèce et ses caractéristiques ou traits d'histoires de vie (figure 4.1). Cette approche permet de lier les résultats des chapitres précédents à des problématiques écologiques et évolutives plus larges, et ouvre la voie à des applications pratiques pour la conservation et la gestion des stocks de poissons. Les résultats de ce chapitre 4 sont extraits de l'ouvrage publié en 2024 aux éditions Quae (MAHÉ *et al.*, 2024) : Kélig Mahé, Nicolas Andrialovanirina, Aurélie Matéos, Sébastien Couette, Laffont Rémi, Kirsteen Mackenzie et Émilie Poisson Caillault. Identification des poissons par leurs otolithes en imagerie 3D. fr. Sous la dir. d'Éditions QUAE. EAN13 9782759238651. Juin 2024.

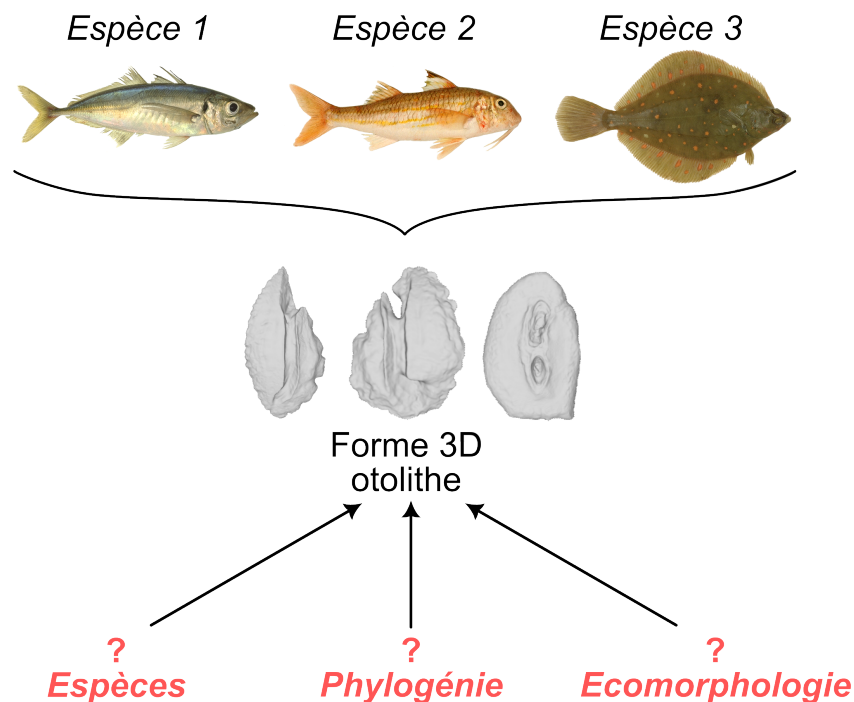


FIGURE 4.1 – Exploration de la capacité de la forme 3D des otolithes à discriminer des espèces différentes, à refléter des relations phylogénétiques et à indiquer des caractéristiques écomorphologiques spécifiques.

4.2 Identification d'espèces et de leur écomorphologie en Manche Mer Du Nord en utilisant la forme de leurs otolithes en 3D

4.2.1 Contexte et problématiques

La forme externe des otolithes permet d'identifier les différentes espèces de poissons auxquelles ils appartiennent. Ainsi, ces analyses sont utilisées lors d'études archéologiques (DISSPAIN *et al.*, 2016; AGIADI, 2022) ou ciblées sur les relations proies-prédateurs au sein d'un réseau trophique

(LOWRY, 2011 ; STOCK *et al.*, 2021 ; QUIGLEY *et al.*, 2023). Entre les espèces (c'est-à-dire au niveau interspécifique), il a été démontré qu'il n'existait pas de lien entre la taille des individus et la taille de leurs otolithes (CAMPANA, 2005). C'est ainsi que des poissons pélagiques comme le thon ou l'espadon peuvent présenter des otolithes de petite taille ; et à l'inverse, certaines petites espèces récifales peuvent avoir des otolithes de grande taille (CAMPANA, 2005). De même, les poissons présentant des qualités de nage rapide tendent à avoir des otolithes plus allongés que ceux d'espèces benthodémersales (VOLPEDO *et al.*, 2008 ; TUSET *et al.*, 2014)).

La forme externe du poisson évolue du stade d'œuf à celui d'adulte. Sa morphologie change donc au cours de sa vie. Ce processus de développement s'appelle l'ontogénie. Si les facteurs génétiques et environnementaux sont des sources d'explications de la forme de l'otolithe, ce principe d'ontogénie joue lui aussi un rôle. Ainsi, pour un même individu, la forme de l'otolithe évolue au cours de sa vie. Il faut donc tenir compte du stade de vie. Dans ce chapitre, plusieurs individus, sélectionnés le long du gradient de taille observé dans le milieu naturel, par espèce, couvrant tous les stades de vie (juvéniles, jeunes adultes, adultes déjà reproduits, etc.) sont présentés et analysés. Les questions que nous cherchons à répondre sont les suivantes :

- Les espèces de poissons sont-elles identifiables à partir de la forme 3D de leur otolithe ?
- Quelle est l'influence de l'effet ontogénique sur la forme 3D des otolithes au niveau interspécifique ?
- La forme 3D des otolithes s'explique-t-elle par la phylogénie ?
- La forme 3D des otolithes peut-elle identifier les traits écomorphologiques spécifiques des espèces ?
- Peut-on estimer un trait de vie spécifique à l'espèce à partir de la forme 3D de son otolithe ?

4.2.2 Méthodologie

Zone d'étude et échantillons

La Manche et la mer du Nord soutiennent une activité de pêche commerciale très importante, tant en quantité de poissons qu'en nombre d'espèces exploitées. Ainsi, parmi les 120 espèces identifiées en Manche-mer du Nord, une vingtaine d'entre elles représentent la quasi-totalité des espèces commerciales exploitées.

Puisque l'exploitation commerciale ne concerne très majoritairement qu'une vingtaine d'espèces parmi les 120 identifiées en Manche-mer du Nord, les 22 espèces de poissons (présentées dans les figures 15 et 16 de l'introduction de la thèse, tableau 4.1) les plus exploitées commercialement ont été retenues en prenant de trois à cinq individus par espèce afin de pouvoir comparer les otolithes au sein d'une espèce ou entre les espèces. Le choix du nombre d'individus permet à l'ensemble de la gamme de tailles de chaque espèce d'être représentée de manière précise. Pour les stades adultes, il s'agit d'individus de différentes tailles, sans se limiter aux mâles ou aux femelles. Parmi ces espèces, il y a deux morphotypes différents que sont les poissons plats (Pleuronectiformes), fortement en interaction avec le fond, et les poissons ronds ayant une interaction moins forte avec le fond. De plus, ces espèces vivent différemment dans la colonne d'eau : certaines sont pélagiques et d'autres benthiques. Tous les prélèvements d'individus ont été réalisés par l'institut Ifremer, en particulier l'équipe de l'unité halieutique Manche-mer du Nord, à travers des campagnes scientifiques réalisées sur le navire océanographique Thalassa. Ces échantillons ont été prélevés en Manche et mer du Nord dans le cadre du suivi international des populations de

poissons permettant d'évaluer l'état de santé des populations commerciales de poissons. Les deux campagnes scientifiques menées par l'Ifremer chaque année pour la France couvrant la Manche et la mer du Nord ont été utilisées : International Bottom Trawl Survey (IBTS, en janvier et février) et Channel Ground Fish Survey (CGFS, en septembre et octobre).

TABLE 4.1 – Étendue des longueurs et le nombre total des échantillons par espèces.

Espèces	Nombre	LT minimale (cm)	LT maximale (cm)
<i>Engraulis encrasicolus</i>	5	7.0	15.1
<i>Dicentrarchus labrax</i>	5	35.9	65.7
<i>Scophthalmus rhombus</i>	5	21.0	59.0
<i>Trachurus trachurus</i>	5	6.1	39.4
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	5	14.2	73.2
<i>Platichthys flesus</i>	5	21.0	40.0
<i>Chelidonichthys lucerna</i>	5	10.8	29.7
<i>Chelidonichthys cuculus</i>	5	10.2	44.6
<i>Clupea harengus</i>	5	15.0	31.8
<i>Limanda limanda</i>	5	9.0	28.0
<i>Microstomus kitt</i>	5	15.4	40.7
<i>Scomber scombrus</i>	3	16.3	38.1
<i>Merlangius merlangus</i>	3	10.0	32.7
<i>Gadus morhua</i>	5	15.6	90.0
<i>Pleuronectes platessa</i>	5	10.0	43.5
<i>Mullus surmuletus</i>	4	13.7	33.3
<i>Zeus faber</i>	4	10.0	47.0
<i>Sardina pilchardus</i>	5	14.5	23.0
<i>Solea solea</i>	5	11.0	51.0
<i>Sprattus sprattus</i>	5	5.1	14.0
<i>Trisopterus luscus</i>	5	10.0	32.0
<i>Scophthalmus maximus</i>	5	15.0	65.0

Acquisition, reconstruction et standardisation des formes 3D

La méthode d'acquisition et de reconstruction est similaire à celle présenté dans le chapitre 1 (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2024a) mais avec le microtomographe Bruker - Skyscan 1275. Celui-ci possède un tube scellé avec un diamètre de foyer de 5 μm pouvant délivrer une tension allant de 20 à 100 kV. Il permet une acquisition rapide pour des échantillons ayant un diamètre pouvant atteindre 96 mm, et d'une hauteur maximale de 120 mm.

La méthode de standardisation est également celle utilisé dans le chapitre 1 (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2024c). La méthode SPHARM a été appliquée en utilisant 11 harmoniques et en simplifiant (par décimation) chaque maillage individuel à 1 000 vertex.

Calcul des composantes principales de la forme 3D des otolithes

Pour synthétiser et visualiser les principaux motifs de variation de forme des otolithes entre les espèces, les coefficients issus de l'analyse SPHARM (harmonique sphérique ou spherical harmonic) pour chaque individu ont été traités par une analyse en composantes principales (ACP). Cette analyse statistique multivariée permet de construire de nouvelles variables (appelées composantes principales ou PCs), non corrélées entre elles, construites à partir des variables initiales (ici, les coefficients SPHARM), et résumant chacune un aspect donné de la variance initiale contenue dans les données. Ces composantes sont ordonnées selon la quantité de variance qu'elles expliquent (la première PC résumant plus de variance que la seconde, elle-même plus que la troisième, et ainsi de suite). À partir d'une série de variables initiales partiellement corrélées entre elles (ce qui est souvent le cas en morphométrie), il est attendu que la variance initiale contenue dans une grande quantité de variables puisse être résumée efficacement par seulement quelques PCs. Il est ainsi possible de visualiser, au moyen de graphiques bivariés de PCs, la dispersion des individus selon ces PCs, et de visualiser les différences ou ressemblances morphologiques entre ces individus. Chaque composante résumant un aspect de variation morphologique, nous pouvons également visualiser cet aspect de variation au moyen de maillages 3D théoriques (ne reflétant pas directement un individu réel) calculés aux extrémités de chacune des PCs, ce qui permet d'interpréter les variations de formes expliquées par chaque PC, et partant, les différences ou ressemblances morphologiques entre les individus.

Analyse ontogénétique et phylogénétique de la forme 3D des otolithes

Une distance Euclidienne entre chaque individu (c'est-à-dire chaque otolithe) a été calculée à partir des composantes principales. Un dendrogramme a ensuite été construit à partir des résultats de la classification hiérarchique agglomérative (R hclust, lien complet) basée sur cette matrice de distance Euclidienne. Ce premier dendrogramme a pour but d'étudier si la forme 3D des otolithes permet de discriminer les espèces quel que soit leur stade de vie : effet ontogénétique.

Des dendrogrammes ont été ensuite créés pour 2 niveaux taxonomiques en sélectionnant les individus de stade de vie le plus élevée pour chaque espèce pour évaluer l'effet phylogénétique. L'ordre correspond au 5ème niveau taxonomique et la famille au 6ème respectivement dans la classification scientifique du monde vivant. Ces 2 arbres ont été comparée avec l'arbre phylogénétique des espèces de poissons (RABOSKY *et al.*, 2018).

Classification des traits dont l'espèce à partir de la forme

Dans un premier temps, un classifieur de type forêt aléatoire (R Random Forest, RF) a été entraîné pour estimer le degré d'importance de chaque trait dans l'identification des espèces de poissons via les valeurs de SHAP (Shapley Additive exPlanations). Les traits ont été prises de l'étude de BEUKHOF *et al.*, 2019 utilisant les bases de données de FishBase (FROESE et PAULY, 2019) ainsi que des suppléments de la littérature primaire. Les traits phylogénétiques (espèce, genre, famille et ordre) ont été retirés en entrée du classifieur car ils représentent les différents niveaux taxonomiques des espèces.

Dans un second temps, un classifieur par trait a été appris à partir des PCs. 2 techniques de classifications supervisées ont été testées : un 1 plus proche voisin (KNN) ; des forêts aléatoires avec un nombre d'arbres variant de 10, 20, 50 et 100. La base d'apprentissage a été construite à partir

de 1 à 2 individus par espèce; la base de généralisation a englobé tous les individus non appris. Les expériences ont été répétées 10 fois afin d'avoir des bases d'apprentissage et de généralisation différentes. De la même façon, le nombre de PCs sélectionnées a été fixé à 10, 50 et la totalité (103) correspondant à une variance expliquée de 78,5%, 97,2% et 100% respectivement.

Le taux de bonne reconnaissance a été calculé pour chaque expérience. Seront présentés par la suite, le taux moyen sur la base d'apprentissage et celui sur la base de généralisation avec leur écart-type ainsi que le taux de reconnaissance maximal en généralisation.

4.2.3 Résultats et discussion

Les espèces de poissons sont-elles identifiables à partir de la forme 3D de leur otolithe ?

Les principaux critères morphologiques d'un otolithe sont nombreux et comprennent la nature et la complexité de son contour, sa forme générale (ronde, ovale, rectangulaire, etc.), la convexité de la face interne proximale, la concavité de la face externe distale et enfin l'épaisseur mesurable en vues ventrale et dorsale. Pour comparer ces mesures de concavité, de convexité et d'épaisseur, la vue ventrale est utilisée, car elle présente un bord moins découpé et moins variable que la vue dorsale, où se trouvent généralement les parties lobées de l'otolithe. Ainsi, la vue dorsale est l'un des derniers critères utilisés pour reconnaître l'espèce, tandis que la face interne en vue proximale est souvent la première observation de l'otolithe employée pour la déterminer, car elle permet de bien observer le bord, mais aussi la partie appelée *sulcus acusticus* où la membrane se fixe sur l'otolithe. Cette zone est extrêmement informative, et discriminante pour identifier l'espèce à qui appartient l'otolithe analysé. Ce *sulcus acusticus* est plus ou moins au centre de la face interne et orienté selon un axe antéro-postérieur commençant près du bord postérieur par une zone appelée *cauda*, puis continuant par une deuxième zone appelée *ostium* et terminant enfin par le bord antérieur appelé *excisura*. Cet *excisura* est extrêmement important, car il relie le rostre à l'antirostre, et cette zone est particulièrement différenciable entre des espèces souvent très proches en ce qui concerne la taxonomie. Si la face interne proximale montre beaucoup d'informations morphologiques, la face externe distale peut quant à elle compléter de façon significative les critères morphologiques avec la présence de lobes plus ou moins nombreux. Parmi les 22 principales espèces de poissons de Manche-mer du Nord (figure 19), le saint-pierre est l'espèce la plus facile à identifier, car c'est la seule qui présente une forme atypique en « étoile », due à l'existence d'une crête postero-dorsale. Cette forme générale est le premier critère à observer, car les otolithes montrent des formes en vues proximale et distale pouvant aller du rond, au carré, en passant par le rectangle ou la forme allongée (dite oblongue), qui se traduit finalement par un rapport entre la longueur et la largeur de l'otolithe.

Le second critère d'identification de l'espèce est la présence du rostre et de l'antirostre, séparés par un *excisura* (partie antérieure au niveau du *sulcus*) marqué, et donc montrant un renforcement au niveau de la forme. C'est le cas chez certains poissons ronds en particulier, comme le maquereau, l'anchois, le hareng, le sprat, la sardine, les grondins rouge et perlon et le rouget barbet de roche. À l'inverse, pour les poissons plats, quasiment aucun ne présente cette particularité anatomique. Les caractéristiques du *sulcus* sont elles aussi extrêmement intéressantes pour identifier les espèces. Il convient d'observer le ratio entre sa taille et celle de l'axe antéro-postérieur (chez le maquereau, le chinchard et la morue par exemple), ou 2/3 de l'axe antéro-postérieur (chez la sardine, l'églefin, le turbot et la barbue par exemple) ou 1/3 de l'axe antéro-postérieur (chez la limande et le sprat par exemple). En plus de sa taille, le *sulcus*, composé du *cauda* et de l'*ostium* montre soit une

continuité entre ces deux zones formant un sillon unique (chez le maquereau, le grondin et la sole), soit deux sillons bien séparés sur l'axe antéro-postérieur (chez la limande commune, la limande-sole et la plie). Enfin, le *sulcus* peut être un indicateur de l'espèce en fonction de sa largeur et de sa profondeur des sillons. Un autre critère observable sur la face interne proximale est la forme externe plus ou moins complexe présentant éventuellement des lobes. Ces formes du contour sont soit absentes (chez la sole, la limande et la plie), soit lobées (chez le cabillaud, le merlan et le turbot par exemple), soit dentelées (chez l'anchois, le flet, le sprat, les grondins rouge et perlon par exemple). Sur la face distale externe, il peut aussi y avoir des bourrelés ou boursoufflements lobés présents sur la face et non sur son contour (chez le tacaud et la morue par exemple). Si les faces interne proximale et externe distale sont utilisées prioritairement pour distinguer les premiers critères d'identification de l'espèce, il est nécessaire d'employer ensuite les vues ventrale et dorsale pour observer la concavité très marquée (chez le bar, les grondins rouge et perlon et le rouget barbet par exemple), soit, à l'inverse, quasiment absente (chez la limande, la plie, le hareng et le sprat par exemple). Le second critère à observer sur ces faces est l'épaisseur de l'otolithe traduisant sa hauteur, qui est soit importante (chez le tacaud, le sprat et le saint-pierre par exemple), soit mince (chez le merlan et le maquereau par exemple).

Une analyse en composantes principales utilisant les coefficients de Fourier 3D individuels issus de l'analyse SPHARM a été réalisée pour visualiser les différences et similarités de forme entre les espèces. Les figures 4.2 et 4.3 reportent la projection des individus sur les quatre premières composantes principales de l'ACP, qui résument plus de 60% des variations de forme contenues dans les coefficients. Ces analyses graphiques permettent de comprendre les différences entre espèces, mais aussi de voir quelles sont les espèces les plus proches de celle identifiée comme étant la plus probable, et d'affiner au besoin notre jugement.

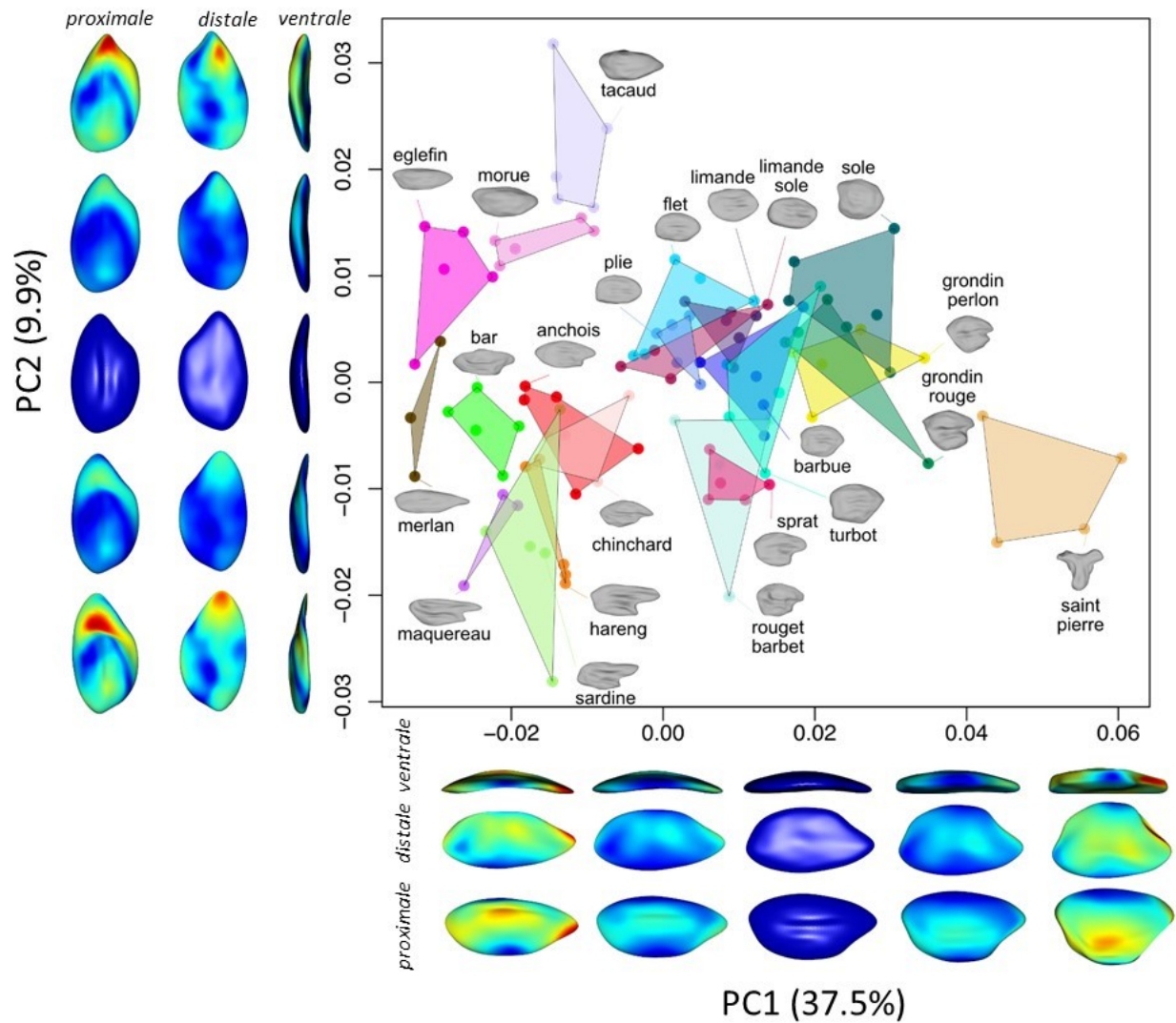


FIGURE 4.2 – Représentation graphique des composantes principales PC1 et PC2 des différences entre la forme 3D des otolithes des 22 principales espèces de Manche-mer du Nord. Chaque individu analysé est représenté par un point coloré, et tous les individus d’une espèce sont délimités par une enveloppe convexe (polygone). La forme théorique pour chaque espèce a été reconstruite pour aider visuellement à comprendre les critères morphologiques rapprochant certaines espèces entre elles. Pour appréhender les différences expliquant chaque axe graphique appelé PC, trois vues (proximale, distale et ventrale) sont exposées avec un code couleur allant du bleu foncé (pas de différence) au rouge (différence la plus importante).

Le premier axe graphique PC1 est expliqué essentiellement par la zone centrale représentant le *sulcus* (figure 4.2). L'axe PC2 quant à lui montre bien que la zone du rostre et antirostre, avec l'excisura au milieu, est un critère très important de discrimination des espèces. Enfin, les axes graphiques PC3 et PC4 indiquent des différences sur toutes les vues, et en particulier dans les vues et pas uniquement sur le contour extérieur de la vue proximale utilisé classiquement en analyse 2D (figure 4.3).

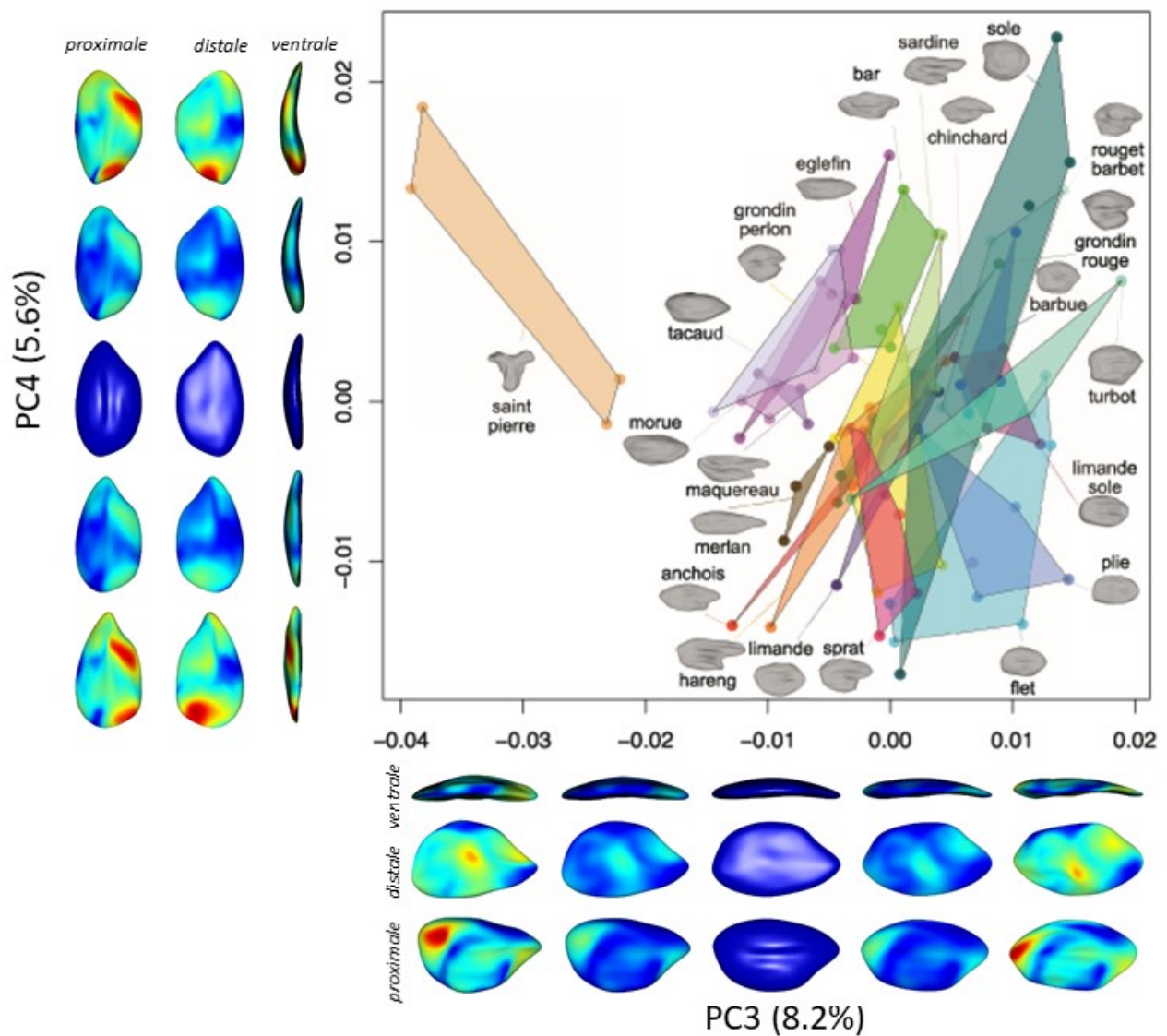


FIGURE 4.3 – Représentation graphique des composantes principales PC3 et PC4 des différences entre la forme 3D des otolithes des 22 principales espèces de Manche-mer du Nord. Chaque individu analysé est représenté par un point coloré, et tous les individus d’une espèce sont délimités par une enveloppe convexe (polygone). La forme théorique pour chaque espèce a été reconstruite pour aider visuellement à comprendre les critères morphologiques rapprochant certaines espèces entre elles. Pour appréhender les différences expliquant chaque axe graphique appelé PC, trois vues (proximale, distale et ventrale) sont exposées avec un code couleur allant du bleu foncé (pas de différence) au rouge (différence la plus importante).

Quelle est l'influence de l'effet ontogénique sur la forme 3D des otolithes au niveau interspécifique ?

L'effet ontogénique se traduit par l'évolution morphologique de l'otolithe au cours de la vie du poisson selon des processus physiologiques en dehors des effets génétiques et environnementaux. Le dendrogramme des 22 espèces étudiées de Manche-mer du Nord (figure 4.4) montre que tous les individus de chaque espèce ne sont pas tous regroupés ce qui montre bien qu'au sein d'une espèce, il y a un effet ontogénique plus ou moins marqué selon les espèces traitées.

Parmi les 22 espèces, 5 espèces sont bien séparées des autres montrant un effet ontogénique négligeable (Figure 4.4 : *Merlangius merlangius*, *Trisopterus luscus*, *Zeus faber*, *Scomber scombrus*, *Sprattus sprattus*). Il est à noter que pour les 2 espèces de grondins (*Chelidonichthys lucerna* et *Chelidonichthys cuculus*), elles sont séparées des autres espèces mais mélangées entre elles. Pour toutes les autres espèces soit 15 espèces (figure 4.4), les individus sont mélangés. Par exemple, le cas de l'anchois (*Engraulis encrasicolus*) montre une séparation nette entre les 3 individus appartenant aux plus jeunes stades de vie versus les 2 plus vieux stades de vie. Ces résultats indiquent que l'ontogénie (ou niveau de l'évolution morphologique de l'otolithe au cours de la vie du poisson) est un facteur essentiel à prendre en compte dans l'utilisation de la forme 3D des otolithes.

La forme 3D des otolithes s'explique-t-elle par la phylogénie ?

Pour limiter au maximum l'effet ontogénique et ainsi caractériser l'effet phylogénétique avec précision, seul l'individu présentant le stade de vie le plus avancé est considéré.

Les 22 espèces sont représentées par 6 genres et 12 familles. Une analyse comparée de classification hiérarchique de la forme 3D de l'otolithe et phylogénique en fonction de 2 niveaux taxonomiques a été réalisée (figure 4.5). Parmi les 6 ordres représentés, 4 sont bien groupés et seuls 2 genres sont mélangés (Clupéiformes et Perciformes) (figure 4.5). A un niveau taxonomique plus fin c'est-à-dire la famille, parmi les 12 testées, seule la famille des Clupeidae est mélangée ce qui montre une très bonne reconnaissance de l'espèce à partir de la forme 3D de l'otolithe. Cependant, beaucoup de familles ne sont représentées que par 1 seule espèce (figure 4.5 : 7 familles) et donc cette première analyse devra être confirmée dans le futur avec des jeux de données beaucoup plus importants.

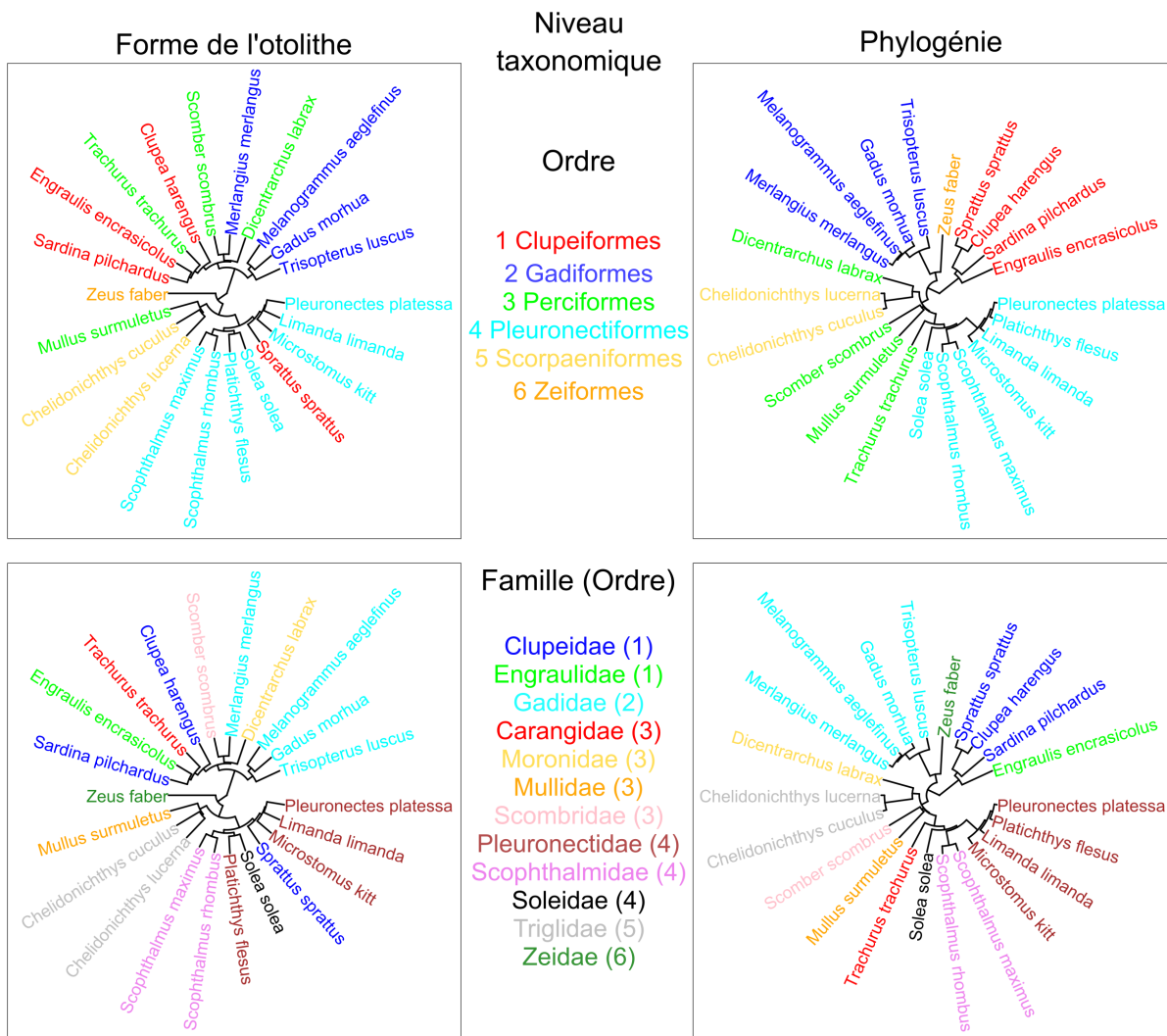


FIGURE 4.5 – Classification hiérarchique de la forme 3D de l'otolithe et phylogénétique (arbre phylogénétique) en fonction de 2 niveaux taxonomiques (Ordre et Famille). Chaque ordre ou famille est représentées par une couleur. Pour chaque famille, l'ordre auquel elle appartient est représenté par un chiffre entre parenthèses.

La forme 3D des otolithes peut-elle identifier les traits écomorphologiques spécifiques des espèces ?

Les otolithes permettent aux poissons de détecter les stimulations auditives et vestibulaires (PANFILI *et al.*, 2002). La science appelée écomorphologie est basée sur le fait que la forme est le résultat d'une adaptation fonctionnelle à l'environnement (FEILICH et LÓPEZ-FERNÁNDEZ, 2019). Les espèces démersales (poissons vivant au milieu de la colonne d'eau) et benthiques (espèces vivant sur le fond), du fait du faible niveau de visibilité par rapport à la surface, ont développé beaucoup plus leur audition que les espèces pélagiques (espèces vivant en haut de la colonne d'eau, près de la surface) (LYCHAKOV et REBANE, 2005 ; WRIGHT *et al.*, 2010). Une étude d'écomorphologie basée sur des espèces de poissons observés entre 200 et 750 m de fond montre qu'il existe une corrélation positive entre profondeur et taille des otolithes (CRUZ et LOMBARTE, 2004 ; LOMBARTE et CRUZ, 2007). La relation entre la forme et la taille de l'otolithe et les fonctions de mécanoréception et de transduction du son a également été abordée dans plusieurs études (GAULDIE et NELSON, 1990 ; POPPER et LU, 2000 ; SCHULZ-MIRBACH *et al.*, 2011 ; INOUE *et al.*, 2013). Les conclusions laissent à penser que les poissons vivants au fond présentent des otolithes plus grands que ceux des espèces pélagiques, ce qui est une conséquence du développement de leur capacité d'écoute et de communication (supérieur à celui de la capacité de vision). De plus, les poissons pélagiques possèdent des otolithes plus éfilés avec des rostrés bien prononcés par rapport aux poissons démersaux plus arrondis. Ces caractéristiques de forme et de taille des otolithes seraient aussi la conséquence de leur rôle dans la nage, au travers de la fonction vestibulaire, car les poissons ayant des capacités de nage très rapide avec de fortes accélérations présentent des otolithes très petits (LYCHAKOV et REBANE, 2005).

En reprenant l'analyse en composantes principales utilisant les données individuelles et regroupées par morphotype (poissons ronds et plats) ou par habitat (espèces pélagiques, démersales et benthiques) pour les 22 principales espèces de la Manche-mer du Nord, les morphotypes ou l'habitat discriminent bien la forme 3D des otolithes (figure 4.6 A et B). Ainsi, les otolithes de poissons plats se distinguent relativement bien des poissons ronds (figure 4.6 B). De même, selon le milieu (pélagique, démersal ou benthique) dans lequel vivent les poissons, leur adaptation fonctionnelle influence particulièrement la forme de leur otolithe (figure 4.6 A). Il est à noter que pour les 6 espèces de poissons démersaux, dont 4 appartiennent essentiellement à la famille des gadidés (morue, merlan, églefin, tacaud commun, bar, saint-pierre), il n'y a pas de recouvrement entre les espèces.

La forme 3D de l'otolithe discrimine très bien les groupes de poissons en fonction de la forme de leur nageoire caudale (figure 4.6 C). Les nageoires caudales des poissons étudiés ici sont homocerques, avec une forme symétrique et sans prolongement des vertèbres dans l'un des lobes. Bien que la nageoire homocerque produise principalement une poussée vers l'avant, elle permet aussi des changements rapides de direction et de vitesse, renforçant ainsi l'agilité du poisson (GOSLINE, 1971 ; LAUDER, 1989). Les poissons à corps et nageoires caudales éfilés, comme les maquereaux, utilisent une nageoire caudale fourchue, optimisée pour la vitesse même dans les eaux à forte courant (WEBB, 1984 ; KEAT-CHUAN NG *et al.*, 2017). En revanche, les poissons avec des nageoires arrondies privilégient la maniabilité à la vitesse, ce qui est idéal pour des environnements (GERSTNER, 1999 ; BLAKE, 2004). Enfin, les nageoires caudales tronquées, qui se terminent par un bord droit, offrent un compromis entre propulsion et maniabilité, facilitant les déplacements dans des habitats complexes comme les récifs coralliens et les zones à végétation dense (WEBB, 1984).

Enfin, la forme 3D de l'otolithe permet d'identifier une tendance du type d'alimentation de l'espèce (figure 4.6 D). Cependant, le type d'alimentation est lié à la position dans la colonne d'eau et lié au niveau du stade de vie (c'est-à-dire le type d'alimentation pour une espèce peut évoluer au cours de la vie du poisson). Ainsi, il y a beaucoup de confusions potentielles dans le type d'alimentation. Ce trait de vie devra être analysé dans le future avec un échantillon plus important et plus précis.

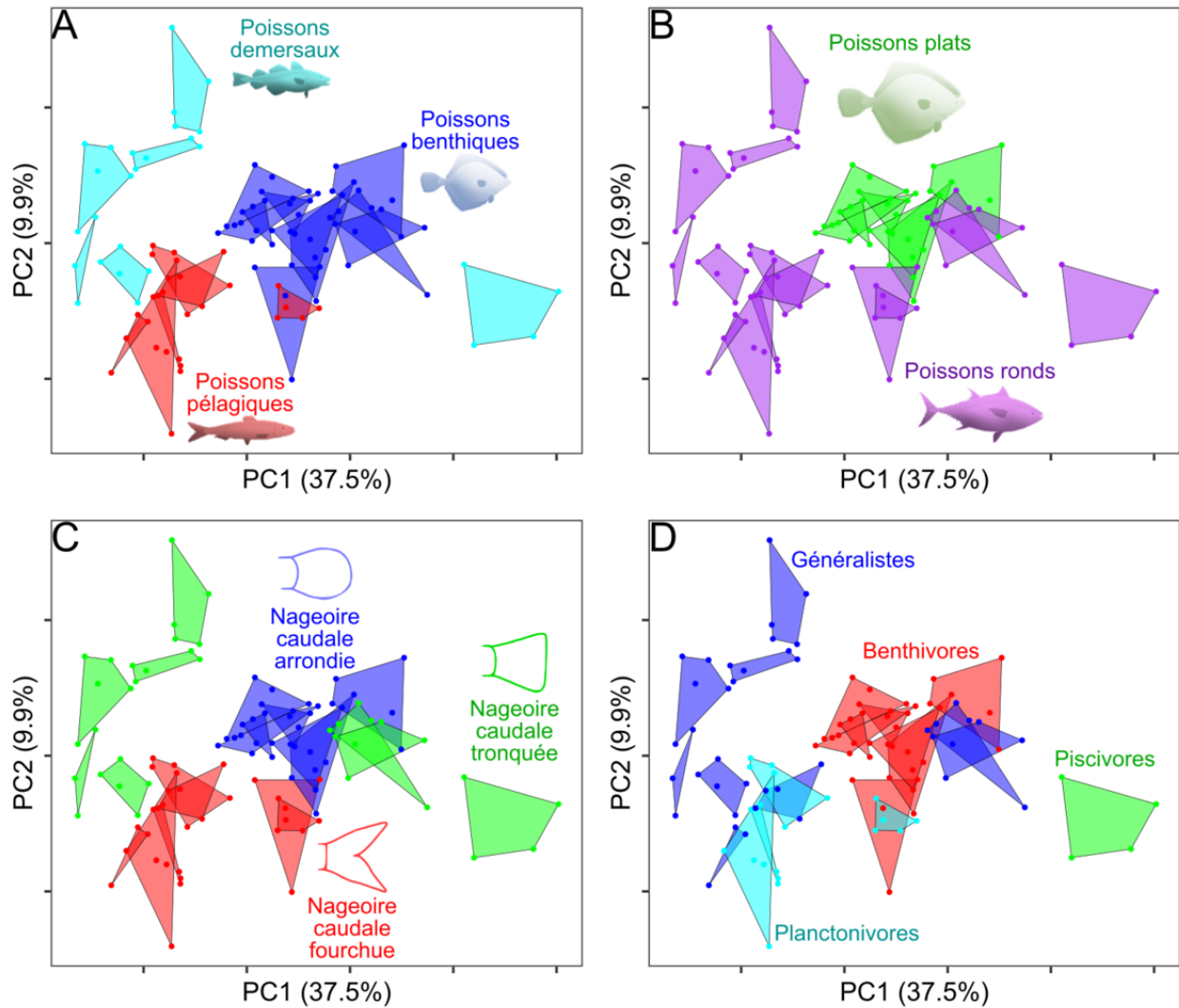


FIGURE 4.6 – Représentation graphique des composantes principales PC1 et PC2 des différences entre la forme 3D des otolithes des espèces de poissons selon divers écomorphologie. A : La position du poisson dans la colonne d'eau ; B : La forme du poisson ; C : La forme de la nageoire caudale du poisson en lien avec son déplacement ; D : Le mode d'alimentation du poisson. Chaque espèce est représentée par un polygone d'une couleur et chaque point correspond à un individu de l'espèce analysée (pour chaque espèce représentée, le type d'alimentation est le même pour tous les plusieurs individus car l'information individuelle n'est pas connue, cependant, le changement d'alimentation au cours de la vie du poisson pour une espèce donnée est fréquent).

Peut-on estimer un trait de vie spécifique à l'espèce à partir de la forme 3D de son otolithe ?

La figure 4.7 a été extraite à partir d'une analyse SHAP basée sur la matrice d'importance calculée en sortie d'un apprentissage d'une forêt aléatoire avec en entrée les traits de vie sans les niveaux taxonomiques et en sortie les espèces.

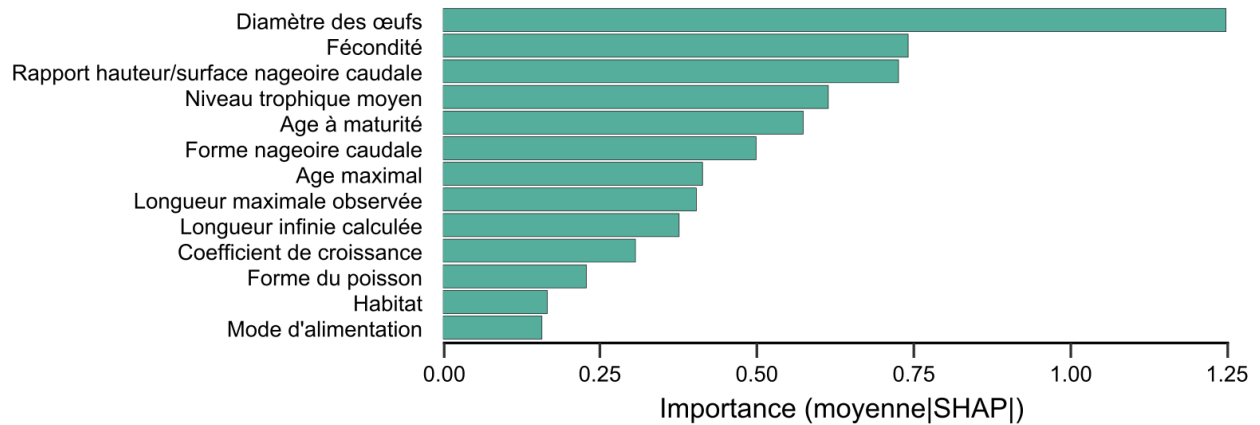


FIGURE 4.7 – Degrés de l'importance des traits dans la classification des espèces.

Les principaux traits de vie sont le diamètre des œufs, la fécondité, le rapport hauteur/surface de la nageoire caudale, et le niveau trophique moyen de l'espèce (figure 4.7).

A partir de la forme 3D des otolithes, 2 classifieurs ont été utilisés pour estimer les traits de vie des espèces. Parmi ces 2 classifieurs, 1 plus proche voisin (KNN) montre les meilleurs résultats en lien étroit avec la taille restreinte de la base utilisée.

Ces résultats montrent que la forme 3D de l'otolithe peut être utilisée pour identifier les traits de vie des espèces considérées avec une estimation supérieure à 75% (tableau 4.2). Ceci est un résultat très intéressant ouvrant de grandes perspectives dans le futur dans l'utilisation de la forme 3D des otolithes.

TABLE 4.2 – Taux de prédiction correct des différents labels de chaque trait à partir de la forme 3D des otolithes par un classifieur 1-plus-proche-voisin. La 1ère colonne reprend les degrés d'importance (IMP.) des traits pour caractériser la forme, la 3ème spécifie le nombre de labels encodés pour chaque trait de vie.

1 plus proche voisin (KNN) : entrées PC Forme 3D - sortie : labels trait					
Degré IMP.	Trait de vie	Nb. Labels	Taux global de bonne reconnaissance		
			apprentissage	généralisation	
			Taux moyen	Taux moyen	Taux max.
1,25	Diamètre des œufs	18	0.81 ± 0.22	0.56 ± 0.13	0,77
0,74	Fécondité	22	0.82 ± 0.21	0.56 ± 0.13	0,77
0,73	Rapport hauteur/surface nageoire caudale	22	0.83 ± 0.2	0.56 ± 0.13	0,77
0,61	Niveau trophique moyen	20	0.8 ± 0.23	0.57 ± 0.12	0,77
0,57	Age à maturité	15	0.83 ± 0.2	0.60 ± 0.13	0,80
0,50	Forme nageoire caudale	3	0.95 ± 0.08	0.90 ± 0.07	1,00
0,41	Age maximal	17	0.82 ± 0.23	0.57 ± 0.12	0,77
0,40	Longueur maximale observée	20	0.83 ± 0.2	0.57 ± 0.12	0,77
0,38	Longueur infinie calculée	22	0.82 ± 0.21	0.56 ± 0.13	0,77
0,31	Coefficient de croissance	22	0.82 ± 0.21	0.56 ± 0.12	0,77
0,23	Forme du poisson	2	0.97 ± 0.06	0.93 ± 0.04	0,97
0,17	Habitat	3	0.95 ± 0.08	0.92 ± 0.06	0,98
0,16	Mode d'alimentation	4	0.92 ± 0.12	0.85 ± 0.09	0,97
	Espèce	22	0.83 ± 0.21	0.57 ± 0.12	0,77
	Genre	20	0.83 ± 0.21	0.63 ± 0.15	0,83
	Famille	6	0.9 ± 0.13	0.77 ± 0.11	0,92
	Ordre	6	0.93 ± 0.11	0.87 ± 0.09	0,97

TABLE 4.3 – Taux de prédiction correct des différents labels de chaque trait à partir de la forme 3D des otolithes par un classifieur de type Forêt aléatoire. La 1ère colonne reprend les degrés d'importance (IMP.) des traits pour caractériser la forme, la 3ème spécifie le nombre de labels encodés pour chaque trait de vie.

Forêt aléatoire (Random Forest) : entrées PC Forme 3D - sortie : labels trait					
Degré IMP.	Trait de vie	Nb. Labels	Taux global de bonne reconnaissance		
			apprentissage	généralisation	
			Taux moyen	Taux moyen	Taux max.
1,25	Diamètre des œufs	18	1.00 ± 0.01	0.23 ± 0.13	0,55
0,74	Fécondité	22	1.00 ± 0.01	0.24 ± 0.17	0,62
0,73	Rapport hauteur/surface nageoire caudale	22	1.00 ± 0	0.25 ± 0.17	0,63
0,61	Niveau trophique moyen	20	1.00 ± 0.01	0.24 ± 0.16	0,62
0,57	Age à maturité	15	1.00 ± 0.01	0.27 ± 0.13	0,60
0,50	Forme nageoire caudale	3	1.00 ± 0.01	0.66 ± 0.16	0,92
0,41	Age maximal	17	1.00 ± 0.01	0.26 ± 0.15	0,63
0,40	Longueur maximale observée	20	1.00 ± 0	0.25 ± 0.15	0,62
0,38	Longueur infinie calculée	22	1.00 ± 0.01	0.24 ± 0.17	0,62
0,31	Coefficient de croissance	22	1.00 ± 0.01	0.24 ± 0.16	0,57
0,23	Forme du poisson	2	1.00 ± 0.01	0.77 ± 0.11	0,98
0,17	Habitat	3	1.00 ± 0.01	0.68 ± 0.18	0,97
0,16	Mode d'alimentation	4	1.00 ± 0.01	0.61 ± 0.15	0,92
	Espèce	22	1.00 ± 0.01	0.24 ± 0.17	0,68
	Genre	20	1.00 ± 0.01	0.31 ± 0.19	0,72
	Famille	6	1.00 ± 0.01	0.46 ± 0.18	0,85
	Ordre	6	1.00 ± 0.01	0.63 ± 0.19	0,98

4.3 Synthèse du chapitre 4

Ce dernier chapitre présente une analyse approfondie de la forme 3D des otolithes de poissons de l'écosystème Manche-sud Mer du (figure 4.8), avec un focus sur leur capacité à identifier les espèces et leurs traits de vie spécifiques, en tenant compte de l'effet ontogénique (*i.e.* évolution de la forme de l'otolithe au cours de la vie du poisson en réaction à des processus de développement ; MILLE, 2015 ; MAHÉ, 2019). Les résultats démontrent que la forme 3D des otolithes est un outil puissant pour la reconnaissance des espèces, en particulier lorsqu'on prend en considération l'évolution morphologique des otolithes tout au long de la vie du poisson. Ce processus ontogénique peut influencer les analyses, mais les résultats de la forme 3D montrent qu'ils intègrent l'effet de ces changements ontogéniques et de ce fait permettent d'identifier les différences phylogénétiques entre les espèces beaucoup plus précisément que les résultats obtenus de la forme 2D des otolithes.

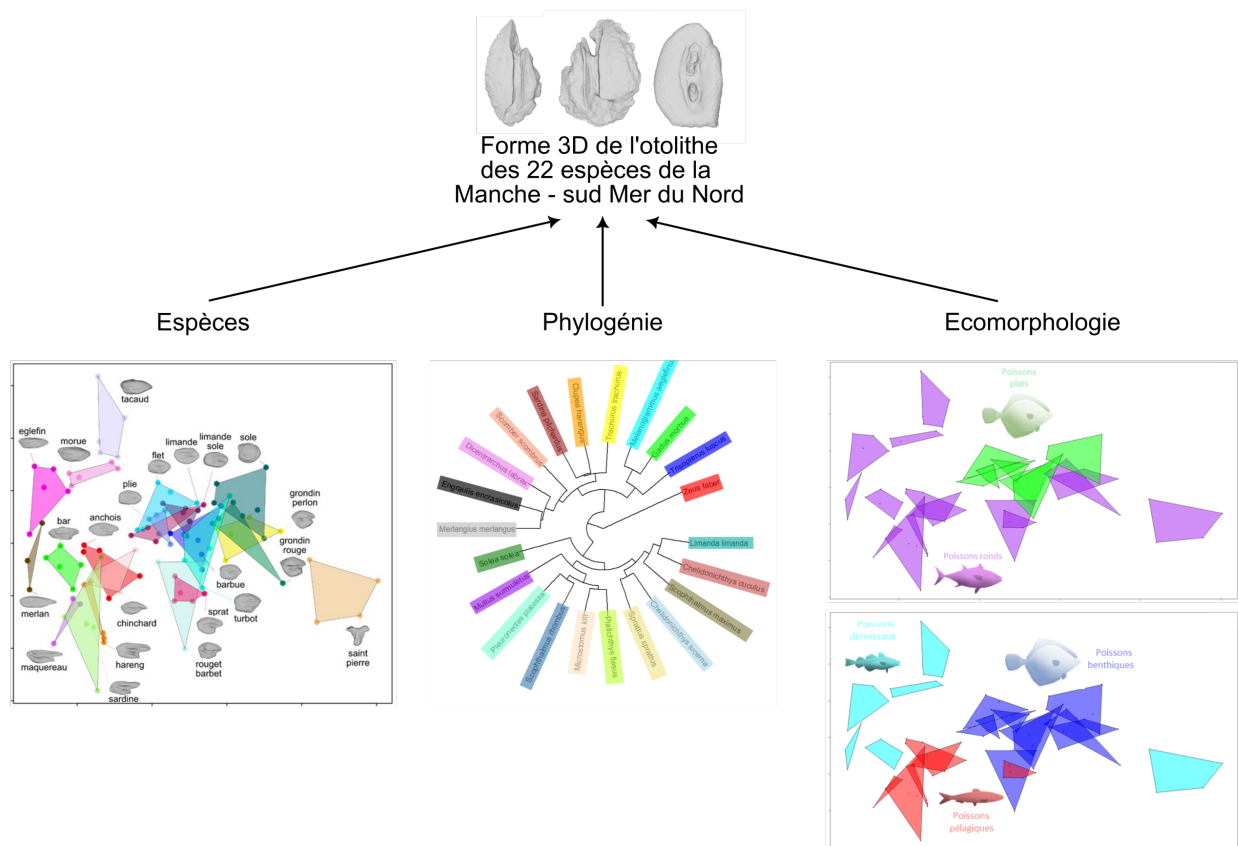


FIGURE 4.8 – Analyse de la forme des otolithes en relation avec les espèces, la phylogénie, et l'écomorphologie des poissons. À gauche, une identification d'espèces de poissons en fonction de la forme 3D de leurs otolithes. Au centre, un dendrogramme met en évidence les relations évolutives des espèces à travers la forme des otolithes. À droite, une approche écomorphologique différencie des groupes de poissons selon leur forme d'otolithe en fonction de leur habitat : poissons plats vs. ronds, et poissons benthiques vs. pélagiques.

Les analyses morphologiques des otolithes, telles que la forme générale, la présence du *sulcus acusticus* et l'épaisseur des otolithes, sont fondamentales pour différencier les espèces. Par

exemple, des espèces comme le maquereau ou la sardine présentent des caractéristiques distinctes du *sulcus acusticus* qui permettent de les identifier. De plus, l'analyse des otolithes en 3D révèle des corrélations intéressantes entre la forme des otolithes et les traits de vie des poissons, notamment en fonction de leur niveau dans la colonne d'eau (pélagique, démersal, benthique). Les poissons vivant dans des habitats plus profonds, comme les espèces démersales, ont des otolithes plus grands, tandis que les poissons pélagiques possèdent des otolithes plus complexes, adaptés à des mouvements rapides et agiles dans les eaux de surface.

L'effet ontogénétique est également pris en compte, montrant que les formes 2D des otolithes des jeunes individus diffèrent significativement de ceux des individus adultes (LLEONART *et al.*, 2000 ; CARDINALE *et al.*, 2004 ; MÉRIGOT *et al.*, 2007 ; MAHÉ, 2019). Cela nécessite de se concentrer sur les individus adultes post-première maturité sexuelle pour limiter au maximum les biais liés au stade de vie des individus lors de l'identification des espèces. L'analyse des groupes phylogénétiques à l'aide des formes 3D des otolithes a permis de distinguer les différentes familles et ordres de poissons, avec des résultats prometteurs pour une classification précise des espèces en prenant en compte les différents stades de vie des espèces étudiées.

Enfin, l'utilisation de la forme 3D des otolithes pour estimer les traits de vie des espèces, comme la fécondité, le diamètre des œufs, et le type de nageoire, ouvre de nouvelles perspectives pour la compréhension de l'écologie des poissons. Cette approche permet une estimation supérieure à 75 % de la classification des traits de vie des espèces étudiées, suggérant que la forme des otolithes peut être utilisée non seulement pour identifier les espèces, mais aussi pour éclairer leurs comportements écologiques et leurs adaptations fonctionnelles. Ces résultats offrent ainsi des perspectives intéressantes pour la gestion et la conservation des ressources marines à travers l'analyse des otolithes en 3D. Dans un futur proche, on pourrait penser qu'en analysant la forme 3D de l'otolithe, il serait possible d'identifier les différents traits d'histoire de vie de l'individu de façon très précise.

Chapitre 5 Discussion et perspectives

La forme de l'otolithe chez les poissons évolue tout au long de leur vie, influencée par leur ontogénie et leur environnement. Le facteur génétique, spécifique à chaque espèce, détermine également la forme de leur otolithe. Dans cette thèse, ces variations de forme des otolithes ont été explorées, se focalisant sur des espèces tempérées (Manche-mer du Nord, mer Méditerranée) mais aussi tropicales (Océan Atlantique : golfe de Guinée; Océan Indien : île de La Réunion) et analysant des images 2D mais également 3D. Les facteurs pouvant influencer cette forme étudiés comprennent l'asymétrie de l'oreille interne (côtés gauche et droite) et des facteurs environnementaux en examinant les variations de forme des otolithes en fonction de l'espèce, de sa phylogénie et de son écomorphologie. De plus, en dehors de résultats obtenus en biologie, il y a eu beaucoup de recherche et de développement autour des méthodes d'acquisition 2D et 3D et des classifieurs utilisés.

La thèse a exploré une approche novatrice pour l'analyse des otolithes, notamment en 3D, afin d'étudier leur morphologie, d'analyser leur asymétrie, et d'identifier les espèces et leurs stocks halieutiques.

Elle a d'abord posé les bases de la standardisation des images d'otolithes, essentielle pour garantir des analyses comparables entre différentes bases de données de routine 2D, mais également entre le 2D et le 3D. Un outil open source a été développé pour automatiser ce processus, permettant de corriger les biais liés à l'acquisition des images. Cette standardisation a été une étape majeure, facilitant l'harmonisation des données issues de différentes institutions et d'espèces variées. Cependant, des limitations subsistent, notamment pour les images à fond clair où le contraste est faible, révélant un besoin d'amélioration dans le traitement adaptatif des contrastes. En 3D, la reconstruction à l'aide de la microtomographie a offert une représentation précise des structures externes des otolithes, bien que le processus soit plus long et coûteux que l'analyse 2D. Cette première étape a jeté les bases pour des analyses plus complexes explorées dans les autres chapitres.

Ensuite, la thèse a mis en évidence une asymétrie significative en 3D entre les otolithes gauche et droit chez le rouget barbet de vase, une observation non détectable avec des approches 2D. Cette asymétrie, concentrée au niveau du *sulcus acusticus*, souligne l'importance de considérer la dimension tridimensionnelle pour évaluer précisément les unités de stocks. Cette analyse 3D, en allant au-delà des limites des projections 2D, s'est révélée cruciale pour détecter des différences géographiques subtiles entre stocks. Toutefois, ces avancées ont montré que l'approche nécessite un échantillonnage plus étendu afin de réduire les biais liés à la variabilité des environnements.

Puis, la thèse s'est appuyée sur ces bases pour mener une étude multi-échelle géographique, explorant la structuration des stocks à travers les analyses 2D et 3D. À petite échelle, notamment à La Réunion, des unités de gestion distinctes ont été identifiées pour des espèces comme le vivaneau rubis, en lien avec des habitats différenciés. En méditerranée, l'analyse 3D a renforcé la détection des stocks, mettant en évidence des barrières physiques telles que le détroit de Sicile. Ces résultats démontrent que la méthode tridimensionnelle est plus optimale pour délimiter les stocks halieutiques, bien que des confusions subsistent dans les classifications et les clustering. Par exemple, la méthode Random Forest s'est distinguée par sa fiabilité dans les approches supervisées, tandis que

DBSCAN a montré ses limites avec un fort taux de bruit. Ces observations soulignent l'importance de combiner des approches multidimensionnelles et d'élargir l'échantillonnage pour garantir des conclusions robustes. En complément, coupler ces analyses à des méthodes comme la génétique ou la microchimie pourrait enrichir la compréhension des réponses biologiques et écologiques des poissons, offrant une vision plus complète des dynamiques des stocks.

Enfin, la thèse a exploré les corrélations entre la forme 3D des otolithes et les traits de vie des poissons. Les analyses ont démontré une capacité accrue à identifier les espèces en intégrant les effets ontogéniques. Par exemple, la prise en compte de l'évolution morphologique des otolithes au cours de la vie du poisson a permis d'affiner la classification des espèces et des traits écologiques. Ces résultats illustrent que l'analyse 3D s'est avérée optimale à plus de 75% pour estimer les traits de vie, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour la gestion durable des ressources marines. Cette méthode permet également d'étudier les adaptations écologiques et fonctionnelles des espèces en relation avec leur habitat et leur comportement, enrichissant les conclusions issues des analyses précédentes.

En somme, la thèse met en lumière les avantages des analyses 3D pour surmonter les limitations des approches traditionnelles en 2D. Chaque chapitre a apporté une contribution essentielle, depuis la standardisation des données jusqu'à l'analyse approfondie des traits de vie. La thèse est marquée par différentes approches transdisciplinaires, établissant des connexions étroites entre les enjeux méthodologiques et les résultats biologiques ainsi qu'écologiques. Toutefois, des efforts supplémentaires sont nécessaires pour résoudre les limitations liées à l'échantillonnage, au coût et à la complexité des analyses 3D. Cette discussion intègre les principaux résultats de la thèse tout en offrant des perspectives pour renforcer et étendre les travaux futurs.

Comment standardiser et extraire les informations de la forme des otolithes à partir de leurs images en 2D et 3D pour assurer une analyse précise et reproductible ?

Chaque année, près d'un million d'otolithes sont collectés à travers le monde pour principalement l'estimation de l'âge des poissons, mais également pour étudier leur écologie et leur biologie. Cependant, le traitement et l'analyse de ces données massives posent un défi en raison de la variabilité inhérente aux méthodes d'acquisition d'images et aux caractéristiques des otolithes eux-mêmes. Dans ce contexte, les méthodes de standardisation présentées dans cette thèse (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2023b; ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2024a; ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2024c) offrent une solution prometteuse pour augmenter le nombre de données normalisées et traitables. Grâce à l'automatisation des algorithmes, ces méthodes permettent de traiter rapidement et efficacement les images d'otolithes, garantissant ainsi une cohérence et une comparabilité accrues des données entre différentes études.

Les algorithmes automatisés utilisés dans ces méthodes de standardisation permettent également l'extraction automatique de descripteurs de forme, qu'ils soient univariés ou multivariés. Ces descripteurs, qui incluent des mesures de taille, de forme et de complexité structurelle, sont essentiels pour comprendre les variations morphologiques des otolithes en réponse à divers facteurs environnementaux et biologiques. L'automatisation de l'extraction de ces critères réduit non seule-

ment le temps et les efforts nécessaires à l'analyse, mais améliore également la précision et la reproductibilité des résultats (LECUN *et al.*, 2012). En conséquence, ces méthodes constituent une avancée significative pour la recherche en morphométrie, permettant une meilleure utilisation des grandes bases de données d'otolithes disponibles.

Le passage de l'analyse en 2D à l'analyse en 3D ouvre de nouvelles perspectives pour l'extraction de caractéristiques morphométriques plus complexes. Par rapport aux images 2D, l'analyse 3D permet d'extraire des mesures volumétriques de la forme globale mais aussi le volume du *sulcus*, de manière plus reproductible et précise. Cette capacité à analyser des structures en trois dimensions est particulièrement importante pour les études de croissance et de développement, où les informations volumétriques et de profondeurs fournissent des indices supplémentaires sur les populations étudiées (ROHLF et SLICE, 1990). En résumé, les méthodes développées dans cette thèse offrent un potentiel considérable pour étendre les capacités de recherche morphométrique à un large éventail de disciplines et d'applications.

Enfin, au-delà de leur application à l'analyse des otolithes, ces méthodes de standardisation pourraient être étendues à d'autres domaines des sciences biologiques et environnementales. Par exemple, elles pourraient être utilisées pour standardiser les images de la forme des poissons ou d'autres organismes marins, y compris les plantes aquatiques, les œufs, et les larves. Dans le cadre de la reconnaissance des espèces ou de l'étude des stades de développement, l'utilisation de ces méthodes permettrait d'obtenir des images individuelles standardisées, facilitant ainsi la comparaison entre différents individus ou populations (KUHL et GIARDINA, 1982).

Quel prétraitement favorisé pour l'acquisition d'images en 2D ?

Pour garantir que l'image initiale soit relativement standardisée lors de l'acquisition, plusieurs étapes préliminaires pourraient être minutieusement planifiées et exécutées. Cela pourrait éviter une ou plusieurs étapes de la standardisation par exemple ou augmenter le nombre d'images standardisées issus d'une base de données de routine.

Premièrement, il faudrait uniformiser l'éclairage sur les otolithes. Assurer un éclairage homogène et diffus afin d'éviter les ombres et les réflexions qui pourraient altérer les détails visuels des otolithes. L'utilisation de sources lumineuses à LED (diode électroluminescente ou light-emitting diode) avec un diffuseur peut aider à atteindre une distribution uniforme de la lumière. L'intensité de l'éclairage doit être constante à travers toutes les sessions de capture d'images pour maintenir la cohérence des conditions de prise de vue (MARTI-PUIG *et al.*, 2020).

Deuxièmement, il est recommandé aussi de standardiser la configuration de la caméra et des paramètres d'acquisition. Des paramètres de caméra fixes, incluant l'ouverture, la vitesse d'obturation, la balance des blancs, et la sensibilité ISO (International Organization for Standardization)¹ pourraient être utilisés pour éviter les variations dans les captures d'images. Une résolution suffisamment élevée pourrait être choisie pour capturer les détails fins des otolithes tout en évitant les fichiers excessivement lourds qui pourraient compliquer le traitement des données.

Ensuite, une étape de positionnement et d'orientation unique serait nécessaire comme utiliser un support de montage qui maintient l'otolithe dans une position fixe et reproductible. Cela réduit les variations dues à des changements d'angle ou de position entre les échantillons. Tous les oto-

1. Une norme qui détermine la sensibilité du capteur à la lumière, influençant ainsi la qualité et la luminosité de chaque image capturée.

lithes seront orientés de la même manière par rapport à la caméra. Cela peut être facilité par des marquages ou des guides sur le support de montage (KALISH *et al.*, 1995).

Autre point possible à rajouter au protocole est l'emploi d'une charte de couleurs et une règle dans le champ de vision pour calibrer les couleurs et les dimensions des images. Cela permettrait une comparaison plus précise entre les images en termes de coloration RGB (WANG, 2010).

Finalement, un logiciel unique et standard pour l'acquisition d'images permettrait de sauvegarder et de rappeler des profils de configuration spécifiques. Cela garantit que toutes les images sont prises avec les mêmes paramètres. Des processus automatisés par espèces pourront être par la suite appliqués. Les étapes de traitement initial des images, telles que la conversion en niveaux de gris ou la binarisation, pourront être réalisées automatiquement par le logiciel, par exemple, pour minimiser l'intervention manuelle et les erreurs potentielles (LÓPEZ-ESCÁMEZ *et al.*, 1993). Des ateliers comme WKNARC1 et WKNARC2 (Workshop of National Age Readings Coordinators) ont été organisés pour améliorer l'Assurance Qualité à l'échelle européenne, en révisant les méthodes de préparation, le développement de techniques, et les méthodes de validation (VITALE *et al.*, 2019). Le groupe de travail WGBIOP (Working Group on Biological Parameters) a été formé pour coordonner et mettre en œuvre des méthodes d'Assurance Qualité rigoureuses pour les paramètres biologiques utilisés dans l'évaluation des stocks. Différents outils, comme des feuilles de calcul avec des scripts R ou des plateformes en ligne comme SmartDots, sont utilisés pour faciliter l'évaluation et la standardisation des estimations d'âge et donc des images d'otolithes acquises pour la routine (VITALE *et al.*, 2019).

Descripteurs de la forme de l'otolithe en 2D et en 3D

L'analyse des formes 2D et 3D des otolithes nécessite l'utilisation de descripteurs qui peuvent être comparés de manière fiable entre ces deux dimensions, tout en capturant les aspects essentiels de la croissance et de la morphologie des otolithes.

Parmi ces descripteurs, les mesures univariées comme la taille et le poids sont fréquemment utilisées pour évaluer la croissance des otolithes. Cependant, bien que la taille ou le poids soit des indicateurs directs de la croissance, ils sont souvent considérés comme de mauvais proxys de la forme globale en 3D en raison des limitations liées à la précision des balances et à la variabilité des densités matérielles des otolithes (CAMPANA et CASSELMAN, 1993). De plus, le poids peut être influencé par des facteurs externes, tels que l'accumulation de minéraux ou des dommages, qui ne reflètent pas nécessairement la forme ou la croissance réelle de l'otolithe. Les descripteurs de forme, tels que les indices de forme (ou ratios entre 2 descripteurs univariés), offrent une meilleure représentation de la forme globale des otolithes. Ces descripteurs sont relativement faciles à obtenir et fournissent une approximation de la forme qui est souvent suffisante pour des analyses de base (ZELDITCH *et al.*, 2004). Cependant, il est important de noter que les ratios et les descripteurs univariés, bien qu'utiles, ne peuvent pas capturer toute la complexité des formes d'otolithes, en particulier pour les otolithes qui présentent une morphologie lobée ou irrégulière. La précision des informations obtenues à partir de ces descripteurs est donc limitée lorsqu'il s'agit de décrire des formes complexes (BOOKSTEIN, 1992). L'utilisation exclusive de données univariées est moins précise que l'intégration de données multivariées, notamment pour analyser des variations complexes des otolithes. Par exemple, l'analyse du périmètre des otolithes de l'espadon (*Xiphias gladius*) ne révèle qu'une tendance latitudinale sans distinguer des groupes d'individus distincts (MAHÉ *et al.*, 2016b). De plus, les études de MAHÉ *et al.*, 2016a et MAHÉ *et al.*, 2018

montrent que les données univariées sont limitées pour évaluer l'influence de variables environnementales, telles que la température ou la composition du régime alimentaire. Certains indices de forme, comme la rondeur, l'ellipticité et le facteur de forme, ne suffisent pas à capturer toute la complexité du contour des otolithes et à décrire l'impact de la température ou de la disponibilité en acides gras polyinsaturés oméga-3 (MAHÉ, 2019).

Pour surmonter ces limitations, il est nécessaire d'employer des méthodes plus sophistiquées qui peuvent capturer la totalité de la forme en 2D et en 3D. Parmi les méthodes disponibles, l'analyse par descripteurs de Fourier est largement utilisée dans la littérature pour l'analyse des formes en 2D. La méthode de Fourier est bien établie pour l'analyse des contours 2D, car elle permet de décomposer une forme complexe en une série de fonctions sinusoïdales, capturant ainsi des détails subtils de la morphologie (ROHLF et ARCHIE, 1984). Cette technique a été adaptée au fil du temps pour être utilisée dans des contextes 3D, où des descripteurs de Fourier tridimensionnels peuvent être développés pour analyser les surfaces complexes des otolithes en 3D (SHEN *et al.*, 2009).

Asymétrie des otolithes gauche et droit dans l'oreille interne des poissons

L'Asymétrie 2D est-elle suffisamment représentative de la réelle asymétrie 3D ?

La forme plane (2D) des otolithes est fréquemment utilisée comme indicateur pour analyser la forme de l'otolithe et pour évaluer les différences entre les stocks de poissons. Cependant, cette approche peut avoir des limitations significatives lorsqu'il s'agit de capturer la complexité réelle de l'asymétrie des otolithes, qui se manifeste pleinement en 3D. D'après les résultats de l'étude menée sur le rouget barbet de vase en mer Méditerranée, les études antérieures basées sur l'asymétrie en 2D refléteraient que partiellement les asymétries présentes dans les otolithes (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2023a). Cela pourrait entraîner une sous-estimation de la variabilité morphologique des otolithes, et en conséquence, à des identifications erronées de stocks ne prenant pas en compte l'asymétrie.

Cette étude a montré que l'asymétrie 2D de l'otolithe gauche par rapport au droit est non significative chez le rouget barbet de vase en Méditerranée alors que l'analyse de la forme en 3D montre une asymétrie significative sur les mêmes données (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2023a). Ce résultat suggère que le contour observé en 2D n'était pas représentatif de la forme globale observée en 3D pour détecter les différences entre les otolithes gauches et droits. L'image 2D n'est qu'un seul plan de projection de l'image 3D (c'est-à-dire qu'avec une image 3D, plusieurs images 2D peuvent être générées à partir de différentes projections). La visualisation en 3D a montré que des différences peuvent être trouvées dans l'ensemble de l'otolithe, et pas seulement sur le bord externe utilisé classiquement en analyse 2D (image 2D; ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2023a). En fait, les différences les plus significatives ont été observées dans des parties de l'otolithe qui ne peuvent pas être illustrées dans les projections 2D. Il s'agit de la première étude comparant les formes 2D et 3D des mêmes otolithes. Ce résultat devrait donc être testé pour d'autres espèces pour lesquelles les données 2D ne montrent pas d'asymétrie. En outre, l'analyse des descripteurs de Fourier sphériques (SFD) a montré que l'interaction entre les effets géographiques et ceux entre les 2 oreilles

internes (traduisant un effet côté de de l'oreille interne) était significative. Par conséquent, la différence observée dans l'espace 3D entre les formes des otolithes gauche et droit pourrait modifier de manière significative la structure des stocks, comme cela a été observé dans l'analyse 2D de la bogue (*Boops boops*) en mer Méditerranée (MAHÉ *et al.*, 2018). Chez les poissons ronds, on s'attend donc à ce que l'absence d'asymétrie soit la norme et qu'elle soit maintenue par des processus homéostatiques (PALMER, 2009). Pour le rouget barbet, les otolithes ne présentent pas d'asymétrie d'après l'analyse 2D (MILLE *et al.*, 2015), ce qui a été corroboré par ce travail à partir de données 2D. Cette même étude de la forme des otolithes à partir de données 3D a montré une asymétrie significative entre les otolithes gauche et droit chez cette espèce. Par conséquent, il est possible que cette nouvelle approche 3D montre que pour des espèces, il y ait finalement une asymétrie significative non-détectée par des études antérieures qui l'ont sous-estimées par l'approche 2D.

De plus, cette asymétrie est également en interaction avec la zone géographique de prélèvement du poisson, c'est-à-dire liée à son environnement. L'effet géographique des approches 2D et 3D a donné des résultats similaires, avec des différences significatives entre ces trois locations de la mer Adriatique à la mer Levantine. Cependant, alors que l'analyse 2D a révélé des différences significatives entre les 3 localisations, l'analyse 3D a indiqué que les localisations de la mer Adriatique (GSA 18c) et la mer Egée (GSA 22b) étaient similaires l'une à l'autre, mais différentes de la localisation de la mer Levantine (GSA 27b). Cette constatation a également été confirmée par la visualisation de la distance euclidienne entre les formes des otolithes de l'oreille interne gauche et droite dans les analyses 2D et 3D. Plus précisément, les rougets de la mer Adriatique et la mer Egée présentaient de petites différences dans la forme des otolithes entre les oreilles internes gauche et droite, tandis que ceux de la mer Levantine présentaient des différences significatives par rapport aux deux autres GSA. Cela suggère que l'analyse 3D a retenu plus d'informations que l'analyse 2D. Visuellement et en utilisant des calculs simples de distance euclidienne en 2D ou en 3D, la mer Levantine se distingue des deux autres localisations (la mer Adriatique et la mer Egée). Cependant, le modèle 2D n'a pas permis de mettre en évidence cette division par l'analyse de la forme de l'otolithe. L'étude précédente sur les EFDs a corroboré cette même division du rouget barbet de vase (*Mullus barbatus*) en Méditerranée, qui a identifié plusieurs différences dans la forme de l'otolithe liées aux zones géographiques échantillonnées (golfe du Lion, mer Égée et mer Noire, MORAT *et al.*, 2012). En outre, une étude récente sur le merlu européen (*Merluccius merluccius*) a identifié la même limite de deux unités de stock : mer Adriatique - mer Levantine orientale (MORALES-NIN *et al.*, 2022). Cela pourrait indiquer que le merlu européen et le rouget sont particulièrement affectés par des facteurs environnementaux ou autres qui entraînent cette différence de forme.

L'Asymétrie réelle obtenue en 3D peut apporter de nouvelles informations

L'asymétrie réelle des otolithes obtenue à partir d'analyses en 3D peut révéler des informations cruciales sur la physiologie et l'écologie des poissons. Ces informations ne sont pas toujours visibles dans les analyses traditionnelles en 2D. En effet, les otolithes jouent un rôle essentiel dans la détection du son et la gestion de la position spatiale, fonctions vitales pour les comportements de chasse, qu'ils soient actifs ou passifs. L'analyse en 3D permet d'examiner plus précisément les différences subtiles entre les otolithes gauche et droit, révélant des asymétries qui pourraient influencer la perception auditive des poissons et leur capacité à localiser des sources sonores (LOMBARTE et CRUZ, 2007).

Les otolithes des oreilles droite et gauche des poissons ne sont pas toujours parfaitement symé-

triques, ce qui pourrait être une adaptation des poissons à percevoir les sons. Cette asymétrie peut entraîner une variation dans la détection des longueurs d'ondes sonores, ce qui pourrait avoir des implications sur la localisation des sons dans l'environnement aquatique. Par exemple, une asymétrie dans les otolithes pourrait améliorer la capacité d'un poisson à distinguer les sons provenant de directions différentes, optimisant ainsi sa capacité de chasse. Les poissons utilisant une stratégie de chasse passive, où ils attendent que leurs proies viennent à eux, pourraient bénéficier d'une plus grande sensibilité à certaines fréquences sonores, facilitée par une asymétrie fonctionnelle des otolithes (POPPER et FAY, 2011). Chez le rouget barbet de vase (*Mullus barbatus*), la forme des otolithes pourrait également être liée à la fonction spécifique de l'espèce dans son habitat. Le rouget barbet est connu pour sa méthode de chasse, où il fouille le substrat à l'aide de ses barbillons pour trouver des invertébrés. La granulométrie du substrat, c'est-à-dire la taille des particules du sol, peut influencer la forme de la bouche du rouget (MAHÉ *et al.*, 2014) et par extension, la forme de ses otolithes, qui jouent un rôle dans la détection des vibrations du sol. Une asymétrie en 3D pourrait refléter une adaptation spécifique à la variabilité de l'environnement granulométrique, permettant au rouget d'optimiser sa stratégie de recherche de nourriture en fonction des conditions locales (LOMBARTE et LLEONART, 1993 ; MORAT *et al.*, 2012).

L'asymétrie en 3D offre ainsi des perspectives nouvelles pour comprendre les interactions entre la morphologie des otolithes et les comportements des poissons face à leur environnement. Ces analyses peuvent non seulement révéler des adaptations spécifiques à l'environnement, mais aussi aider à identifier des sous-populations au sein d'une même espèce, facilitant la gestion des stocks de pêche. En outre, l'analyse 3D peut également être utilisée pour étudier la texture de la surface et la microstructure de l'otolithe. Ces informations supplémentaires peuvent être utilisées pour identifier différents stocks de poissons qui peuvent avoir une forme d'otolithe similaire mais une texture de surface et une microstructure différentes. L'analyse de la forme de l'otolithe à partir d'une image 2D ne se base que le contour externe de l'otolithe sur un seul plan de projection, alors que les images 3D comportent plusieurs plans de projection. Le *sulcus acusticus*, zone de connexion entre l'otolithe et le cerveau, ne peut pas être décrit sur une image 2D, alors qu'il peut l'être avec une analyse 3D. La projection décrite par Gonçalves *et al.* (2017) a été principalement utilisée dans l'analyse des formes en 2D pour identifier les stocks, mais elle ne peut pas être utilisée pour analyser le *sulcus acusticus*. Des études antérieures ont tenté d'examiner la taille et la forme de cette partie de l'otolithe à l'aide d'une analyse de forme en 2D (TORRES *et al.*, 2000 ; CHOLLET-VILLALPANDO *et al.*, 2019 ; D'IGLIO *et al.*, 2023). Cependant, ces approches ont des limites techniques, car elles ne prennent pas en compte la profondeur de cette structure. En revanche, l'analyse 3D offre une vue plus complète du *sulcus acusticus* en permettant d'extraire des mesures de profondeur et de volume. Ces informations supplémentaires sur le *sulcus* permettraient aussi de caractériser le niveau de connexion et donc d'utilisation de l'otolithe par le poisson traduisant des adaptations comportementales de l'individu face à son milieu. De même, d'autres microstructures de forme peuvent être analysées à l'aide d'images 3D. Cependant, toutes les microstructures de forme ne sont pas nécessairement importantes dans tous les cas, et la complexité accrue de l'imagerie et de l'analyse 3D peut ne pas être nécessaire en fonction de la question de recherche.

L'Asymétrie 2D est-elle observable qu'en milieu tempéré ?

L'asymétrie des otolithes a été testée sur 2 espèces tropicales (*Elops lacerta* et *Pseudotolithus senegalensis*, respectivement) de l'océan Atlantique bordant l'Afrique de l'Ouest, dans le

golfe de Guinée (voir Annexes). Dans les 2 cas, cette asymétrie a été significative (HOUETO *et al.*, 2024a; HOUETO *et al.*, 2024b). L'amplitude de l'asymétrie directionnelle chez l'espèce *Elops lacerta* (HOUETO *et al.*, 2024b) est différente à chaque localisation, toutefois 2 groupes émergent avec des amplitudes similaires (6% pour le lagon de Cotonou et la côte Atlantique puis 5% pour le lac Nokoué et le lagon Porto-Novo). Cette division en 2 groupes semble être liée à 2 types d'environnement : le lagon Cotonou est lié à directement à l'océan Atlantique tant dit que le lac Nokoué et le lagon de Porto-Novo sont dans les terres. Chez l'espèce *Pseudotolithus senegalensis* (HOUETO *et al.*, 2024a), les individus échantillonnés sur la côte atlantique de l'Afrique de l'Ouest présentent une asymétrie directionnelle significativement plus élevée que ceux échantillonnés dans le lac Nokoué et les lagunes de Porto-Novo comme chez les individus de l'espèce *Elops lacerta* aussi. Ces observations peuvent indiquer des différences dans les contraintes environnementales ou les modes de croissance qui influencent la symétrie des otolithes dans ces différents habitats. D'une part, les paramètres biotiques et abiotiques entre ces localisations peuvent être très différents, et cela influence fortement la variabilité morphologique de l'otolithe (CASTONGUAY *et al.*, 1991; LOMBARTE et LLEONART, 1993; MONTEIRO *et al.*, 2005). D'autre part, les apports en nourriture sur ces localisations peuvent être également différentes alors que la composition du régime alimentaire en termes de concentration en acides gras polyinsaturés essentiels affecte la composition de l'endolymph et génère donc une variabilité de forme. Cette composition du bol alimentaire explique mieux les variations de forme des otolithes que la quantité de nourriture ingérée par l'animal (MILLE, 2015; MAHÉ, 2019). Bien que la plupart des études sur l'asymétrie des otolithes se concentrent sur des environnements tempérés, ces résultats montrent que pour un milieu où les variations de température sont limitées, on observe toutefois une asymétrie significative pour certaines espèces de poissons ronds tropicaux. Cette analyse pourrait aussi être réalisée sur des espèces dans des environnements particuliers comme les environnements polaires. Dans ces régions du globe, les conditions de température sont stables mais les valeurs extrêmes de température pourraient également influencer l'asymétrie, bien qu'il y ait chez ces espèces, des mécanismes liés à l'adaptation aux basses températures et à une alimentation spécialisée (WEBB, 1994).

Comment la forme des otolithes au sein d'une même espèce répond-elle aux facteurs environnementaux ?

Le chapitre 3 de la thèse explore la capacité de la forme de l'otolithe à délimiter les stocks halieutiques pour plusieurs espèces, prises espèce par espèce (analyses uniquement intra-spécifique) avec des échelles géographiques de la taille du stock très variable. Pour le cas de la macro-échelle géographique couvrant la mer Méditerranée, l'analyse de la forme de l'otolithe a été effectuée à la fois en 2D et en 3D. Lors de cette thèse, l'analyse des 9 espèces tropicales a montré une division de 2 stocks que pour 2 espèces, l'île de la Réunion semblait présenter 2 unités de stocks distinctes utilisant la forme 2D de l'otolithe (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2023c). De plus, en mer Méditerranée (en milieu tempéré), une division en 2 stocks a été observée pour le rouget barbet de vase en utilisant la forme 2D et 3D. Bien que l'analyse de la forme des otolithes soit une méthode couramment utilisée pour distinguer les populations de poissons, elle n'est pas sans limites.

Pour les espèces tropicales analysées, la vieille dorée (*Cephalopholis aurantia*) et le colas orné (*Pristipomoides argyrogrammicus*) n'ont pas présenté de variations significatives liées à la loca-

lisation des différents échantillonnages, suggérant qu'elles pourraient constituer des populations uniques autour de l'île de La Réunion. 5 autres espèces étudiées montrent des variations de forme liées à la zone géographique mais pas de délimitations géographiques claires car dans chaque espèce, les résultats opposent une zone aux autres zones ce qui demande à être confirmé dans le futur avant de conclure sur la possibilité de plusieurs stocks. Ces problèmes de délimitation pourraient être liés à des aspects techniques et méthodologiques (équilibre échantillonnage par localisation géographique ...) ou par des aspects environnementaux différents selon la zone d'échantillonnage se traduisant par des formes d'otolithes différents mais formant finalement un continuum géographique délimitant un stock. En génétique ce phénomène caractérise les populations panmixtes².

Le rouget barbet de vase a été discriminé en 2 stocks couvrant toute la mer Méditerranée que ce soit en utilisant la forme 2D ou 3D de l'otolithe (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2024d). De même, le choix de la classification (classification supervisée ou non supervisée) n'a pas influencé le nombre final de stocks. Cependant, la forme 3D de l'otolithe discrimine mieux les stocks que la forme 2D. Les 2 stocks se séparent au niveau de la barrière ou front hydrologique du détroit de Sicile caractérisé par une faible profondeur et une courantologie très active et très complexe limitant les échanges entre les parties est et ouest de la mer Méditerranée (SKLIRIS, 2013). La division des stocks par cette barrière a été également observée chez plusieurs espèces, notamment le merlu (*Merluccius merluccius*) (MORALES-NIN *et al.*, 2022), le bogue (*Boops boops*) (MAHÉ *et al.*, 2021), des céphalopodes (KELLER *et al.*, 2017) et la sardine (JEMAA *et al.*, 2015). Cependant, même si la délimitation a été trouvée sur ces stocks du rouget barbet de vase, l'estimation des classificateurs dans chaque stock présente des confusions non négligeables (voir figure 6 et 9, ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2024d). Le classifieur KNN avec $k=1$ a révélé une meilleure performance d'apprentissage que des valeurs de k plus élevées, indiquant une sensibilité accrue au bruit et une moindre robustesse face à des échantillons atypiques. Cette observation suggère que des échantillons spatialement plus proches pourraient améliorer l'efficacité de la classification. Il est possible que l'échantillonnage spatial ne soit pas suffisamment précis bien qu'il ait été réalisé lors d'un projet européen regroupant la quasi-totalité des pays méditerranéens. Du point de vue écologique, la nécessité de migration pour l'alimentation et la reproduction chez de nombreux poissons peut provoquer un chevauchement des stocks (MORALES-NIN *et al.*, 2022; MORAT *et al.*, 2012). Cette situation complique particulièrement la délimitation des stocks, en raison de la capacité de ces poissons à parcourir de longues distances et à interagir avec diverses populations.

Les variations morphologiques des otolithes peuvent être subtiles et influencées par une multitude de facteurs, rendant la différenciation des stocks délicate. Par ailleurs, bien que la génétique soit l'approche la plus utilisée pour identifier les différences entre populations, elle présente elle aussi des défis, notamment parce qu'elle ne prend pas en compte les influences environnementales qui peuvent également jouer un rôle crucial dans la différenciation des stocks (BEGG et WALDMAN, 1999). Contrairement aux analyses génétiques qui se concentrent uniquement sur les différences héréditaires, la forme des otolithes reflète à la fois la génétique et l'environnement. Cela en fait un indicateur potentiellement plus robuste pour l'identification des stocks, car il intègre les effets des conditions locales sur la morphologie des poissons (CAMPANA et CASSELMAN, 1993). De plus, Les influences environnementales impactent de manière globale la morphologie des otolithes, tandis que les facteurs génétiques exercent une influence plus localisée sur leur forme (VIGNON et MORAT, 2010).

2. Les individus sont répartis de manière homogène au sein de la population et se reproduisent tous aléatoirement.

En effet, des études ont montré que la forme des otolithes, influencée par la température de l'eau, la salinité, et d'autres facteurs environnementaux, peut être un outil efficace pour distinguer les stocks dans certaines circonstances (MILLE, 2015 ; MAHÉ, 2019). L'environnement joue un rôle clé dans la détermination de la forme des otolithes, ce qui en fait un bon indicateur pour l'identification des stocks de poissons. Cependant, l'environnement est souvent plus fluctuant que les barrières génétiques, ce qui peut compliquer l'interprétation des résultats. Les variations environnementales peuvent induire des modifications morphologiques temporaires ou saisonnières, qui ne reflètent pas nécessairement des divisions persistantes entre les stocks (LOMBARTE *et al.*, 2003). Toutefois, lorsqu'elles sont utilisées conjointement avec des analyses 3D des otolithes, ces variations peuvent offrir une image plus complète et optimale des différences entre les stocks, surtout lorsqu'elles sont appliquées jusqu'à des limites géographiques claires, comme des barrières physiques tels que des fronts océaniques à des changements brutaux de profondeur et présentant de forts courants. Ces frontières naturelles peuvent agir comme des séparations physiques, limitant les échanges entre populations et facilitant l'identification des stocks à partir de leurs caractéristiques morphologiques (MORAT *et al.*, 2012).

Perspective d'amélioration de l'identification de stocks en utilisant la forme des otolithes

La délimitation des stocks est une discipline complexe. Toutefois, dans cette thèse, l'utilisation de la forme 3D des otolithes a permis d'améliorer la précision de la délimitation de stock par rapport à la méthode conventionnelle utilisant les images 2D.

Pour améliorer l'identification de stocks en utilisant la forme 3D des otolithes, plusieurs perspectives pourraient être explorées. Il se pourrait que le nombre d'échantillons utilisés n'ait pas été suffisant pour fournir des résultats précis et représentatifs de la population étudiée de poissons. En particulier, dans le cas du rouget barbet de vase, le Random Forest a tendu à surajuster quand le nombre d'arbres (*n*tree) excédait 33% du nombre total d'échantillons (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2024d). Une augmentation de la taille de l'échantillon aurait probablement permis une meilleure représentation de la variabilité des formes des otolithes, conduisant à des résultats plus fiables et applicables à une plus large échelle. De plus, la répartition géographique des échantillons joue un rôle crucial sur les résultats. Une distribution inégale peut introduire un biais, compte tenu de la variabilité des conditions environnementales et des traits spécifiques des populations de poissons d'une localisation géographique à l'autre. Ainsi, une distribution équilibrée des échantillons est essentielle pour des résultats fidèles et généralisables.

L'intégration de l'asymétrie des otolithes gauche et droit dans l'analyse de leur forme peut offrir des perspectives nouvelles et plus détaillées sur la manière dont les facteurs environnementaux influencent la morphologie des poissons. L'asymétrie directionnelle des otolithes a déjà été identifiée comme un indicateur potentiel de stress environnemental et de plasticité phénotypique. En effet, le niveau d'asymétrie pourrait refléter les conditions spécifiques de l'habitat du poisson, telles que la température de l'eau, la salinité, ou encore la disponibilité alimentaire (PALMER et STROBECK, 1986). Il a été démontré que l'asymétrie entre les otolithes gauche et droit était potentiellement liée à l'environnement du poisson (ANDRIALOVANIRINA *et al.*, 2023a). Cela suggère que les variations environnementales peuvent induire des différences morphologiques entre les deux otolithes, qui ne sont pas toujours capturées lorsque l'on se concentre uniquement sur une analyse symétrique ou sur un seul côté. En intégrant l'analyse des deux otolithes dans l'étude de la forme, il est possible

de mieux comprendre les influences environnementales locales et de détecter des tendances morphologiques qui pourraient autrement passer inaperçues. De nouvelles tendances observées grâce à cette méthode pourraient inclure des variations fines de forme, qui révèlent comment différentes populations de poissons s'adaptent à leurs environnements spécifiques. Par exemple, les poissons vivant dans des habitats soumis à des fluctuations importantes pourraient présenter une asymétrie plus prononcée, tandis que ceux dans des environnements plus stables pourraient montrer une symétrie plus marquée entre leurs otolithes (KLINGENBERG, 2015).

L'analyse des formes des otolithes à partir des harmoniques de Fourier est largement utilisée en raison de sa capacité à décomposer les formes en séries de composantes sinusoïdales. Cette technique a produit des résultats notables dans la description des otolithes, enrichissant ainsi notre compréhension de leur morphologie et structure. Néanmoins, il faut admettre que l'analyse de Fourier peut être limitée dans sa capacité à saisir toutes les nuances localisées des formes des otolithes, surtout parce qu'elle convient mieux aux formes régulières ou périodiques (NEVES *et al.*, 2023). Pour les formes irrégulières ou complexes, d'autres méthodes d'analyse pourraient être complémentaires. Ainsi, pour mieux saisir la diversité des formes d'otolithes et affiner la précision de la classification, il serait judicieux de combiner les harmoniques de Fourier avec d'autres descripteurs de forme. Des techniques comme les ondelettes ou les descripteurs basés sur les points de repère pourraient fournir des alternatives viables.

L'analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée sur ces harmoniques de Fourier pour réduire le nombre de dimensions des données tout en explorant leur structure sous-jacente. Cette méthode est particulièrement appréciée pour sa capacité à identifier les directions de la plus grande variance dans les données, facilitant ainsi la visualisation et l'interprétation des relations linéaires entre les variables. Cependant, l'ACP présente certaines limitations lorsqu'il s'agit de capturer des relations non linéaires et complexes, souvent présentes dans les données biologiques comme celles concernant la forme des otolithes. Ces limitations peuvent conduire à une perte significative d'informations, réduisant ainsi la capacité à détecter des structures ou des motifs subtils dans les données (JOLLIFFE et CADIMA, 2016). À l'inverse, des méthodes récentes comme l'UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) ont été développées pour surmonter ces limitations. L'UMAP est une technique de réduction de dimensions qui excelle dans la capture des structures non linéaires des données en préservant autant que possible la proximité entre les points dans les espaces à haute et basse dimensions. Cette méthode est particulièrement efficace pour révéler des structures complexes, telles que des regroupements non linéaires ou des continuums, ce qui la rend potentiellement plus adaptée pour l'exploration des données morphométriques des otolithes, où les relations entre les variables peuvent être intrinsèquement non linéaires (MCINNES et HEALY, 2018). En préservant les relations de proximité et en révélant des motifs cachés, l'UMAP pourrait offrir une représentation plus fidèle de la complexité présente dans la forme de l'otolithe, facilitant ainsi l'identification des structures de population, des adaptations locales, ou des impacts environnementaux (BECHT *et al.*, 2018).

Les dynamiques migratoires (alimentation et reproduction) et environnementales (variation temporaire et saisonnière de paramètres environnementaux) compliquent la tâche de la délimitation des stocks halieutiques, car les individus d'une population donnée peuvent se déplacer loin de leur zone d'origine, interagir avec d'autres populations, et s'adapter à de nouvelles conditions environnementales. En conséquence, les méthodes traditionnelles de délimitation des stocks, basées sur des critères génétiques ou morphométriques simples, peuvent s'avérer insuffisantes pour capturer ces interactions complexes. Pour surmonter ces défis, il est crucial de développer des mé-

thodes plus robustes et adaptées aux particularités de chaque espèce et de chaque environnement. Une approche prometteuse consiste à utiliser des modèles spatio-temporels explicites, capables de prendre en compte la dynamique des mouvements et des interactions entre les populations au fil du temps. Ces modèles peuvent être couplés à des techniques avancées d'analyse des données, telles que l'apprentissage automatique ou les méthodes bayésiennes, pour mieux comprendre comment les stocks se structurent et évoluent en réponse aux migrations et aux fluctuations environnementales (CADRIN *et al.*, 2014; THORSON *et al.*, 2019; ICES, 2024). Cependant, pour valider ces approches, il est également important de les tester sur d'autres espèces de poissons présentant des caractéristiques écologiques et biologiques différentes. Par exemple, des poissons vivant dans des habitats plus confinés, avec des régimes alimentaires spécialisés ou une morphologie distincte, pourraient offrir des perspectives différentes sur la manière dont les stocks se forment et se maintiennent (BEGG et WALDMAN, 1999; BUSCHER *et al.*, 2016).

Les variations de forme 3D des otolithes sont-elles suffisamment robustes pour distinguer les espèces de poissons et comprendre leur écologie et écomorphologie ?

L'étude des variations de la forme 3D des otolithes représente une avancée significative pour la taxonomie et l'écologie des poissons. En tant que structures calcifiées, les otolithes enregistrent des informations détaillées sur l'histoire de vie des poissons, offrant ainsi une fenêtre unique sur les différences interspécifiques. Les analyses effectuées lors de cette thèse permettent non seulement de distinguer efficacement les espèces, mais également de mieux comprendre leur écologie et écomorphologie. Cependant, la question se pose de savoir si ces variations morphologiques sont suffisamment robustes pour refléter de manière fiable les différences écologiques et les stratégies adaptatives des espèces. Cette discussion explore la capacité des otolithes à servir d'indicateurs précis pour ces aspects clés de la biologie des poissons.

Effet de l'ontogénie sur la forme 3D des otolithes

L'étude de la forme 3D des otolithes a permis de mettre en évidence l'effet ontogénique, c'est-à-dire l'influence du développement de l'individu sur la morphologie des otolithes. La classification de plusieurs individus d'une même espèce a révélé une séparation claire entre les petits et les grands individus, montrant que l'effet ontogénique joue un rôle significatif dans la variation de la forme des otolithes. Ce résultat souligne l'importance de prendre en compte les effets ontogéniques lors de l'analyse morphométrique en 2D et 3D des otolithes, car ces effets peuvent masquer ou révéler des différences importantes entre les individus, en particulier dans les études de stock. Cela montre qu'il faut soit prendre en compte cet effet ontogénique dans les analyses soit se restreindre à des individus présentant un stade de vie similaire souvent représentés par une classe de taille restreinte.

L'analyse 3D semble offrir des avantages par rapport à l'analyse 2D en termes de captation d'informations morphologiques plus fines et complexes. Cette méthode pourrait permettre de quantifier et de décrire avec plus de précision les effets ontogéniques sur la forme des otolithes. Par conséquent, une meilleure évaluation de cet effet pourrait enrichir notre compréhension de la morphogénèse des otolithes en relation avec les comportements des poissons et leur adaptation à l'environ-

nement (CAMPANA et CASSELMAN, 1993). Puisque la forme de l'otolithe résulte de la génétique, de l'ontogénie et de l'environnement du poisson et que le facteur génétique a une influence plus localisée sur leur forme (VIGNON et MORAT, 2010), le facteur environnemental pourrait être isolé.

L'intégration de l'effet ontogénique dans l'analyse des otolithes soulève également la question de savoir si la forme 3D des otolithes pourrait être utilisée pour déterminer la maturité sexuelle des poissons. Étant donné que la maturité sexuelle varie souvent entre les sexes, comme observé chez la plie (*Pleuronectes platessa*), la morue (*Gadus morhua*), et le thon (*Thunnus thynnus*), où les femelles atteignent leur maturité sexuelle plus tardivement que les mâles (RIJNSDORP, 1989; ROOKER *et al.*, 2007; WRIGHT *et al.*, 2011), il est plausible que l'effet ontogénique sur la forme des otolithes diffère également selon le sexe.

Cette hypothèse est renforcée par les résultats sur la forme 3D des otolithes sur le rouget barbet de vase en Méditerranée où le sexe a montré un effet significatif. Cette hypothèse devra être confirmée dans le futur avec des tests supplémentaires sur un échantillon plus large d'individus, couvrant différentes tailles et stades de maturité sexuelle, pour mieux comprendre l'interaction entre l'effet ontogénique et le sexe sur la morphologie des otolithes. Si cette hypothèse est confirmée, il faudra tenir compte de cette interaction entre les 2 facteurs lorsqu'on réalisera des analyses. Des recherches supplémentaires pourraient explorer cette question scientifique, car en utilisant différentes espèces, plusieurs environnements et modes de vie pourront être testés. Une analyse plus détaillée, prenant en compte le stade de vie et le sexe, pourrait révéler des variations importantes qui contribuent à la différenciation plus robuste des stocks de poissons.

Classification des espèces et de leurs écomorphologies en utilisant la forme 3D de l'otolithe et ses perspectives

L'analyse de la forme 3D des otolithes offre des perspectives prometteuses pour l'identification des espèces de poissons et l'estimation de leurs traits de vie spécifiques. Les résultats du chapitre 4 montrent que la forme 3D des otolithes est extrêmement informative pour identifier les espèces de poissons. Les critères morphologiques telles que la convexité de la face interne proximale, la concavité de la face externe distale, et l'épaisseur mesurable, sont cruciaux pour cette identification. En particulier, la zone du *sulcus acusticus*, qui est centrale sur la face interne de l'otolithe, joue un rôle clé dans la discrimination des espèces. La diversité morphologique du *sulcus*, en termes de taille, de forme et de profondeur, ainsi que la présence de lobes sur la face externe, sont des marqueurs distinctifs qui permettent de différencier les espèces, même celles qui sont taxonomiquement proches (CAMPANA et CASSELMAN, 1993; MORALES-NIN *et al.*, 2022). L'analyse en composantes principales (ACP) utilisant les descripteurs de Fourier 3D individuels a permis de visualiser les différences et similitudes de forme entre les espèces. Les premiers axes graphiques (PC1 et PC2) révèlent que des caractéristiques spécifiques comme le *sulcus acusticus* et la zone du rostre et antirostre sont des critères essentiels pour la discrimination des espèces. Ces résultats sont cohérents avec les études antérieures qui ont démontré que la forme des otolithes est influencée par des facteurs phylogénétiques, environnementaux, et ontogéniques (VIGNON et MORAT, 2010). Toutefois, la visualisation des 2 premières PCs se révèle particulièrement performante pour distinguer les poissons ronds, dont la morphologie des otolithes est plus complexe par rapport aux poissons plats, qui ont des otolithes généralement plus simples. Cette complexité accrue dans la forme des otolithes des poissons ronds permet une meilleure classification et une distinction plus précise entre les espèces, ce qui est plus confus chez les poissons plats.

L'effet phylogénétique sur la forme des otolithes est également notable. L'analyse comparative de la classification hiérarchique basée sur la forme 3D des otolithes et la phylogénie a montré une bonne corrélation à différents niveaux taxonomiques, en particulier au niveau de l'ordre et de la famille. Cependant, certaines exceptions, comme les genres mélangés dans les Clupéiformes et Perciformes, indiquent que d'autres facteurs, tels que l'environnement ou les interactions écologiques, peuvent également jouer un rôle dans la variation de la forme des otolithes (CAMPANA et CASSELMAN, 1993). Cela suggère que, bien que la forme 3D des otolithes soit un indicateur fort de la phylogénie, elle doit être utilisée en conjonction avec d'autres données pour une identification précise des espèces. Des effets de l'environnement pourraient être un des facteurs qui modifient la forme de l'otolithe au sein d'une même espèce.

Le chapitre 4 a également exploré la possibilité d'identifier les traits écomorphologiques spécifiques des espèces à partir de la forme 3D de leurs otolithes. Les poissons démersaux et benthiques, qui dépendent davantage de l'audition que de la vision en raison des conditions de faible luminosité dans les habitats profonds, présentent des otolithes plus grands et plus complexes que les espèces pélagiques (CRUZ et LOMBARTE, 2004; LYCHAKOV et REBANE, 2005). Cette adaptation morphologique est liée à la nécessité d'une meilleure détection des sons et des vibrations dans des environnements où la visibilité est réduite. Les résultats de l'analyse en composantes principales, regroupant les espèces par morphotype (poissons ronds et plats) ou par habitat (pélagique, démersal et benthique), montrent que ces groupes se distinguent clairement par la forme de leurs otolithes. Cela indique que la forme 3D des otolithes est fortement influencée par l'écologie de l'espèce, ce qui renforce l'idée que l'écomorphologie des otolithes peut être un outil puissant pour comprendre les adaptations fonctionnelles des poissons à leur environnement (FEILICH et LÓPEZ-FERNÁNDEZ, 2019). Les traits liés à l'habitat et à la morphologie des nageoires caudales montrent des résultats particulièrement intéressants. Le degré d'importance (méthode SHAP) pour l'habitat est relativement bas (0,17), mais le taux de généralisation est l'un des plus élevés (92%), suggérant que, bien que l'habitat soit moins influant dans le modèle, il est prédictif de manière robuste lorsque l'information est présente. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les otolithes, en tant qu'organes de balance et d'audition, sont fortement influencés par les conditions environnementales dans lesquelles le poisson vit, et ces conditions sont souvent liées à des habitats spécifiques (CRUZ et LOMBARTE, 2004). De même, la forme de la nageoire caudale, avec un degré d'importance de 0,50 et un taux de prédiction en généralisation élevé de 90% à 100%, montre que ce trait morphologique est bien capturé par l'analyse de la forme 3D des otolithes. Les poissons avec des nageoires caudales effilées et fourchues, par exemple, sont souvent associés à des habitats nécessitant une grande vitesse de nage, comme les eaux à courants forts. La forme de la nageoire caudale est bien reflétée par la forme externe de l'otolithe.

Enfin, l'utilisation de la forme 3D des otolithes pour estimer les traits de vie des espèces montre un potentiel prometteur. L'analyse SHAP basée sur une forêt aléatoire a révélé que des traits comme le diamètre des œufs, la fécondité, et le rapport hauteur/surface de la nageoire caudale sont parmi les plus importants pour la classification et sont étroitement liés à la forme des otolithes. Avec une précision d'estimation supérieure à 75%, les résultats suggèrent que la forme 3D des otolithes pourrait être utilisée pour prédire certains traits de vie des poissons, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour la recherche en écomorphologie. Cependant, bien que ces traits montrent un taux moyen d'apprentissage élevé (autour de 81% à 83%), leur généralisation est plus faible, avec un taux moyen de généralisation de 56% à 57%. Cela suggère que, bien que la forme 3D des otolithes soit informative pour ces traits, la complexité des relations entre la morphologie des otolithes et ces caractéristiques

biologiques pourrait nécessiter des modèles plus sophistiqués ou des données supplémentaires pour améliorer la précision des prédictions (FEILICH et LÓPEZ-FERNÁNDEZ, 2019).

L'analyse 3D des otolithes ouvre la voie à des applications futures prometteuses, non seulement pour l'identification des espèces, mais également pour la caractérisation de leur écomorphologie et de leur écologie. En effet, les otolithes, en tant que pièces calcifiées qui enregistrent les conditions environnementales tout au long de la vie d'un poisson, offrent un potentiel considérable pour servir de proxy dans l'étude de la diversité fonctionnelle des espèces. Cette approche permettrait de relier directement la forme des otolithes aux traits d'histoire de vie individuels, aux comportements écologiques et à l'adaptation des espèces à leur environnement, offrant ainsi une perspective plus complète sur la diversité fonctionnelle au sein des écosystèmes aquatiques (FEILICH et LÓPEZ-FERNÁNDEZ, 2019). En outre, l'écomorphologie, qui examine les relations entre la forme des organismes et leurs fonctions écologiques, pourrait grandement bénéficier de l'utilisation des otolithes comme indicateurs morphologiques. Les poissons vivant dans des habitats variés, tels que les environnements benthiques, démersaux ou pélagiques, présentent des otolithes adaptés à leurs conditions de vie spécifiques. L'analyse 3D des otolithes pourrait ainsi fournir des informations détaillées sur la manière dont les poissons s'adaptent à leur environnement, constituant une nouvelle méthode pour étudier la diversité fonctionnelle et les stratégies de vie des espèces.

En parallèle, l'utilisation de la forme 3D des otolithes pour caractériser les milieux anthropisés ou pollués représente une approche innovante et prometteuse dans l'étude des impacts environnementaux sur les écosystèmes aquatiques. Les milieux anthropisés, comme les zones côtières industrialisées, les estuaires et les eaux intérieures soumises à des pressions humaines intenses, présentent souvent des conditions environnementales dégradées. Ces conditions peuvent influencer la morphogenèse des otolithes, modifiant leur croissance, leur forme et leur composition chimique. Par exemple, l'exposition à des métaux lourds, à des polluants organiques persistants ou à d'autres contaminants peut entraîner des anomalies dans la structure des otolithes, visibles dans leur morphologie en 3D (SELLESLAGH *et al.*, 2016; MOUNICOU *et al.*, 2019). Ainsi, la forme des otolithes pourrait être utilisée comme un biomarqueur pour évaluer la qualité de l'habitat et la santé des populations de poissons dans les zones polluées. Des études ont montré que les poissons vivant dans des environnements pollués peuvent présenter des otolithes avec des formes anormales ou des croissances asymétriques, reflétant le stress chronique auquel ils sont soumis (PALMER *et al.*, 2010; DÍAZ-GIL *et al.*, 2015; LOEPPKY *et al.*, 2021; JAWAD et MAHÉ, 2022). En caractérisant ces anomalies à travers l'analyse 3D, il devient possible d'évaluer non seulement l'exposition à la pollution, mais aussi les effets écotoxicologiques à long terme sur les populations de poissons. Des études expérimentales permettraient de calibrer les mesures *in situ* et les réponses des otolithes à perturbations de l'environnement. L'analyse 3D des otolithes offre également la possibilité de surveiller les réponses adaptatives des poissons à des environnements anthropisés. Dans les habitats modifiés par l'homme, tels que les zones urbaines ou les infrastructures portuaires, les conditions acoustiques peuvent être altérées, ce qui pourrait influencer la forme des otolithes en réponse aux nouvelles exigences en matière de détection sonore et d'équilibre (LARA *et al.*, 2022; WEI et MCCAULEY, 2022; JIANG *et al.*, 2024). Ainsi, la morphologie 3D des otolithes pourrait révéler comment les poissons s'adaptent à ces environnements acoustiques perturbés, offrant une nouvelle perspective sur les effets indirects de l'urbanisation et de l'industrialisation sur les écosystèmes aquatiques.

Références bibliographiques

- AFANASYEV, P. K., ORLOV, A. M. & ROLSKY, A. Y. (2017). Otolith shape analysis as a tool for species identification and studying the population structure of different fish species. *Biology Bulletin*, 44(8), 952-959. <https://doi.org/10.1134/s1062359017080027>
- AGIADI, K. (2022). The fossil otolith record of fishes (Vertebrata : Teleostei) in Greece. *Fossil Vertebrates of Greece Vol. 1* (p. 143-183). Springer International Publishing.
- ALLEMAND, D., MAYER-GOSTAN, N., DE PONTUAL, H., BOEUF, G. & PAYAN, P. (2007). Fish otolith calcification in relation to endolymph chemistry. *Handbook of Biomineralization*, 291-308. <https://doi.org/10.1002/9783527619443.ch17>
- ANDRIALOVANIRINA, N., POISSON CAILLAULT, É., COUETTE, S., LAFFONT, R., POLONI, L., LUTET-TOTI, C. & MAHÉ, K. (2023a). Asymmetry of sagittal otolith shape based on inner ear side tested on Mediterranean red mullet (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758) : comparative analysis of 2D and 3D otolith shape data. *Symmetry*, 15(5), 1067. <https://doi.org/10.3390/SYM15051067>
- ANDRIALOVANIRINA, N., HACHE, A., MAHÉ, K., COUETTE, S. & CAILLAULT, E. P. (2023b). Automatic method to transform routine otolith images for a standardized otolith database using R. *Cybium*, 47(1), 31-42. <https://doi.org/10.26028/cybium/2023-471-003>
- ANDRIALOVANIRINA, N., ROOS, D., GENTIL, C., TELLIEZ, S., DUSSUEL, A., ELLEBOODE, R., MACKENZIE, K., POISSON CAILLAULT, É., COUETTE, S. & MAHÉ, K. (2023c). Spatial structuring of the main demersal fish around Réunion Island (Western Indian Ocean) based on the external shape of their otoliths. *Cybium*, 47(1), 43-57. <https://doi.org/10.26028/CYBIUM/2023-471-004>
- ANDRIALOVANIRINA, N., POLONI, L., LAFFONT, R., POISSON CAILLAULT, É., COUETTE, S. & MAHÉ, K. (2024a). 3D meshes dataset of sagittal otoliths from red mullet in the Mediterranean Sea. *Scientific Data*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03641-1>
- ANDRIALOVANIRINA, N., POLONI, L., LAFFONT, R., POISSON CAILLAULT, E., COUETTE, S. & MAHÉ, K. (2024b). 3D otolith mesh dataset of red mullet (*Mullus barbatus*) in the Mediterranean Sea. *SEANOE*. <https://doi.org/10.17882/99980>
- ANDRIALOVANIRINA, N., LAFFONT, R., COUETTE, S., MATÉOS, A., MAHÉ, K. & POISSON CAILLAULT, E. (2024c). 3D sagittal otolith reconstruction from spherical Fourier descriptors. *RFIAP 2024, SSFAM (Société Savante Française d'Apprentissage Machine); AFRIF (Association Française pour la Reconnaissance et l'Interprétation des Formes), Lille, France. hal-04610027*.
- ANDRIALOVANIRINA, N., POISSON CAILLAULT, E. & MAHÉ, K. (2024d). Red mullet stock identification without any reference using otolith shape. *RFIAP 2024, SSFAM (Société Savante Française d'Apprentissage Machine); AFRIF (Association Française pour la Reconnaissance et l'Interprétation des Formes), Lille, France. hal-4610033*.
- ARAUJO, H. A., CANDY, J. R., BEACHAM, T. D., WHITE, B. & WALLACE, C. (2014). Advantages and challenges of genetic stock identification in fish stocks with low genetic resolution.

- Transactions of the American Fisheries Society*, 143(2), 479-488. <https://doi.org/10.1080/00028487.2013.855258>
- ARBELÁEZ, P., MAIRE, M., FOWLKES, C. & MALIK, J. (2011). Contour detection and hierarchical image segmentation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 33(5), 898-916. <https://doi.org/10.1109/tpami.2010.161>
- BAILEY, K. M., CIANNELLI, L., HUNSICKER, M., RINDORF, A., NEUENFELDT, S., MÖLLMANN, C., GUICHARD, F. & HUSE, G. (2010). Comparative analysis of marine ecosystems : workshop on predator–prey interactions. *Biology Letters*, 6(5), 579-581. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0326>
- BAO, B., KE, Z., XING, J., PEATMAN, E., LIU, Z., XIE, C., XU, B., GAI, J., GONG, X., YANG, G., JIANG, Y., TANG, W. & REN, D. (2011). Proliferating cells in suborbital tissue drive eye migration in flatfish. *Developmental Biology*, 351(1), 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.12.032>
- BEACHAM, T. D., SATO, S., URAWA, S., LE, K. & WETKLO, M. (2008). Population structure and stock identification of chum salmon *Oncorhynchus keta* from Japan determined by microsatellite DNA variation. *Fisheries Science*, 74(5), 983-994. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2008.01616.x>
- BEACHAM, T. D., JONSEN, K., SUTHERLAND, B. J., RAMSHAW, B. & RONDEAU, E. B. (2022). Parentage-based tagging and genetic stock identification applied to assessment of mixed-stock fisheries and hatchery broodstocks for Chinook salmon in British Columbia, Canada. *Fisheries Research*, 253, 106369. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2022.106369>
- BECHT, E., MCINNES, L., HEALY, J., DUTERTRE, C.-A., KWOK, I. W. H., NG, L. G., GINHOUX, F. & NEWELL, E. W. (2018). Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nature Biotechnology*, 37(1), 38-44. <https://doi.org/10.1038/nbt.4314>
- BEGG, G., OVERHOLTZ, W. & MUNROE, N. (2001). The use of internal otolith morphometrics for identification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) stocks on Georges Bank. *Fishery Bulletin*, 99(1). Récupérée 3 janvier 2023, à partir de <https://www.semanticscholar.org/paper/The-use-of-internal-otolith-morphometrics-for-of-on-Begg-Overholtz/15cdc5e6eafea7007fc6abca1385a400e8835194>
- BEGG, G. A. & WALDMAN, J. R. (1999). An holistic approach to fish stock identification. *Fisheries Research*, 43(1), 35-44. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(99\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(99)00065-X)
- BEGG, G. A. & BROWN, R. W. (2000). Stock identification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) Georges bank based on otolith shape analysis. *Transactions of the American Fisheries Society*, 129(4), 935-945.
- BEIER, M., ANKEN, R. H. & RAHMANN, H. (2002). Susceptibility to abnormal (kinetotic) swimming fish correlates with inner ear carbonic anhydrase-reactivity. *Neuroscience Letters*, 335(1), 17-20. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01151-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01151-5)
- BENNETT, A., PATIL, P., KLEISNER, K., RADER, D., VIRDIN, J. & BASURTO, X. (2018). *Contribution of fisheries to food and nutrition security : current knowledge, policy, and research*. <https://wfpc.sanford.duke.edu/reports/contribution-fisheries-food-nutrition-security-current-knowledge-policy-and-research/>.
- BENSON, I. M., HELSER, T. E., MARCHETTI, G. & BARNETT, B. K. (2023). The future of fish age estimation : deep machine learning coupled with Fourier transform near-infrared spectroscopy of otoliths [Publisher : NRC Research Press]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 80(9), 1482-1494. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2023-0045>

- BEN-TUVIA, A. (1990). Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). In I. J. C. QUERO, J. C. HUREAU, C. KARRER, A. POST & L. SALDANHA (Éd.), *Mullidae* (p. 827-829). JNICT.
- BENZER, S., GARABAGHI, F. H., BENZER, R. & MEHR, H. D. (2022). Investigation of some machine learning algorithms in fish age classification. *Fisheries Research*, 245, 106151. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2021.106151>
- BENZINOU, A., CARBINI, S., NASREDDINE, K., ELLEBOODE, R. & MAHÉ, K. (2013). Discriminating stocks of striped red mullet (*Mullus surmuletus*) in the Northwest European Seas using three automatic shape classification methods. *Fisheries Research*, 143, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.01.015>
- BERG, F., ØSTGAARD, H. D., SLOTTE, A., ANDERSSON, L. & FOLKVORD, A. (2021). A combination of genetic and phenotypic characterization of spring- and autumn-spawning herring suggests gene flow between populations. *ICES Journal of Marine Science*, 78(2), 694-703. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsaa046>
- BEUKHOF, E., DENCKER, T. S., PALOMARES, M. L. D. & MAUREAUD, A. (2019). A trait collection of marine fish species from North Atlantic and Northeast Pacific continental shelf seas. <https://doi.org/10.1594/PANGAEA.900866>
- BIOLÉ, F. G., THOMPSON, G. A., VARGAS, C. V., LEISEN, M., BARRA, F., VOLPEDO, A. V. & AVIGLIANO, E. (2019). Fish stocks of *Urophycis brasiliensis* revealed by otolith fingerprint and shape in the Southwestern Atlantic Ocean. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 229(106406), 106406.
- BIRD, J. L., EPPLER, D. T. & CHECKLEY JR., D. M. (1986). Comparisons of herring otoliths using fourier series shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43(6), 1228-1234. <https://doi.org/10.1139/f86-152>
- BLAKE, R. W. (2004). Fish functional design and swimming performance. *Journal of Fish Biology*, 65(5), 1193-1222.
- BLOCK, B. A., JONSEN, I. D., JORGENSEN, S. J., WINSHIP, A. J., SHAFFER, S. A., BOGRAD, S. J., HAZEN, E. L., FOLEY, D. G., BREED, G. A., HARRISON, A.-L., GANONG, J. E., SWITHENBANK, A., CASTLETON, M., DEWAR, H., MATE, B. R., SHILLINGER, G. L., SCHAEFER, K. M., BENSON, S. R., WEISE, M. J., ... COSTA, D. P. (2011). Tracking apex marine predator movements in a dynamic ocean. *Nature*, 475(7354), 86-90. <https://doi.org/10.1038/nature10082>
- BONHOMME, V., PICQ, S., GAUCHEREL, C. & CLAUDE, J. (2014). Momocs : outline analysis using r. *Journal of Statistical Software*, 56, 1-24. <https://doi.org/10.18637/jss.v056.i13>
- BOOKE, H. E. (1981). The Conundrum of the stock concept—Are nature and nurture definable in fishery science? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(12), 1479-1480. <https://doi.org/10.1139/f81-200>
- BOOKSTEIN, F. L. (1992). *Morphometric tools for landmark data : Geometry and biology*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511573064>
- BOSTANCI, D., YILMAZ, M., YEDIER, S., KURUCU, G., KONTAS, S., DARÇIN, M. & POLAT, N. (2016). Sagittal otolith morphology of sharpnose seabream *Diplodus puntazzo* (Walbaum, 1792) in the Aegean Sea. *International Journal of Morphology*, 34(2), 484-488. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022016000200012>
- BRADLEY, D. & ROTH, G. (2007). Adaptive thresholding using the integral image. *Journal of Graphics Tools*, 12(2), 13-21. <https://doi.org/10.1080/2151237x.2007.10129236>

- BURR, M. L. (1992). Fish food, fish oil and cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Hypertension. Part A : Theory and Practice*, 14(1–2), 181-192. <https://doi.org/10.3109/10641969209036181>
- BURT, P. & ADELSON, E. (1983). The Laplacian pyramid as a compact image code. *IEEE Transactions on Communications*, 31(4), 532-540. <https://doi.org/10.1109/tcom.1983.1095851>
- BUSCHER, E., OLSON, A. M., PASCOE, E. S., WEIL, J. & JUANES, F. (2016). David H. Secor : Migration ecology of marine fishes : John Hopkins University Press, Baltimore, 2015, 292 pp, ISBN : 9781421416120. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 26(3), 609-610. <https://doi.org/10.1007/s11160-016-9423-4>
- CADRIN, S. X., KERR, L. & MARIANI, S. (2014). *Stock identification methods : Applications in fishery science (Second Edition)*.
- CADRIN, S. X. & FRIEDLAND, K. D. (1999). The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification. *Fisheries Research*, 43(1), 129-139. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(99\)00070-3](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(99)00070-3)
- CADRIN, S. X. & DICKEY-COLLAS, M. (2015). Stock assessment methods for sustainable fisheries. *ICES Journal of Marine Science*, 72(1), 1-6. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsu228>
- CADRIN, S. X. (2020). Defining spatial structure for fishery stock assessment. *Fisheries Research*, 221, 105397. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2019.105397>
- CAMPANA, S. E. & CASSELMAN, J. M. (1993). Stock discrimination using otolith shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(5), 1062-1083. <https://doi.org/10.1139/f93-123>
- CAMPANA, S. E. (2004). *Photographic Atlas of Fish Otoliths of the Northwest Atlantic Ocean*. National Research Council Canada Research Press.
- CAMPANA, S. E. & THORROLD, S. R. (2001). Otoliths, increments, and elements : keys to a comprehensive understanding of fish populations ? [Publisher : NRC Research Press]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(1), 30-38. <https://doi.org/10.1139/f00-177>
- CAMPANA, S. E. (2005). Otolith science entering the 21st century. *Marine and Freshwater Research*, 56(5), 485.
- CAÑÁS, L., STRANSKY, C., SCHLICKEISEN, J., SAMPEDRO, M. P. & FARIÑA, A. C. (2012). Use of the otolith shape analysis in stock identification of anglerfish (*Lophius piscatorius*) in the Northeast Atlantic. *ICES Journal of Marine Science*, 69(2), 250-256. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fss006>
- CANNY, J. (1986). A computational approach to edge detection. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, PAMI-8(6), 679-698. <https://doi.org/10.1109/tpami.1986.4767851>
- CARDINALE, M., DOERING-ARJES, P., KASTOWSKY, M. & MOSEGAARD, H. (2004). Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61(2), 158-167. <https://doi.org/10.1139/f03-151>
- CARDINALE, M. & ARRHENIUS, F. (2004). Using otolith weight to estimate the age of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) : a tree model application. *Journal of Applied Ichthyology*, 20(6), 470-475. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2004.00576.x>
- CARVALHO, G., BEMBO, D., CARONE, A., GIESBRECHT, G., CINGOLANI, N. & PITCHER, T. (1994). Stock discrimination in relation to the assessment of Adriatic anchovy and sar-

- dine fisheries. *Final Project Report to the Commission of the European Communities, EC XVI/MED/91001/A*.
- CARVALHO, G. & HAUSER, L. (1995). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. In : Molecular genetics in fisheries. *G.R. Cavalho, T.J. Pitcher (Eds.). Chapman and Hall : Melbourne, 55-80.*
- CASSELMAN, J. (1987). Determination of age and growth. In : *A.H. Weatherly and H.S. Gill (Eds.) The Biology of Fish Growth. New York, NY, USA : Academic Press.*
- CASTONGUAY, M., SIMARD, P. & GAGNON, P. (1991). Usefulness of Fourier analysis of otolith shape for Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) stock discrimination [Publisher : NRC Research Press]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 48(2), 296-302.* <https://doi.org/10.1139/f91-041>
- CHAMBEL, J., SEVERIANO, V., BAPTISTA, T., MENDES, S. & PEDROSA, R. (2015). Effect of stocking density and different diets on growth of Percula Clownfish, *Amphiprion percula* (Lacepede, 1802). *SpringerPlus, 4(1).* <https://doi.org/10.1186/s40064-015-0967-x>
- CHOLLET-VILLALPANDO, J. G., GARCÍA-RODRÍGUEZ, F. J., DE LUNA, E. & DE LA CRUZ-AGÜERO, J. (2019). Geometric morphometrics for the analysis of character variation in size and shape of the *sulcus acusticus* of *sagittae* otolith in species of gerreidae (teleostei : perciformes). *Marine Biodiversity, 49(5), 2323-2332.* <https://doi.org/10.1007/s12526-019-00970-y>
- CHRISTENSEN, J. M. (1964). Burning of otoliths, a technique for age determination of soles and other fish. *ICES Journal of Marine Science, 29(1), 73-81.* <https://doi.org/10.1093/icesjms/29.1.73>
- CLEMENTO, A. J., CRANDALL, E. D., GARZA, J. C. & ANDERSON, E. C. (2014). Evaluation of a single nucleotide polymorphism baseline for genetic stock identification of Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in the California Current large marine ecosystem. *Fishery Bulletin, 112(2-3), 112-130.* <https://doi.org/10.7755/fb.112.2-3.2>
- COMPAGNUCCI, C., FISH, J. & DEPEW, M. J. (2014). Left–right asymmetry of the gnathostome skull : Its evolutionary, developmental, and functional aspects. *genesis, 52(6), 515-527.* <https://doi.org/10.1002/dvg.22786>
- CRUZ, A. & LOMBARTE, A. (2004). Otolith size and its relationship with colour patterns and sound production. *Journal of Fish Biology, 65(6), 1512-1525.*
- DAGET, J. & LE GUEN. (1975). Dynamique des populations exploitées de poissons et problèmes d'écologie. *Écologie des populations et des peuplements, by R. Barbault, 1981, Masson, Paris, 200 pp.*
- DE PONTUAL, H. & PROUZET, P. (1988). Numerical analysis of scale morphology to discriminate between atlantic salmon stocks. *Aquatic Living Resources, 1(1), 17-27.*
- DEMARTINI, E. E. (2016). Body size at sexual maturity in the eteline snappers *Etelis carbunculus* and *Pristipomoides sieboldii* : subregional comparisons between the main and north-western hawaiian islands. *Marine and Freshwater Research, 68(6), 1178-1186.* <https://doi.org/10.1071/MF16174>
- DENG, X., WAGNER, H.-J. & POPPER, A. N. (2011). The inner ear and its coupling to the swim bladder in the deep-sea fish *Antimora rostrata* (Teleostei : Moridae). *Deep Sea Research Part I : Oceanographic Research Papers, 58(1), 27-37.* <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2010.11.001>

- DÍAZ-GIL, C., PALMER, M., CATALÁN, I. A., ALÓS, J., FUIMAN, L. A., GARCÍA, E., GIL, M. d. M., GRAU, A., KANG, A., MANEJA, R. H., MOHAN, J. A., MORRO, B., SCHAFFLER, J. J., BUTTAY, L., RIERA-BATLE, I., TOLOSA, B. & MORALES-NIN, B. (2015). Otolith fluctuating asymmetry : a misconception of its biological relevance? *ICES Journal of Marine Science*, 72(7), 2079-2089. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsv067>
- D'IGLIO, C., FAMULARI, S., ALBANO, M., CARNEVALE, A., FRESCO, D. D., COSTANZO, M., LANTERI, G., SPANÒ, N., SAVOCA, S. & CAPILLO, G. (2023). Intraspecific variability of the saccular and utricular otoliths of the hatchetfish *Argyropelecus hemigymnus* (Cocco, 1829) from the strait of messina (central mediterranean sea) [Publisher : Public Library of Science]. *PLoS ONE*, 18(2), e0281621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281621>
- DISSPAIN, M. C. F., ULM, S. & GILLANDERS, B. M. (2016). Otoliths in archaeology : Methods, applications and future prospects. *Journal of Archaeological Science : Reports*, 6, 623-632.
- DUAN, Y., LI, D., STIEN, L. H., FU, Z., WRIGHT, D. W. & GAO, Y. (2019). Automatic segmentation method for live fish eggs microscopic image analysis. *Aquacultural Engineering*, 85, 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2019.01.004>
- DUARTE-NETO, P., LESSA, R., STOSIC, B. & MORIZE, E. (2008). The use of sagittal otoliths in discriminating stocks of common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) off northeastern Brazil using multishape descriptors. *ICES Journal of Marine Science*, 65(7), 1144-1152. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsn090>
- DUNKELBERGER, D. G., DEAN, J. M. & WATABE, N. (1980). The ultrastructure of the otolithic membrane and otolith in the juvenile mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Morphology*, 163(3), 367-377. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051630309>
- EASEY, M. W. & MILLNER, R. S. (2008). Improved methods for the preparation and staining of thin sections of fish otoliths for age determination. *Science Series Technical Report no.143*, 16.
- FAHMI, S. S., PONOMAREV, N. A. & HO, M. T. M. (2023). Using morphological transformations to recognize ships and vessels. *LETI Transactions on Electrical Engineering and Computer Science*, 16(8), 50-56. <https://doi.org/10.32603/2071-8985-2023-16-8-50-56>
- FAO. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020* (Sustainability in action). FAO. <https://doi.org/10.4060/ca9229fr>
- FEILICH, K. L. & LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H. (2019). When does form reflect function? Acknowledging and supporting ecomorphological assumptions. *Integrative and Comparative Biology*, 59(2), 358-370. <https://doi.org/10.1093/icb/icz070>
- FISCHER, A. & THOMPSON, B. (2004). The age and growth of southern flounder, *Paralichthys lethostigma*, from Louisiana estuarine and offshore waters. *Bulletin of Marine Science*, 75, 63-77.
- FISHER, M. & HUNTER, E. (2018). Digital imaging techniques in otolith data capture, analysis and interpretation. *Marine Ecology Progress Series*, 598, 213-231. <https://doi.org/10.3354/meps12531>
- FOLMSBEE, J., JOHNSON, S., LIU, X., BRANDWEIN-WEBER, M. & DOYLE, S. (2019). Fragile neural networks : the importance of image standardization for deep learning in digital pathology. In J. E. TOMASZEWSKI & A. D. WARD (Éd.), *Medical Imaging 2019 : Digital Pathology*. SPIE. <https://doi.org/10.1117/12.2512992>
- FOSSEN, I. (2003). Improving the precision of ageing assessments for long rough dab by using digitised pictures and otolith measurements. *Fisheries Research*, 60(1), 53-64.

- FOSSUM, P., KALISH, J. & MOKSNESS, E. (2000). 2nd International Symposium on Fish Otolith Research and Application, Bergen, Norway, 20-25 June 1998 [Issue : 1-3 Pages : 1–2 Publication Title : Fisheries Research]. *Fisheries Research*, 46(46), 373.
- FRANCIS, R. I. C. C., HARLEY, S. J., CAMPANA, S. E. & DOERING-ARJES, P. (2005). Use of otolith weight in length-mediated estimation of proportions at age. *Marine and Freshwater Research*, 56(5), 735. <https://doi.org/10.1071/mf04127>
- FRIEDMAN, M. (2008). The evolutionary origin of flatfish asymmetry. *Nature*, 454(7201), 209-212. <https://doi.org/10.1038/nature07108>
- FROESE, R. & PAULY, D. (2019). FishBase, version (02/2019) <https://fishbase.net.br>.
- GAGLIANO, M. & MCCORMICK, M. (2004). Feeding history influences otolith shape in tropical fish. *Marine Ecology Progress Series*, 278, 291-296. <https://doi.org/10.3354/meps278291>
- GAITHER, M. R., TOONEN, R. J., SORENSON, L. & BOWEN, B. W. (2010). Isolation and characterization of microsatellite markers for the crimson jobfish, *Pristipomoides filamentosus* (lutjanidae). *Conservation Genetics Resources*, 2(1), 169-172. <https://doi.org/10.1007/s12686-009-9119-3>
- GAITHER, M. R., JONES, S. A., KELLEY, C., NEWMAN, S. J., SORENSON, L. & BOWEN, B. W. (2011). High connectivity in the deepwater snapper *Pristipomoides filamentosus* (lutjanidae) across the indo-pacific with isolation of the hawaiian archipelago [Publisher : Public Library of Science]. *PLoS ONE*, 6(12), e28913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028913>
- GALLEY, E. A., WRIGHT, P. J. & GIBB, F. M. (2006). Combined methods of otolith shape analysis improve identification of spawning areas of Atlantic cod. *ICES Journal of Marine Science*, 63(9), 1710-1717. <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2006.06.014>
- GAULDIE, R. W. (1988). Tagging and genetically isolated stocks of fish : a test of one stock hypothesis and the development of another. *Journal of Applied Ichthyology*, 4, 168-73.
- GAULDIE, R. W. & NELSON, D. G. A. (1990). Otolith growth in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97(2), 119-135.
- GAULDIE, R. W. & CRAMPTON, J. S. (2002). An eco-morphological explanation of individual variability in the shape of the fish otolith : comparison of the otolith of *Hoplostethus atlanticus* with other species by depth. *Journal of Fish Biology*, 60(5), 1204-1221. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb01715.x>
- GERSTNER, C. L. (1999). Maneuverability of four species of coral-reef fish that differ in body and pectoral-fin morphology. *Canadian Journal of Zoology*, 77(7), 1102-1110.
- GIEC. (2021). *Changement climatique 2021 : les bases scientifiques physiques : résumé à l'intention des décideurs : contribution du groupe de travail I au sixième Rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat*. [publié sous la direction de Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, et B. Zhou]. Cambridge University Press. https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/downloads/report/IPCC_AR6_WG1_SPM_French.pdf.
- GILBEY, J., WENNEVIK, V., BRADBURY, I. R., FISKE, P., HANSEN, L. P., JACOBSEN, J. A. & POTTER, T. (2017). Genetic stock identification of Atlantic salmon caught in the Faroese fishery. *Fisheries Research*, 187, 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.11.020>
- GONÇALVES, P., MAHE, K., ELLEBOODE, R., CHANTRE, C., MURTA, A., AVILA DE MELO, A. & CABRAL, H. (2017). Blue whiting otoliths pair's symmetry side effect [Publisher : IJFAS].

- International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(3), 06-09. Récupérée 16 mars 2022, à partir de <https://archimer.ifremer.fr/doc/00388/49887/>
- GONZALEZ, R. C. & WOODS, R. E. (2018). *Digital image processing (4th Edition)*. Pearson.
- GOODFELLOW, I., POUGET-ABADIE, J., MIRZA, M., XU, B., WARDE-FARLEY, D., OZAIR, S., COURVILLE, A. & BENGIO, Y. (2020). Generative adversarial networks. *Communications of the ACM*, 63(11), 139-144. <https://doi.org/10.1145/3422622>
- GOSLINE, W. (1971). *A functional morphology and classification of teleostean fishes*. Honolulu, University Press of Hawaii.
- GRAF, W. & BAKER, R. (1983). Adaptive changes of the vestibulo-ocular reflex in flatfish are achieved by reorganization of central nervous pathways. *Science*, 221(4612), 777-779. <https://doi.org/10.1126/science.6603656>
- GRASSE, P. P. (1958). *L'oreille et ses annexes*. Traité de zoologie : anatomie, systématique, biologie. Agnathes et Poissons : anatomie, éthologie, systématique. Tome Xm (2), Masson, Paris.
- GREEN, A., MOSALIGANTI, K., SWINBURNE, I., OBHOLZER, N. & MEGASON, S. (2017). Recovery of shape and size in a developing organ pair. *Developmental Dynamics*, 246(6), 451-465. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24498>
- HARVEY, J., LOUGHLIN, T., PEREZ, M. & OXMAN, D. (2000). Relationship between fish size and otolith length for 63 species of fishes from the eastern north Pacific Ocean. *NOAA Technical Reports NMFS*, 150.
- HELLING, K., SCHERER, H., HAUSMANN, S. & CLARKE, A. (2005). Otolith mass asymmetries in the utricle and saccule of flatfish. *Journal of vestibular research : equilibrium and orientation*, 15, 59-64. <https://doi.org/10.3233/VES-2005-15201>
- HESS, J. E., WHITEAKER, J. M., FRYER, J. K. & NARUM, S. R. (2014). Monitoring stock-specific abundance, run timing, and straying of Chinook Salmon in the Columbia river using Genetic Stock Identification (GSI). *North American Journal of Fisheries Management*, 34(1), 184-201. <https://doi.org/10.1080/02755947.2013.862192>
- HIDALGO, M., HERNANDEZ, P., VASCONCELLOS, M., NADAL, I., SANCHEZ-GARRIDO, J., CARIANI, A., JOHNSTONE, C., MOKHTAR-JAMAI, K., PÉREZ, M., CORTI, R., FERRARI, A., NANDE, M., PIAZZA, E., PEREZ-SANCHEZ, T., SPIGA, M., VILAS, N., GAAMOUR, A., KHEMIRI, S., NAVA, E. & RODRIGUEZ, J. (2024). *Transboundary population structure of sardine, European hake and blackspot seabream in the Alboran Sea and adjacent waters : A multidisciplinary approach*. Studies; reviews (General Fisheries Commission for the Mediterranean). <https://doi.org/10.4060/cd1122en>
- HILBIG, R., KNIE, M., SHCHERBAKOV, D. & ANKEN, R. H. (2011). Analysis of behaviour and habituation of fish exposed to diminished gravity in correlation to inner ear stone formation- A sounding rocket experiment (TEXUS 45). *Proceedings of the 20th ESA Symposium on Europe Rocket and Balloon Programmes and Related Research, 22-26 May 2011, Hyere, France*.
- HILBORN, R. & WALTERS, C. (2001). Quantitative fisheries stock assessment, choice, dynamics and uncertainty. *Kluwer Academic Publishers Group*, 570.
- HILBORN, R. & WALTERS, C. J. (2013, décembre 1). *Quantitative fisheries stock assessment : choice, dynamics and uncertainty* [Google-Books-ID : Y0EGCAAQBAJ]. Springer Science & Business Media.

- HOLUB, D. & HOLUB, B. (2004). Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263(1/2), 217-225. <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000041863.11248.8d>
- HOUETO, M. F. A., SOUNOUVOU, M., TAZARKI, M., ANDRIALOVANIRINA, N., GHORBEL, M. B., MEJRI, M., DOSSOU-YOVO, P., CHALH, A., QUIGNARD, J. P., MAHÉ, K. & TRABELSI, M. (2024a). Analysis of otolith shape as a tool for discriminating stocks of Cassava croaker (*Pseudotolithus senegalensis*) in Beninese waters. *Open Journal of Marine Science (article accepté)*.
- HOUETO, M. F. A., MEJRI, M., TAZARKI, M., SOUNOUVOU, M., ANDRIALOVANIRINA, N., GHORBEL, M. B., DOSSOU-YOVO, P., CHALH, A., QUIGNARD, P., TRABELSI, M. & MAHÉ, K. (2024b). Fluctuating asymmetry of *Elopes lacerta* (Valenciennes, 1847) otoliths in the western African waters. *Open Journal of Marine Science*, 14(03), 41-62. <https://doi.org/10.4236/ojms.2024.143003>
- HUET, E. (2024). Etude de l'effet de la complexité structurale de l'environnement sur la morphologie de l'otolithe sacculaire du tilapia *Oreochromis niloticus*. Rapport de Master. Univ. Liège. <http://hdl.handle.net/2268.2/19400>.
- HUNSICKER, M. E., CIANNELLI, L., BAILEY, K. M., BUCKEL, J. A., WILSON WHITE, J., LINK, J. S., ESSINGTON, T. E., GAICHAS, S., ANDERSON, T. W., BRODEUR, R. D., CHAN, K.-S., CHEN, K., ENGLUND, G., FRANK, K. T., FREITAS, V., HIXON, M. A., HURST, T., JOHNSON, D. W., KITCHELL, J. F., ... ZADOR, S. (2011). Functional responses and scaling in predator-prey interactions of marine fishes : contemporary issues and emerging concepts : Predator-prey interactions in marine systems. *Ecology Letters*, 14(12), 1288-1299. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01696.x>
- HÜSSY, K. (2008). Otolith shape in juvenile cod (*Gadus morhua*) : ontogenetic and environmental effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 364(1), 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.06.026>
- IBÁÑEZ, A. L., HERNÁNDEZ-FRAGA, K. & ALVAREZ-HERNÁNDEZ, S. (2017). Discrimination analysis of phenotypic stocks comparing fish otolith and scale shapes. *Fisheries Research*, 185, 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.09.025>
- ICES. (2011). Report of the Workshop of National Age Readings Coordinators (WKNARC). 5-9 September 2011, Boulogne-sur-Mer, France. *ICES CM 2011/ACOM :45*, 175.
- ICES. (2020). Stock Identification Methods Working Group. *ICES Scientific Reports*, 2(94), 38. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.7485>
- ICES. (2024). Stock Identification Methods Working Group (SIMWG). *ICES Scientific Reports*, 4(72), 66. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.20937001>
- INOUE, M., TANIMOTO, M. & ODA, Y. (2013). The role of ear stone size in hair cell acoustic sensory transduction. *Scientific Reports*, 3(1), 2114.
- IWATA, H. (2002). SHAPE : A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on Elliptic Fourier Descriptors. *Journal of Heredity*, 93(5), 384-385. <https://doi.org/10.1093/jhered/93.5.384>
- IZZO, C., REIS-SANTOS, P. & GILLANDERS, B. M. (2018). Otolith chemistry does not just reflect environmental conditions : A meta-analytic evaluation. *Fish and Fisheries*, 19(3), 441-454. <https://doi.org/10.1111/faf.12264>

- JAWAD, L. & MAHÉ, K. (2022). Fluctuating asymmetry in *Asteriscii* otoliths of common carp (*Cyprinus carpio*) collected from three localities in Iraqi rivers linked to environmental factors. *Fishes*, 7(2), 91. <https://doi.org/10.3390/fishes7020091>
- JAWAD, L. A., SHAMSAN, E. F., AGUILAR, G. & HOEDEMAKERS, K. (2023). Scanning electron microscopy and morphological analysis reveal differences in the otolith morphology of three species of the family Lethrinidae (Teleostei : Perciformes) from Yemen. *Anat. Rec. (Hoboken)*, 306(3), 651-664.
- JEMAA, S., BACHA, M., KHALAF, G., DESSAILLY, D., RABHI, K. & AMARA, R. (2015). What can otolith shape analysis tell us about population structure of the European sardine, *Sardina pilchardus*, from Atlantic and Mediterranean waters ? *Journal of Sea Research*, 96, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2014.11.002>
- JIANG, Q., LIANG, X., YE, T., ZHANG, Y. & LOU, B. (2024). Metabonomics and transcriptomics analyses reveal the development process of the auditory system in the embryonic development period of the small yellow croaker under background noise. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4), 1954. <https://doi.org/10.3390/ijms25041954>
- JOLLIFFE, I. T. & CADIMA, J. (2016). Principal component analysis : a review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2065), 20150202. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>
- JORDE, P. E., KLEIVEN, A. R., SODELAND, M., OLSEN, E. M., FERTER, K., JENTOFT, S. & KNUTSEN, H. (2018). Who is fishing on what stock : population-of-origin of individual cod (*Gadus morhua*) in commercial and recreational fisheries (W. S. GRANT, Éd.). *ICES Journal of Marine Science*, 75(6), 2153-2162. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsy080>
- KADAGI, I. (2011). East Africa billfish conservation and research : Marlin, sailfish and swordfish mark-recapture field studies. Report No. IOTC-2011-WPB0910. Victoria, Seychelles : Indian Ocean Tuna Commission. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.36027.98083>
- KALISH, J., BEAMISH, R., CASSELMAN, J., FRANCIS, R., MOSEGAARD, H., PANFILI, J., PRINCE, E., THRESHER, R., WILSON, C. & WRIGHT, P. (1995). *Glossary for otolith studies*. University of South Carolina.
- KEAT-CHUAN NG, C., AUN-CHUAN OOI, P., WONG, W. L. & KHOO, G. (2017). A review of fish taxonomy conventions and species identification techniques. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 4, 54-93. <https://doi.org/10.18331/SFS2017.4.1.6>
- KELLER, S., QUETGLAS, A., PUERTA, P., BITETTO, I., CASCIARO, L., CUCCU, D., ESTEBAN, A., GARCIA, C., GAROFALO, G., GUIJARRO, B., JOSEPHIDES, M., JADAUD, A., LEFKADITOU, E., MAIORANO, P., MANFREDI, C., MARCETA, B., MICALLEF, R., PERISTERAKI, P., RELINI, G., ... HIDALGO, M. (2017). Environmentally driven synchronies of Mediterranean cephalopod populations. *Progress in Oceanography*, 152, 1-14. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:90030023>
- KLINGENBERG, C. (2015). Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics : Concepts, methods, and applications. *Symmetry*, 7(2), 843-934. <https://doi.org/10.3390/sym7020843>
- KUHL, F. P. & GIARDINA, C. R. (1982). Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing*, 18(3), 236-258. [https://doi.org/10.1016/0146-664X\(82\)90034-X](https://doi.org/10.1016/0146-664X(82)90034-X)

- LAGARDÈRE, F. & TROADEC, H. (1997). Age estimation in common sole *Solea solea* larvae : validation of daily increments and evaluation of a pattern recognition technique. *Marine Ecology Progress Series*, 155, 223-237.
- LARA, R. A., BREITZLER, L., LAU, I. H., GORDILLO-MARTINEZ, F., CHEN, F., FONSECA, P. J., BASS, A. H. & VASCONCELOS, R. O. (2022). Noise-induced hearing loss correlates with inner ear hair cell decrease in larval zebrafish. *Journal of Experimental Biology*, 225(7). <https://doi.org/10.1242/jeb.243743>
- LAUDER, G. V. (1989). Caudal fin locomotion in ray-finned fishes : Historical and functional analyses. *American Zoologist*, 29(1), 85-102.
- LAUREC, A. & LE GUEN, J. (1981). Dynamique des populations marines exploitées. Tome I concepts et modèles. *Publications du Centre national pour l'exploitation des océans. Rapports scientifiques et techniques Brest*, 45, 117.
- LECUN, Y. A., BOTTOU, L., ORR, G. B. & MÜLLER, K.-R. (2012). Efficient BackProp. *Neural Networks : Tricks of the Trade* (p. 9-48). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35289-8_3
- LEE, H., TAJMIR, S., LEE, J., ZISSEN, M., YESHIWAS, B. A., ALKASAB, T. K., CHOY, G. & DO, S. (2017). Fully automated deep learning system for bone age assessment. *Journal of Digital Imaging*, 30(4), 427-441. <https://doi.org/10.1007/s10278-017-9955-8>
- LI, W., ZHANG, C., TIAN, Y., LIU, Y., LIU, S., TIAN, H. & CAO, C. (2021). Otolith shape analysis as a tool to identify two pacific saury (*Cololabis saira*) groups from a mixed stock in the high-seas fishing ground. *Journal of Ocean University of China*, 20(2), 402-408. <https://doi.org/10.1007/s11802-021-4541-6>
- LIBUNGAN, L. A., ÓSKARSSON, G. J., SLOTTE, A., JACOBSEN, J. A. & PÁLSSON, S. (2015). Otolith shape : a population marker for Atlantic herring *Clupea harengus*. *Journal of Fish Biology*, 86(4), 1377-1395. <https://doi.org/10.1111/jfb.12647>
- LIBUNGAN, L. A. & PÁLSSON, S. (2015). ShapeR : an R package to study otolith shape variation among fish populations [Publisher : Public Library of Science]. *PLoS ONE*, 10(3), e0121102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121102>
- LIU, Y. & SRIHARI, S. (1997). Document image binarization based on texture features. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 19(5), 540-544. <https://doi.org/10.1109/34.589217>
- LLEONART, J., J., S. & TORRES, G. (2000). Removing allometric effects of body size in morphological analysis. *Journal of Theoretical Biology*, 205(1), 85-93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jtbi.2000.2043>
- LOEPPKY, A. R., BELDING, L. D., QUIJADA-RODRIGUEZ, A. R., MORGAN, J. D., PRACHEIL, B. M., CHAKOUMAKOS, B. C. & ANDERSON, W. G. (2021). Influence of ontogenetic development, temperature, and $p\text{CO}_2$ on otolith calcium carbonate polymorph composition in sturgeons. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93197-6>
- LOMBARTE, A., TORRES, G. J. & MORALES-NIN, B. (2003). Specific *Merluccius* otolith growth patterns related to phylogenetics and environmental factors. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83(2), 277-281. <https://doi.org/10.1017/S0025315403007070h>
- LOMBARTE, A. & CRUZ, A. (2007). Otolith size trends in marine fish communities from different depth strata. *Journal of Fish Biology*, 71(1), 53-76.

- LOMBARTE, A. & LLEONART, J. (1993). Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. *Environmental Biology of Fishes*, 37(3), 297-306. <https://doi.org/10.1007/BF00004637>
- LÓPEZ-ESCÁMEZ, J. A., CRESPO, P. V., CAÑIZARES, F. J. & CAMPOS, A. (1993). Standards for quantification of elements in the otolithic membrane by electron probe X-ray microanalysis : Calibration curves and electron beam sensitivity. *Journal of Microscopy*, 171(3), 215-222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03378.x>
- LOWRY, M. S. (2011). *Photographic catalog of California marine fish otoliths : prey of California Sea lions (Zalophus californianus)* (rapp. tech.). NOAA Technical Memorandum NMFS NOAA-TM-NMFSSWFSC-483, <https://swfsc-publications.fisheries.noaa.gov/publications/TM/SWFSC/NOAA-TM-NMFS-SWFSC-483.pdf>.
- LYCHAKOV, D. V. & REBANE, Y. T. (2005). Fish otolith mass asymmetry : morphometry and influence on acoustic functionality. *Hearing Research*, 201(1), 55-69. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2004.08.017>
- LYCHAKOV, D. V., REBANE, Y. T., LOMBARTE, A., DEMESTRE, M. & FUIMAN, L. A. (2008). Saccular otolith mass asymmetry in adult flatfishes. *Journal of Fish Biology*, 72(10), 2579-2594. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01869.x>
- MADIN, E. M. P., DILL, L. M., RIDLON, A. D., HEITHAUS, M. R. & WARNER, R. R. (2015). Human activities change marine ecosystems by altering predation risk. *Global Change Biology*, 22(1), 44-60. <https://doi.org/10.1111/gcb.13083>
- MAHÉ, K., BELLAIL, R., DUFOUR, J.-L., BOIRON-LEROY, A., DIMEET, J., DUHAMEL, E., ELLEBOODE, R., FELIX, J., GRELLIER, P., HUET, J., LABASTIE, J., LE ROY, D., LIZAUD, O., MANTEN, M.-L., MARTIN, S., METRAL, L., NEDELEC, D., VERIN, Y. & BADTS, V. (2009). French summary of age estimation procedures, 79. Récupérée 17 janvier 2022, à partir de <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/7294/>
- MAHÉ, K., COPPIN, F., VAZ, S. & CARPENTIER, A. (2013). Striped red mullet (*Mullus surmuletus*, linnaeus, 1758) in the eastern english channel and southern north sea : growth and reproductive biology. *Journal of Applied Ichthyology*, 29(5), 1067-1072. <https://doi.org/10.1111/jai.12266>
- MAHÉ, K., VILLANUEVA, M. C., VAZ, S., COPPIN, F., KOUUBI, P. & CARPENTIER, A. (2014). Morphological variability of the shape of striped red mullet *Mullus surmuletus* in relation to stock discrimination between the Bay of Biscay and the eastern English Channel. *Journal of Fish Biology*, 84(4), 1063-1073. <https://doi.org/10.1111/jfb.12345>
- MAHÉ, K., OUDARD, C., MILLE, T., KEATING, J., GONÇALVES, P., WORSØE CLAUSEN, L., PETURSDOTTIR, G., GASMUSSEN, H., MELAND, E., MULLINS, E., PINNEGAR, J., HØINES, Å. & TRENKEL, V. (2016a). Identifying blue whiting (*Micromesistius poutassou*) stock structure in the Northeast Atlantic by otolith shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 73. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2015-0332>
- MAHÉ, K., EVANO, H., MILLE, T., MUTHS, D. & BOURJEA, J. (2016b). Otolith shape as a valuable tool to evaluate the stock structure of swordfish *Xiphias gladius* in the Indian Ocean. *African Journal of Marine Science*, 38(4), 457-464. <https://doi.org/10.2989/1814232X.2016.1224205>
- MAHÉ, K., AUMOND, Y., RABHI, K., ELLEBOODE, R., BELLAMY, E., HUET, J., GAULT, M. & ROOS, D. (2017). Relationship between somatic growth and otolith growth : a case study of the ornate jobfish *Pristipomoides argyrogrammicus* from the coast of Réunion (SW Indian

- Ocean). *African Journal of Marine Science*, 39(2), 145-151. <https://doi.org/10.2989/1814232X.2017.1327886>
- MAHÉ, K., IDER, D., MASSARO, A., HAMED, O., JURADO-RUZAFÁ, A., GONÇALVES, P., ANASTASOPOULOU, A., JADAUD, A., MYTILINEOU, C., ELLEBOODE, R., RAMDANE, Z., BACHA, M., AMARA, R., de PONTUAL, H. & ERNANDE, B. (2018). Directional bilateral asymmetry in otolith morphology may affect fish stock discrimination based on otolith shape analysis (F. JUANES, Éd.). *ICES Journal of Marine Science*, 76(1), 232-243. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsy163>
- MAHÉ, K. (2019). *Sources de variation de la forme des otolithes : Implications pour la discrimination des stocks de poissons*. 273 pages (thèse de doct.). Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), France.
- MAHÉ, K., MACKENZIE, K., IDER, D., MASSARO, A., HAMED, O., JURADO-RUZAFÁ, A., GONÇALVES, P., ANASTASOPOULOU, A., JADAUD, A., MYTILINEOU, C., RANDON, M., ELLEBOODE, R., MORELL, A., RAMDANE, Z., SMITH, J., BEKAERT, K., AMARA, R., de PONTUAL, H. & ERNANDE, B. (2021). Directional bilateral asymmetry in fish otolith : a potential tool to evaluate stock boundaries ? *Symmetry*, 13(6), 987. <https://doi.org/10.3390/sym13060987>
- MAHÉ, K., ANDRIALOVANIRINA, N., MATÉOS, A., COUETTE, S., RÉMI, L., MACKENZIE, K. & POISSON CAILLAULT, É. (2024). *Identification des poissons par leurs otolithes en imagerie 3D* (É. QUAE, Éd.) [EAN13 9782759238651].
- MAPP, J. J. I., FISHER, M. H., ATWOOD, R. C., BELL, G. D., GRECO, M. K., SONGER, S. & HUNTER, E. (2016). Three-dimensional rendering of otolith growth using phase contrast synchrotron tomography. *Journal of Fish Biology*, 88(5), 2075-2080. <https://doi.org/10.1111/jfb.12949>
- MAPP, J., HUNTER, E., van der KOOIJ, J., SONGER, S. & FISHER, M. (2017). Otolith shape and size : The importance of age when determining indices for fish-stock separation. *Fisheries Research*, 190, 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.01.017>
- MARTI-PUIG, P., DANÉS, J., MANJABACAS, A. & LOMBARTE, A. (2016). New parameterisation method for three-dimensional otolith surface images. *Marine and Freshwater Research*, 67(7), 1059. <https://doi.org/10.1071/MF15069>
- MARTI-PUIG, P., MANJABACAS, A. & LOMBARTE, A. (2020). Fourier-based contour descriptors to relax positional standardization of the otolith images in AFORO queries. *Scientia Marina*, 84(1), 27. <https://doi.org/10.3989/scimar.04961.15A>
- MCINNES, L. & HEALY, J. (2018). UMAP : Uniform Manifold Approximation and Projection for dimension reduction. *ArXiv*, *abs/1802.03426*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:3641284>
- MÉRIGOT, B., LETOURNEUR, Y. & LECOMTE-FINIGER, R. (2007). Characterization of local populations of the common sole *Solea solea* (pisces, soleidae) in the NW mediterranean through otolith morphometrics and shape analysis. *Marine Biology*, 151(3), 997-1008. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0549-0>
- MILLE, T., MAHE, K., VILLANUEVA, M. C., DE PONTUAL, H. & ERNANDE, B. (2015). Sagittal otolith morphogenesis asymmetry in marine fishes. *Journal of Fish Biology*, 87(3), 646-663. <https://doi.org/10.1111/jfb.12746>

- MILLE, T. (2015). *Sources de variation intra-populationnelle de la morphologie des otolithes : asymétrie directionnelle et régime alimentaire*. 222 pages (thèse de doct.). Université de Lille 1 - Sciences et Technologies.
- MISZTAL, K., POCHA, A., DURAK-KOZICA, M., WATOR, M., KUBICA-MISZTAL, A. & HARTEL, M. (2020). The importance of standardisation – COVID-19 CT & radiograph image data stock for deep learning purpose. *Computers in Biology and Medicine*, 127, 104092. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2020.104092>
- MOEN, E., HANDEGARD, N. O., ALLKEN, V., ALBERT, O. T., HARBITZ, A. & MALDE, K. (2018). Automatic interpretation of otoliths using deep learning (H. M. PATTERSON, Éd.). *PLoS ONE*, 13(12), e0204713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204713>
- MOEN, E., VABØ, R., SMOLIŃSKI, S., DENECHAUD, C., HANDEGARD, N. O. & MALDE, K. (2023). Age interpretation of cod otoliths using deep learning. *Ecological Informatics*, 78(102325), 102325.
- MONTEIRO, L. R., BENEDITTO, A. P. M. D., GUILLERMO, L. H. & RIVERA, L. A. (2005). Allometric changes and shape differentiation of sagitta otoliths in sciaenid fishes. *Fisheries Research*, 74(1), 288-299. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2005.03.002>
- MOORE, B. R., MACLAREN, J., PEAT, C., ANJOMROUZ, M., HORN, P. & HOYLE, S. D. (2019). Feasibility of automating otolith ageing using CT scanning and machine learning [Publisher : Fisheries New Zealand]. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29670.16960>
- MORALES-NIN, B. Y. O. (1987). The influence of environmental factors on microstructure of otoliths of three demersal fish species caught off Namibia. *South African Journal of Marine Science*, 5(1), 255-262. <https://doi.org/10.2989/025776187784522207>
- MORALES-NIN, B. Y. O., PÉREZ-MAYOL, S., MACKENZIE, K., CATALÁN, I., PALMER, M., KERSAUDY, T. & MAHÉ, K. (2022). European hake (*Merluccius merluccius*) stock structure in the mediterranean as assessed by otolith shape and microchemistry. *Fisheries Research*, 254, 106419. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2022.106419>
- MORAT, F., LETOURNEUR, Y., NÉRINI, D., BANARU, D. & BATJAKAS, I. (2012). Discrimination of red mullet populations (teleostean, mullidae) along multi-spatial and ontogenetic scales within the mediterranean basin on the basis of otolith shape analysis. *Aquatic Living Resources*, 25(1), 27-39. <https://doi.org/10.1051/alr/2011151>
- MOSEGAARD, H., SVEDÄNG, H. & TABERMAN, K. (1988). Uncoupling of somatic and otolith growth rates in Arctic Char (*Salvelinus alpinus*) as an effect of differences in temperature response. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45(9), 1514-1524. <https://doi.org/10.1139/f88-180>
- MOUNICOU, S., FRELON, S., LE GUERNIC, A., EB-LEVADOUX, Y., CAMILLERI, V., FÉVRIER, L., PIERRISNARD, S., CARASCO, L., GILBIN, R., MAHÉ, K., TABOURET, H., BAREILLE, G. & SIMON, O. (2019). Use of fish otoliths as a temporal biomarker of field uranium exposure. *Science of The Total Environment*, 690, 511-521. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.534>
- MUÑOZ-LECHUGA, R., SOW, F. N., CONSTANCE, D. N., ANGUEKO, D., MACÍAS, D., MASSA-GALLUCCI, A., da SILVA, G. B., GONÇALVES, J. M. S. & LINO, P. G. (2023). Differentiation of spatial units of genus *Euthynnus* from the Eastern Atlantic and the Mediterranean using otolith shape analysis. *Fishes*, 8(6), 317. <https://doi.org/10.3390/fishes8060317>

- MYERS, S. C., THORSEN, A., SMOLIŃSKI, S., AANESTAD GODIKSEN, J., MALDE, K. & HANDEGARD, N. O. (2020). An efficient protocol and data set for automated otolith image analysis. *Geoscience Data Journal*, 7(1), 80-88. <https://doi.org/10.1002/gdj3.86>
- NASREDDINE, K., BENZINO, A. & FABLET, R. (2009). Shape geodesics for the classification of calcified structures : beyond fourier shape descriptors. *Fisheries Research*, 98(1), 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2009.03.008>
- NEVES, A., SEQUEIRA, V., FARIAS, I., VIEIRA, A. R., PAIVA, R. & GORDO, L. S. (2011). Discriminating bluemouth, *Helicolenus dactylopterus* (Pisces : Sebastidae), stocks in Portuguese waters by means of otolith shape analysis [Publisher : Cambridge University Press]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91(6), 1237-1242. <https://doi.org/10.1017/S002531541000189X>
- NEVES, J., VERÍSSIMO, A., MÚRIAS SANTOS, A. & GARRIDO, S. (2023). Comparing otolith shape descriptors for population structure inferences in a small pelagic fish, the European sardine *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792). *Journal of Fish Biology*, 102(5), 1219-1236. <https://doi.org/10.1111/jfb.15369>
- NIBLACK, W. (1986). *An Introduction to Digital Image Processing*. Prentice-Hall.
- ONU FRANCE. (2024). *Objectif 14 : Vie aquatique*, <https://unric.org/fr/odd-14/>.
- OTSU, N. (1979). A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 9(1), 62-66. <https://doi.org/10.1109/tsmc.1979.4310076>
- PALCO, B. J., BEARDSLEY, G. L. & RICHARDS, W. J. (1981). Synopsis of the biology of the swordfish, *Xiphias gladius* Linnaeus. FAO Fisheries Synopsis 127. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:88832437>
- PALMER, A. R. & STROBECK, C. (1986). Fluctuating asymmetry : Measurement, Analysis, Patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17(1), 391-421. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.17.110186.002135>
- PALMER, A. R. (1994). Fluctuating asymmetry analyses : a primer. *Developmental Instability : Its Origins and Evolutionary Implications* (p. 335-364). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0830-0_26
- PALMER, A. R. (2009). Animal asymmetry [Publisher : Elsevier]. *Current Biology*, 19(12), R473-R477. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.006>
- PALMER, A. R. (2016). What determines direction of asymmetry : genes, environment or chance ? [Publisher : Royal Society]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 371(1710), 20150417. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0417>
- PALMER, M., LINDE, M. & MORALES-NIN, B. (2010). Disentangling fluctuating asymmetry from otolith shape. *Marine Ecology Progress Series*, 399, 261-272. <https://doi.org/10.3354/meps08347>
- PALOMARES, M. L. D., FROESE, R., DERRICK, B., MEEUWIG, J. J., NÖEL, S. -L., TSUI, G., WORONIAK, J., ZELLER, D. & PAULY, D. (2020). Fishery biomass trends of exploited fish populations in marine ecoregions, climatic zones and ocean basins. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 243, 106896. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2020.106896>
- PANFILI, J., DE PONTUAL, H., TROADEC, H. & WRIGH, P. J. (2002, janvier 1). *Manual of fish sclerochronology* (Coédition Ifremer-IRD). Récupérée 14 février 2022, à partir de <https://archimer.ifremer.fr/doc/00017/12801/>
- PARISI-BARADAD, V., LOMBARTE, A., GARCÍA-LADONA, E., CABESTANY, J., PIERA, J. & CHIC, Ó. (2005). Otolith shape contour analysis using affine transformation invariant wave-

- let transforms and curvature scale space representation. *Marine and Freshwater Research*, 56, 795-804. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:16100780>
- PATTERSON, K., COOK, R., DARBY, C., GAVARIS, S., KELL, L., LEWY, P., MESNIL, B., PUNT, A., RESTREPO, V., SKAGEN, D. W. & STEFÁNSSON, G. (2001). Estimating uncertainty in fish stock assessment and forecasting. *Fish and Fisheries*, 2(2), 125-157. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2960.2001.00042.x>
- PAWSON, M. G. (1990). Using otolith weight to age fish. *Journal of Fish Biology*, 36(4), 521-531. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1990.tb03554.x>
- PAWSON, M. G. & JENNINGS, S. (1996). A critique of methods for stock identification in marine capture fisheries. *Fisheries Research*, 25(3), 203-217. [https://doi.org/10.1016/0165-7836\(95\)00441-6](https://doi.org/10.1016/0165-7836(95)00441-6)
- PETURSDOTTIR, G., BEGG, G. & MARTEINSDOTTIR, G. (2006). Discrimination between Icelandic cod (*Gadus morhua* L.) populations from adjacent spawning areas based on otolith growth and shape. *Fisheries Research*, 80(2), 182-189. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.05.002>
- PITA, A., CASEY, J., HAWKINS, S. J., VILLARREAL, M. R., GUTIÉRREZ, M.-J., CABRAL, H., CAROCCI, F., ABAUNZA, P., PASCUAL, S. & PRESA, P. (2016). Conceptual and practical advances in fish stock delineation. *Fisheries Research*, 173, 185-193. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2015.10.029>
- PIZER, S. M., AMBURN, E. P., AUSTIN, J. D., CROMARTIE, R., GESELOWITZ, A., GREER, T., ter HAAR ROMENY, B., ZIMMERMAN, J. B. & ZUIDERVELD, K. (1987). Adaptive histogram equalization and its variations. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, 39(3), 355-368. [https://doi.org/10.1016/s0734-189x\(87\)80186-x](https://doi.org/10.1016/s0734-189x(87)80186-x)
- POLITIKOS, D. V., PETASIS, G., CHATZISPYROU, A., MYTILINEOU, C. & ANASTASOPOULOU, A. (2021). Automating fish age estimation combining otolith images and deep learning : the role of multitask learning. *Fisheries Research*, 242, 106033. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2021.106033>
- PONTON, D. (2006). Is geometric morphometrics efficient for comparing otolith shape of different fish species? *Journal of Morphology*, 267(6), 750-757. <https://doi.org/10.1002/jmor.10439>
- POPPER, A. N. & LU, Z. (2000). Structure–function relationships in fish otolith organs. *Fisheries Research*, 46(1-3), 15-25.
- POPPER, A. N. & FAY, R. R. (2011). Rethinking sound detection by fishes. *Hearing Research*, 273(1–2), 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2009.12.023>
- POTHIN, K., GONZALEZ-SALAS, C., CHABANET, P. & LECOMTE-FINIGER, R. (2006). Distinction between *Mulloidichthys flavolineatus* juveniles from Reunion Island and Mauritius Island (south-west Indian Ocean) based on otolith morphometrics. *Journal of Fish Biology*, 69(1), 38-53. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01047.x>
- PSOMADAKIS, P. N., GIUSTINO, S. & VACCHI, M. (2012). Mediterranean fish biodiversity : an updated inventory with focus on the Ligurian and Tyrrhenian seas. *Zootaxa*, 3263(1). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3263.1.1>
- QUIGLEY, L. A., CAIGER, P. E., GOVINDARAJAN, A. F., MCMONAGLE, H., JECH, J. M., LAVERY, A. C., SOSIK, H. M. & LLOPIZ, J. K. (2023). Otolith characterization and integrative species identification of adult mesopelagic fishes from the western North Atlantic Ocean. *Frontiers in Marine Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1217779>

- QUINDAZZI, M. J., SUMMERS, A. & JUANES, F. (2022). Efficiency is doing things right : high-throughput, automated, 3D methods in the modern era of otolith morphometrics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 79, 7. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2021-0088>
- R CORE TEAM. (2024). *R : A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- RABOSKY, D. L., CHANG, J., TITLE, P. O., COWMAN, P. F., SALLAN, L., FRIEDMAN, M., KASCHNER, K., GARILAO, C., NEAR, T. J., COLL, M. & ALFARO, M. E. (2018). An inverse latitudinal gradient in speciation rate for marine fishes. *Nature*, 559(7714), 392-395.
- RANDON, M., PAPE, O. L., ERNANDE, B., MAHÉ, K., VOLCKAERT, F. A. M., PETIT, E. J., LASSALLE, G., BERRE, T. L. & RÉVEILLAC, E. (2020). Complementarity and discriminatory power of genotype and otolith shape in describing the fine-scale population structure of an exploited fish, the common sole of the Eastern English Channel [Publisher : Public Library of Science]. *PLoS ONE*, 15(11), e0241429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241429>
- REBAYA, M., BEN FALEH, A., ALLAYA, H., KHEDHER, M., MARSAOUI, B., TROJETTE, M., FATNASSI, M., CHALH, A., QUIGNARD, J.-p. & TRABELSI, M. (2017). Otolith shape discrimination of *Liza ramada* (Actinopterygii : Mugiliformes : Mugilidae) from marine and estuarine populations in Tunisia. *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*, 47, 13-21. <https://doi.org/10.3750/AIEP/02006>
- REIBISCH, J. (1899). *Ueber die Eizahl bei Pleuronectes platessa und die Altersbestimmung dieser Form aus den Otolithen. Nebst Bemerkung zu vorstehender Arbeit von Dr. V. Hensen*. Wiss. Meeresunt (Kiel).
- REIS, I., ATEŞ, C. & JAWAD, L. (2023). The developmental changes in the morphology of the otolith of the mullet *Chelon auratus* (Risso, 1810) (Mugiliformes, Mugilidae) collected from Köyceğiz Lagoon, Aegean Sea, Türkiye. *New Zealand Journal of Zoology*, 1-19. <https://doi.org/10.1080/03014223.2023.2277917>
- REISS, H., HOARAU, G., DICKEY-COLLAS, M. & WOLFF, W. (2009). Genetic population structure of marine fish : mismatch between biological and fisheries management units. *Fish and Fisheries*, 10, 361-395.
- RIJNSDORP, A. D. (1989). Maturation of male and female North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *ICES Journal of Marine Science*, 46(1), 35-51.
- ROHLF, F. J. & ARCHIE, J. W. (1984). A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera : Culicidae). *Systematic Biology*, 33(3), 302-317. <https://doi.org/10.2307/2413076>
- ROHLF, F. J. & SLICE, D. (1990). Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39(1), 40. <https://doi.org/10.2307/2992207>
- RONNEBERGER, O., FISCHER, P. & BROX, T. (2015). U-Net : Convolutional networks for biomedical image segmentation. *Springer*, 234-241. <https://doi.org/10.48550/ARXIV.1505.04597>
- ROOKER, J. R., ALVARADO BREMER, J. R., BLOCK, B. A., DEWAR, H., de METRIO, G., CORRIERO, A., KRAUS, R. T., PRINCE, E. D., RODRÍGUEZ-MARÍN, E. & SECOR, D. H. (2007). Life history and stock structure of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Reviews in Fisheries Science*, 15(4), 265-310. <https://doi.org/10.1080/10641260701484135>
- SADOVY, M., MATTHEW, C. & ÁTHILA, B. (2013). Fishing groupers towards extinction : a global assessment of threats and extinction risks in a billion dollar fishery. *Fish and Fisheries*, 14, 237-237. <https://doi.org/10.1111/faf.12029>

- SAIFULLAH, S. (2022). K-means and morphological approach on image segmentation for fish detection. *2022 19th International Conference on Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunications and Information Technology (ECTI-CON)*, 1-4. <https://doi.org/10.1109/ecti-con54298.2022.9795404>
- SALEMBIER, P. & PARDAS, M. (1994). Hierarchical morphological segmentation for image sequence coding. *IEEE Transactions on Image Processing*, 3(5), 639-651. <https://doi.org/10.1109/83.334980>
- SAREMI, A. & ARORA, R. (2009). The utility of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease. *American Journal of Therapeutics*, 16(5), 421-436. <https://doi.org/10.1097/mjt.0b013e3180a5f0bb>
- SAYGIN, S. (2024). Otolith shape analysis of red mullet, *Mullus barbatus* (Mullidae) in Turkish waters of the Aegean, Black, and Mediterranean Seas. *Journal of Ichthyology*, 64(2), 246-256. <https://doi.org/10.1134/s0032945224020127>
- SCHLAGER, S. (2017). Morpho and Rvcg – Shape analysis in R. *Statistical Shape and Deformation Analysis* (p. 217-256). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-810493-4.00011-0>
- SCHREIBER, A. M. (2006). Asymmetric craniofacial remodeling and lateralized behavior in larval flatfish. *Journal of Experimental Biology*, 209(4), 610-621. <https://doi.org/10.1242/jeb.02056>
- SCHULZ-MIRBACH, T., OLBINADO, M., RACK, A., MITTONE, A., BRAVIN, A., MELZER, R., LADICH, F. & HESS, M. (2018). *In-situ* visualization of sound-induced otolith motion using hard x-ray phase contrast imaging. *Scientific Reports*, 8(1), 3121. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21367-0>
- SCHULZ-MIRBACH, T., LADICH, F., MITTONE, A., OLBINADO, M., BRAVIN, A., MAIDITSCH, I. P., MELZER, R. R., KRYSL, P. & HESS, M. (2020). Auditory chain reaction : effects of sound pressure and particle motion on auditory structures in fishes. *PLoS ONE*, 15(3), e0230578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230578>
- SCHULZ-MIRBACH, T., HESS, M. & PLATH, M. (2011). Inner ear morphology in the Atlantic molly *Poecilia mexicana* – First detailed microanatomical study of the inner ear of a cyprinodontiform species. *PLoS ONE*, 6(11), e27734.
- SCHULZ-MIRBACH, T., METSCHER, B. & LADICH, F. (2012). Relationship between swim bladder morphology and hearing abilities – A case study on Asian and African cichlids. *PLoS ONE*, 7(8), e42292.
- SCHULZ-MIRBACH, T., LADICH, F., PLATH, M. & HESS, M. (2019). Enigmatic ear stones : what we know about the functional role and evolution of fish otoliths. *Biological Reviews*, 94(2), 457-482. <https://doi.org/10.1111/brv.12463>
- SECOR, D. H. & DEAN, J. M. (1989). Somatic Growth Effects on the Otolith–Fish Size Relationship in Young Pond-reared Striped Bass, *Morone saxatilis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(1), 113-121. <https://doi.org/10.1139/f89-015>
- SEDBERRY, G. & LOEFER, J. (2001). Satellite telemetry tracking of swordfish, *Xiphias gladius*, off the eastern United States. *Marine Biology*, 139(2), 355-360. <https://doi.org/10.1007/s002270100593>
- SELLESLAGH, J., ECHARD, A., PÉCHEYRAN, C., BAUDRIMONT, M., LOBRY, J. & DAVERAT, F. (2016). Can analysis of *Platichthys flesus* otoliths provide relevant data on historical metal pollution in estuaries? Experimental and *in situ* approaches. *Science of The Total Environment*, 557–558, 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.014>

- SHEN, L., FARID, H. & MCPEEK, M. (2009). Modeling three-dimensional morphological structures using spherical harmonics. *Evolution*, 63(4), 1003-1016. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00557.x>
- SHERMAN, K., SISSEWINE, M., CHRISTENSEN, V., DUDA, A., HEMPEL, G., IBE, C., LEVIN, S., LLUCH-BELDA, D., MATISHOV, G., MCGLADE, J., O'TOOLE, M., SEITZINGER, S., SERRA, R., SKJOLDAL, H.-R., TANG, Q., THULIN, J., VANDEWEERD, V. & ZWANENBURG, K. (2005). A global movement toward an ecosystem approach to management of marine resources [Publisher : Inter-Research Science Center]. *Marine Ecology Progress Series*, 300, 275-279. <https://doi.org/10.3354/meps300275>
- SHIMOSE, T., SUZUKI, N. & IWATSUKI, Y. (2020). *Pristipomoides amoenus* (snyder 1911), a valid species of jobfish (pisces, lutjanidae), with comparisons to *P. argyrogrammicus* (valenciennes 1832) [Number : 4]. *Zootaxa*, 4728(4), 469-476. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4728.4.5>
- SINCLAIR, M. (1987). *Marine populations : An essay on population regulation and speciation*. Books in Recruitment Fishery Oceanography. Univ. Washington Press, Seattle.
- SINCLAIR, M. & SMITH, T. (2002). The notion that fish species form stocks. *ICES Marine Science Symposium*, 215, 297-304.
- SKLIRIS, N. (2013). Past, present and future patterns of the thermohaline circulation and characteristic water masses of the Mediterranean Sea. *The Mediterranean Sea* (p. 29-48). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6704-1_3
- SMITH, M. K. (1992). Regional differences in otolith morphology of the deep slope red snapper *Etelis carbunculus* [Publisher : NRC Research Press Ottawa, Canada]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(4), 795-804. <https://doi.org/10.1139/f92-090>
- SOBEL, I. (1990). An isotropic 3x3 image gradient operator. *Machine Vision for Three-Dimensional Scenes*, 376-379.
- SOGARD, S. M. (1991). Interpretation of otolith microstructure in juvenile winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) : Ontogenetic development, daily increment validation, and somatic growth relationships. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(10), 1862-1871. <https://doi.org/10.1139/f91-220>
- SPALDING, M. D., FOX, H. E., ALLEN, G. R., DAVIDSON, N., FERDAÑA, Z. A., FINLAYSON, M., HALPERN, B. S., JORGE, M. A., LOMBANA, A., LOURIE, S. A., MARTIN, K. D., MCMANUS, E., MOLNAR, J., RECCHIA, C. A. & ROBERTSON, J. (2007). Marine ecoregions of the world : A bioregionalization of coastal and shelf areas. *BioScience*, 57(7), 573-583. <https://doi.org/10.1641/B570707>
- SPILLER, P., VAN WIJNGAARDEN, E., ADAMS, H. R., STRAIN, J., MCSORLEY, E. M., MULHERN, M. S., CONWAY, M. C., YEATES, A. J., CARRINGTON, C., BOLGER, P. M., MORGAN, K. M., TAYLOR, C. M., RALSTON, N. V., CRAWFORD, M. A., HIBBELN, J. R., BRENNAN, J. T. & MYERS, G. J. (2023). Net effects explains the benefits to children from maternal fish consumption despite methylmercury in fish. *NeuroToxicology*, 99, 195-205. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2023.10.010>
- STEVENSON, D. & CAMPANA, S. (1992). Otolith microstructure examination and analysis. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences* 117, 135. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22258.61127>

- STOCK, M., NGUYEN, B., COURTENS, W., VERSTRAETE, H., STIENEN, E. & DE BAETS, B. (2021). Otolith identification using a deep hierarchical classification model. *Computers and Electronics in Agriculture*, 180, 105883. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105883>
- TAILLEBOIS, L., BARTON, D. P., CROOK, D. A., SAUNDERS, T., TAYLOR, J., HEARNDEN, M., SAUNDERS, R. J., NEWMAN, S. J., TRAVERS, M. J., WELCH, D. J., GREIG, A., DUDGEON, C., MAHER, S. & OVENDEN, J. R. (2017). Strong population structure deduced from genetics, otolith chemistry and parasite abundances explains vulnerability to localized fishery collapse in a large Sciaenid fish, *Protonibea diacanthus*. *Evolutionary Applications*, 10(10), 978-993. <https://doi.org/10.1111/eva.12499>
- THORSON, J. T., ADAMS, G. & HOLSMAN, K. (2019). Spatio-temporal models of intermediate complexity for ecosystem assessments : A new tool for spatial fisheries management. *Fish and Fisheries*, 20(6), 1083-1099. <https://doi.org/10.1111/faf.12398>
- TORRES, G. J., LOMBARTE, A. & MORALES-NIN, B. (2000). Variability of the *sulcus acusticus* in the sagittal otolith of the genus *Merluccius* (merlucciidae). *Fisheries Research*, 46(1), 5-13. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(00\)00128-4](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(00)00128-4)
- TROJETTE, M., ABDERRAOUF, B. F., FATNASSI, M., MARSAOUI, B., MAHOUACHI, N., CHALH, D. A., JEAN-PIERRE, Q. & TRABELSI, M. (2015). Stock discrimination of two insular populations of *Diplodus annularis* (Actinopterygii : Perciformes : Sparidae) along the coast of Tunisia by analysis of otolith shape. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 45, 363-372. <https://doi.org/10.3750/AIP2015.45.4.04>
- TSUNG-HSIANG, M., YI-JAY, C., JEN-CHIEH, S., J., C.-B. & K., Y.-F. (2024). Enhancing machine learning-based age estimation for Pacific bluefin tuna : An approach with data imputation and image augmentation strategies. *Fisheries Research*, 274(106992), 106992.
- TUSET, V., OTERO-FERRER, J., SILIPRANDI, C., MANJABACAS, A., MARTI-PUIG, P. & LOMBARTE, A. (2021). Paradox of otolith shape indices : routine but overestimated use [Publisher : NRC Research Press]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 78(6), 681-692. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2020-0369>
- TUSET, V., LOMBARTE, A. & ASSIS, C. (2008). Otolith atlas for the western Mediterranean, north and central Eastern Atlantic. *Scientia Marina*, 72, 7-198. <https://doi.org/10.3989/scimar.2008.72s17>
- TUSET, V. M., IMONDI, R., AGUADO, G., OTERO-FERRER, J. L., SANTSCHI, L., LOMBARTE, A. & LOVE, M. (2014). Otolith patterns of rockfishes from the northeastern Pacific. *Journal of Morphology*, 276(4), 458-469. <https://doi.org/10.1002/jmor.20353>
- TUSET, V. M., FARRÉ, M., OTERO-FERRER, J. L., VILAR, A. G., MORALES-NIN, B. & LOMBARTE, A. (2016). Testing otolith morphology for measuring marine fish biodiversity. *Marine and Freshwater Research*, 67, 1037-1048. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:54695110>
- ULRICH, C., HEMMER-HANSEN, J., BOJE, J., CHRISTENSEN, A., HÜSSY, K., SUN, H. & CLAUSEN, L. W. (2017). Variability and connectivity of plaice populations from the Eastern North Sea to the Baltic Sea, part II. Biological evidence of population mixing. *Journal of Sea Research*, 120, 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2016.11.002>
- VANDERKOOY, S., CARROLL, J. & GILMORE, J. (2020). A practical handbook for determining the ages of Gulf of Mexico and Atlantic coast fishes, third edition. *Gulf States Marine Fisheries Commission 2404 Government St Ocean Springs, MS 39564 and Atlantic States*

Marine Fisheries Commission 1050 N. Highland Street Suite 200 A-N Arlington, VA 22201, 294.

- VASCONCELOS-FILHO, J., THOMSEN, F. S. L., STOSIC, B., ANTONINO, A. C. D., DUARTE, D. A., HECK, R. J., LESSA, R. P. T., SANTANA, F. M., FERREIRA, B. P. & DUARTE-NETO, P. J. (2019). Peeling the otolith of fish : Optimal parameterization for micro-CT scanning. *Frontiers in Marine Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00728>
- VIGNON, M., MORAT, F., GALZIN, R. & SASAL, P. (2008). Evidence for spatial limitation of the bluestripe snapper *Lutjanus kasmira* in french polynesia from parasite and otolith shape analysis. *Journal of Fish Biology*, 73(10), 2305-2320. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02070.x>
- VIGNON, M. (2015). Disentangling and quantifying sources of otolith shape variation across multiple scales using a new hierarchical partitioning approach. *Marine Ecology Progress Series*, 534, 163-177. <https://doi.org/10.3354/meps11376>
- VIGNON, M. & MORAT, F. (2010). Environmental and genetic determinant of otolith shape revealed by a non-indigenous tropical fish. *Marine Ecology Progress Series*, 411, 231-241. <https://doi.org/10.3354/meps08651>
- VIGNON, M. (2012). Ontogenetic trajectories of otolith shape during shift in habitat use : interaction between otolith growth and environment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 420-421, 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.03.021>
- VITALE, F., CLAUSEN, L. W. & CHONCHÚIR, G. N. (2019). Handbook of fish age estimation protocols and validation methods. *ICES Cooperative Research Report*, (346), 191. <https://doi.org/http://doi.org/10.17895/ices.pub.5221>
- VOLLET, K., GHASSABIAN, A., SUNDARAM, R., CHAHAL, N. & YEUNG, E. H. (2017). Prenatal fish oil supplementation and early childhood development in the Upstate KIDS Study. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8(4), 465-473. <https://doi.org/10.1017/s2040174417000253>
- VOLPEDO, A. V., TOMBARI, A. D. & ECHEVERRÍA, D. D. (2008). Eco-morphological patterns of the sagitta of Antarctic fish. *Polar Biology*, 31(5), 635-640.
- WANG, C. (2010). Study on Oral Medicine standardization of digital imaging system data. *2010 5th International Conference on Computer Science and Education*. <https://doi.org/10.1109/iccse.2010.5593423>
- WARD, R. (2000). Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia*, 420.
- WEBB, P. W. (1984). Body form, locomotion and foraging in aquatic vertebrates. *American Zoologist*, 24(1), 107-120.
- WEBB, P. W. (1994). The biology of fish swimming. *The Mechanics and Physiology of Animal Swimming* (p. 45-62). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511983641.005>
- WEI, C. & MCCAULEY, R. (2022). Numerical modeling of the impacts of acoustic stimulus on fish otoliths from two directions. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 152(6), 3226-3234. <https://doi.org/10.1121/10.0016359>
- WEI, X. & ZHU, G. (2022). Shape and ontogenetic changes in otolith of the ocellated icefish (*Chionodraco rastrospinosus*) from the Bransfield Strait, Antarctic. *Zoology*, 153, 126025. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2022.126025>
- WILSON, R. R. (1985). Depth-related changes in Sagitta morphology in six Macrourid fishes of the Pacific and Atlantic oceans. *Copeia*, 1985(4), 1011-1017. <https://doi.org/10.2307/1445256>

- WORLD BANK. (2024). *Blue Economy*, <https://www.worldbank.org/en/topic/oceans-fisheries-and-coastal-economies>.
- WORTHINGTON, D. O., DOHERTY, P. J. & FOWLER, A. J. (1995). Variation in the relationship between otolith weight and age : implications for the estimation of age of two tropical damselfish (*Pomacentrus moluccensis* and *P. wardi*) [Publisher : NRC Research Press]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(2), 233-242. <https://doi.org/10.1139/f95-023>
- WRIGHT, K. J., HIGGS, D. M., CATO, D. H. & LEIS, J. M. (2010). Auditory sensitivity in settlement-stage larvae of coral reef fishes. *Coral Reefs*, 29(1), 235-243.
- WRIGHT, P. J., MILLAR, C. P. & GIBB, F. M. (2011). Intrastock differences in maturation schedules of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *ICES Journal of Marine Science*, 68(9), 1918-1927.
- YOUSSEF, E., YOUSSEF, E.-s., MOSTAFA, E. Y., DRISS, M., FATHALLAH, N., ALAIN, C., HAMMOU, E. & KHALID, M. (2016). A new otolith recognition system based on image contour analysis. *Journal of entomology and zoology studies*, 4, 580-590.
- ZELDITCH, M. L., SWIDERSKI, D. L., SHEETS, D. H. & FINK, W. (2004). *Geometric morphometrics for biologists*. Academic Press.
- ZHANG, C., YE, Z., LI, Z., WAN, R., REN, Y. & DOU, S. (2016). Population structure of Japanese Spanish mackerel *Scomberomorus niphonius* in the Bohai Sea, the Yellow Sea and the East China Sea : evidence from random forests based on otolith features. *Fisheries Science*, 82(2), 251-256. <https://doi.org/10.1007/s12562-016-0968-x>
- ZHIGANG, L., JIANHENG, L., XIAOBIN, L., HONGXI, W., PENG, W., LIANGLIANG, L., LEI, S. & XIAOYAN, L. (2023). Two adaptive enhancement algorithms for high gray-scale RAW infrared images based on multi-scale fusion and chromatographic remapping. *Infrared Physics and Technology*, 133, 104774. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2023.104774>
- ZHU, G., TANG, W., WANG, L., WANG, C. & WANG, X. (2016). Identification of a uniquely expanded VIR (ORA) gene family in the Japanese grenadier anchovy (*Coilia nasus*). *Marine Biology*, 163(5). <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2896-9>
- ZHUANG, L., YE, Z. & ZHANG, C. (2015). Application of otolith shape analysis to species separation in *Sebastes spp.* from the Bohai Sea and the Yellow Sea, northwest Pacific. *Environmental Biology of Fishes*, 98(2), 547-558. <https://doi.org/10.1007/s10641-014-0286-z>
- ZITEK, A., MAYRHOFER, B., OEHM, J., IRRGEHER, J. & PROHASKA, T. (2014). Affordable 3D scanning of small otoliths for improved shape analysis by photogrammetry techniques [5th International Otolith Symposium 2014, Mallorca, Spain]. <https://doi.org/10.13140/2.1.4083.7122>

Table des figures

1	Panorama de la pêche mondiale en 2020 (sur les chiffres de la FAO, 2020). Les données sur les stocks sont issues uniquement des débarquements déclarés. Les chiffres sur la consommation des ressources halieutiques combinent à la fois la pêche et l'aquaculture.	10
2	Différents types de stocks halieutiques (modifié de The state of world highly migratory, straddling and other high seas fishery resources and associated species, https://www.fao.org/4/a0653e/a0653e04.htm). Les numéros représentent des tailles de stocks différentes réparties sur les ZEE et les Hautes mers.	12
3	Nombre d'articles scientifiques parus chaque année selon différents mots-clés après avoir préalablement sélectionné le mot-clé « fish stock identification » puis « genetic » ou « parasite » ou « chemical » ou « otolith shape » (source Web of Science, données extraites en juin 2024).	14
4	Positionnement des otolithes dans le poisson et son oreille interne. A : structure interne du tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> montrant la position de ces otolithes en couleur vive (figure modifiée de HUET, 2024). B : Vue latérale d'une oreille interne droite du <i>Antimora rostrata</i> , avec les trois otolithes clairement présents dans leurs sacs otiques (utricule pour le <i>lapillus</i> , lagena pour l' <i>asteriscus</i> et saccule pour le <i>Sagitta</i>) (figure modifiée de DENG <i>et al.</i> , 2011).	16
5	Structure des sacs otiques contenant les otolithes (figure modifiée de SCHULZ-MIRBACH <i>et al.</i> , 2019).	17
6	Présentation d'un otolithe gauche du chinchard (<i>Trachurus trachurus</i>) à partir des différentes vues extraites de l'image en 3 dimensions.	18
7	Influence des facteurs potentiels (ontogénie, environnement, hérédité génétique) sur la forme du poisson et de son otolithe à chaque stade de vie.	19
8	Présentation de l'otolithe gauche et droit du chinchard (<i>Trachurus trachurus</i>) et de la complexité de forme variant selon la partie divisée par l'axe principal ou la présence de l' <i>antirostrum</i>	21
9	Nombre d'articles scientifiques parus chaque année selon le type de données extraites pour analyser la forme de l'otolithe en ayant préalablement sélectionné les mots-clés « otolith shape » puis « symmetry » ou « asymmetry » (source Web of Science, juin 2024).	23
10	Différentes formes de l'otolithe capturées en 2D selon les angles d'inclinaison de l'otolithe. 1 : parties entre le <i>rostrum</i> et l' <i>antirostrum</i> différentes ; 2 : parties postérieures de l'otolithe différentes.	24
11	Différence de quantité des composées ioniques et organiques des deux zones de l'endolymphe (proximale et distale). Les valeurs en rouge sont les plus élevées (données ALLEMAND <i>et al.</i> , 2007 ; figure modifiée de SCHULZ-MIRBACH <i>et al.</i> , 2019).	25

12	Nombre d'articles scientifiques parus chaque année selon le type de données extraites pour analyser la forme de l'otolithe en ayant préalablement sélectionné les mots-clés « otolith shape » puis « 3D » (source Web of Science, état en juin 2024).	26
13	Nombre d'articles scientifiques parus chaque année selon différents mots-clés après avoir préalablement sélectionné le mot-clé « otolith shape » puis les différentes méthodes d'analyse de la forme des otolithes (source Web of Science, état juin 2024).	28
14	Principe des descripteurs elliptiques de Fourier selon l'évolution du nombre d'harmoniques utilisées pour reconstruire la forme initiale.	29
15	Nombre d'articles scientifiques parus chaque année selon différents mots-clés après avoir préalablement sélectionné le mot-clé « otolith shape » puis les différentes méthodes de classifications ou de modélisations; A : les principales familles de méthodes; B : les méthodes les plus utilisées (source Web of Science, état juin 2024).	30
16	Structure générale de la thèse avec les disciplines appliquées (signal informatique, mathématique et écologie).	33
17	Panorama des différents chapitres et cas d'études réalisés dans la thèse.	37
18	Diversité des 22 espèces étudiées en interspécifique dans le chapitre 4 (en rouge) sur l'arbre phylogénétique des espèces capturées en Manche – Sud Mer du Nord par la campagne scientifique IBTS (International Bottom Trawl Survey).	39
19	22 espèces étudiées dans le chapitre 4 avec la forme de leurs otolithes.	40
1.1	Problématiques du chapitre 1. Collecte des otolithes réalisée lors de campagnes en mer et en criée, suivie d'une analyse des otolithes pour estimer l'âge des poissons de différentes manières. Une méthode de standardisation des images 2D est nécessaire, impliquant plusieurs étapes jusqu'à l'extraction des informations de la forme. La méthode 3D cherche à offrir une alternative comparable en termes de standardisation et de précision à celle du 2D.	43
1.2	Synthèse des méthodes d'analyse 2D et 3D pour la standardisation des otolithes. En 2D, les étapes incluent la détection par niveau de gris, découpage, et avec un alignement sur l'axe principal. Les descripteurs de forme sont obtenus par analyse de Fourier elliptique. En 3D, la reconstruction est effectuée avec un microtomographe, suivie de la segmentation et d'un processus de décimation. Le centrage est assuré par un calcul itératif et un alignement sur la forme moyenne. Les descripteurs de forme sont obtenus par analyse de Fourier, suivie d'une ACP pour les deux approches.	76
2.1	Analyse de l'asymétrie entre otolithes gauche et droit du rouget barbet de vase, pour évaluer d'éventuelles différences de forme en 2D et en 3D. La comparaison des otolithes en 2D et en 3D permet d'étudier cette asymétrie, avec pour objectif de déterminer si les deux méthodes fournissent des résultats équivalents en termes de précision et de représentation de la forme.	78
2.2	Synthèse des résultats sur la présence d'asymétrie en 2D et en 3D. En 3D, une asymétrie est détectée entre les otolithes gauche et droit, visualisée par des différences de forme entière surtout au niveau du <i>sulcus acusticus</i> . En 2D, l'absence d'asymétrie est mise en évidence par les formes des otolithes gauche et droit, montrant des contours relativement dissimilaires mais ce n'est pas la forme complète de l'otolithe.	97

3.1	Délimitation de stock en micro et macro-échelle géographique en utilisant la forme des otolithes. La partie gauche, c'est la délimitation de stock à micro-échelle spatiale autour de l'île de la Réunion sur 9 espèces de poissons démersaux en utilisant la forme 2D de leurs otolithes. La partie droite, c'est identification de stock du rouget barbet de vase à macro-échelle géographique en mer Méditerranée en comparant les délimitations des analyse 2D et 3D sur les classifications supervisées et non supervisées ainsi qu'avec les paramètres environnementaux.	99
3.2	Analyse multi-échelle géographique des stocks de poissons à l'Île de la Réunion (micro-échelle) et en Méditerranée (macro-échelle). En micro-échelle spatiale, l'étude met en évidence la séparation des stocks en fonction des environnements récifaux pour deux espèces démersales. En macro-échelle spatiale, la délimitation des stocks du rouget barbet de vase est influencée par la barrière physique près du Sicile en Méditerranée. La comparaison des approches 2D et 3D montre une délimitation optimale en 3D. 7 clusters environnementaux ont été observés et sont relativement regroupés en 2 stocks.	128
4.1	Exploration de la capacité de la forme 3D des otolithes à discriminer des espèces différentes, à refléter des relations phylogénétiques et à indiquer des caractéristiques écomorphologiques spécifiques.	133
4.2	Représentation graphique des composantes principales PC1 et PC2 des différences entre la forme 3D des otolithes des 22 principales espèces de Manche-mer du Nord. Chaque individu analysé est représenté par un point coloré, et tous les individus d'une espèce sont délimités par une enveloppe convexe (polygone). La forme théorique pour chaque espèce a été reconstruite pour aider visuellement à comprendre les critères morphologiques rapprochant certaines espèces entre elles. Pour appréhender les différences expliquant chaque axe graphique appelé PC, trois vues (proximale, distale et ventrale) sont exposées avec un code couleur allant du bleu foncé (pas de différence) au rouge (différence la plus importante).	139
4.3	Représentation graphique des composantes principales PC3 et PC4 des différences entre la forme 3D des otolithes des 22 principales espèces de Manche-mer du Nord. Chaque individu analysé est représenté par un point coloré, et tous les individus d'une espèce sont délimités par une enveloppe convexe (polygone). La forme théorique pour chaque espèce a été reconstruite pour aider visuellement à comprendre les critères morphologiques rapprochant certaines espèces entre elles. Pour appréhender les différences expliquant chaque axe graphique appelé PC, trois vues (proximale, distale et ventrale) sont exposées avec un code couleur allant du bleu foncé (pas de différence) au rouge (différence la plus importante).	141
4.4	Dendrogramme des 22 espèces étudiées de Manche-mer du Nord. Chaque espèce (représentée par une couleur unique) est représentée par plusieurs individus, identifié chacun par le nom latin de l'espèce puis un chiffre montrant sa position dans les stades de vie (1 étant le plus petit stade de vie et 5 le plus grand stade de vie).	143
4.5	Classification hiérarchique de la forme 3D de l'otolithe et phylogénique (arbre phylogénétique) en fonction de 2 niveaux taxonomiques (Ordre et Famille). Chaque ordre ou famille est représentées par une couleur. Pour chaque famille, l'ordre auquel elle appartient est représenté par un chiffre entre parenthèses.	145

4.6	Représentation graphique des composantes principales PC1 et PC2 des différences entre la forme 3D des otolithes des espèces de poissons selon divers écomorphologie. A : La position du poisson dans la colonne d'eau ; B : La forme du poisson ; C : La forme de la nageoire caudale du poisson en lien avec son déplacement ; D : Le mode d'alimentation du poisson. Chaque espèce est représentée par un polygone d'une couleur et chaque point correspond à un individu de l'espèce analysée (pour chaque espèce représentée, le type d'alimentation est le même pour tous les plusieurs individus car l'information individuelle n'est pas connue, cependant, le changement d'alimentation au cours de la vie du poisson pour une espèce donnée est fréquent).	148
4.7	Degrés de l'importance des traits dans la classification des espèces.	149
4.8	Analyse de la forme des otolithes en relation avec les espèces, la phylogénie, et l'écomorphologie des poissons. À gauche, une identification d'espèces de poissons en fonction de la forme 3D de leurs otolithes. Au centre, un dendrogramme met en évidence les relations évolutives des espèces à travers la forme des otolithes. À droite, une approche écomorphologique différencie des groupes de poissons selon leur forme d'otolithe en fonction de leur habitat : poissons plats vs. ronds, et poissons benthiques vs. pélagiques.	152

Liste des tableaux

1	Comparaison des méthodes de capture 3D et leurs caractéristiques	27
2	Récapitulatif des méthodes de machine learning principalement utilisées dans les analyses de forme de l'otolithe. Le mot outlier désigne une donnée très éloignée de la distribution globale voire aberrante.	31
4.1	Étendue des longueurs et le nombre total des échantillons par espèces.	135
4.2	Taux de prédiction correct des différents labels de chaque trait à partir de la forme 3D des otolithes par un classifieur 1-plus-proche-voisin. La 1ère colonne reprend les degrés d'importance (IMP.) des traits pour caractériser la forme, la 3ème spécifie le nombre de labels encodés pour chaque trait de vie.	150
4.3	Taux de prédiction correct des différents labels de chaque trait à partir de la forme 3D des otolithes par un classifieur de type Forêt aléatoire. La 1ère colonne reprend les degrés d'importance (IMP.) des traits pour caractériser la forme, la 3ème spécifie le nombre de labels encodés pour chaque trait de vie.	151

Liste des acronymes

ACP Analyse en Composantes Principales ou *Principal Component Analysis*.

AD Asymétrie Directionnelle.

ARi Indice de Rand ajusté ou *Adjusted Rand index*.

CIEM Conseil International pour l'Exploration de la Mer.

CGFS Campagne en mer ou *Channel Ground Fish Survey*.

DBSCAN Algorithme de partitionnement de données basé densité ou *Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise*.

EFD Descripteurs de Fourier Elliptiques ou *Elliptic Fourier Descriptor*.

FAO Organisation pour l'alimentation et l'agriculture ou *Food and Agriculture Organization*.

GAN Réseaux Antagonistes Génératifs ou *Generative Adversarial Networks*.

GSA Sous-zone géographique, unité de gestion des pêches ou *Geographical Sub-Area*.

IBTS Campagne en mer - *International Bottom Trawl Survey*.

Ifremer Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer.

IRM Imagerie par Résonance Magnétique.

ISO Norme - *International Organization for Standardization*.

KNN Algorithme des K plus proches voisins ou *K-Nearest Neighbors algorithm*.

LDA Analyse Discriminante Linéaire ou *Linear Discriminant Analysis*.

LED Diode électroluminescente ou *Light-Emitting Diode*.

LiDAR Détection et estimation de la distance par la lumière ou *Light Detection And Ranging*.

Micro-CT Microtomographe à rayons X ou μ -CT.

ONU Organisation des Nations Unies.

PC Composantes Principales issues d'une ACP ou *Principal Component*.

QDA Analyse Discriminante Quadratique ou *Quadratic Discriminant Analysis*.

RF Forêt Aléatoire ou *Random Forest*.

RGB Canaux rouge-vert-bleu ou *RedValue + GreenValue + BlueValue*.

RMD Rendement Maximum Durable.

SFD Descripteurs de Fourier Sphériques ou *Spherical Fourier Descriptor*.

SHAP Calculs des contributions de chaque variable dans la classification ou *Shapley Additive exPlanations*.

SIMWG Groupe de travail - *Stock Identification Methods Working Group*.

SNP *Single Nucleotide Polymorphisms*.

SPHARM Harmonique sphérique ou *SPherical HARMonic*.

SVM Machines à vaste marge ou *Support Vector Machine*.

WKNARC Groupe de travail - *Workshop of National Age Readings Coordinators*.

WGBIOP Groupe de travail - *Working Group on Biological Parameters*.

ZEE Zone économique exclusive.

Chapitre 6 Annexes

6.1 Annexe 1 : Asymétrie des otolithes de l'*Elops lacerta*

Fluctuating Asymmetry of *Elops lacerta* (Valenciennes, 1847) Otoliths in the Western African Waters

Madel Floriane Adjibayo Houeto^{1*}, Marwa Mejri¹, Malek Tazarki¹, Marius Sounouvou², Nicolas Andrialovanirina³, Meriem Ben Ghorbel¹, Pierre Dossou-Yovo⁴, Abdellah Chalh⁵, Pierre Quignard⁶, Monia Trabelsi¹, Kélig Mahé³

¹Laboratory of Ecology, Biology and Physiology of Aquatic Organisms, Faculty of Sciences of Tunis, University of Tunis El Manar, Tunis, Tunisia

²Institute of Mathematics and Physical Sciences, University of Abomey-Calavi (UAC), Abomey-Calavi, Benin

³IFREMER, Unit HMMN, Halieutic Resources Laboratory, Boulogne-sur-Mer, France

⁴Laboratory for Research into the Processing and Conservation of Fishery Products (LAREPROH), University of Abomey-Calavi (UAC), Abomey-Calavi, Benin

⁵Unit of Population Genetics and Biological Resources, Faculty of Sciences of Tunis, University of Tunis El Manar, Tunis, Tunisia

⁶Laboratoire d'Ichtyologie, Université Montpellier II, Montpellier, France

Email: *houetofloi@gmail.com

How to cite this paper: Houeto, M.F.A., Mejri, M., Tazarki, M., Sounouvou, M., Andrialovanirina, N., Ben Ghorbel, M., Dossou-Yovo, P., Chalh, A., Quignard, P., Trabelsi, M. and Mahé, K. (2024) Fluctuating Asymmetry of *Elops lacerta* (Valenciennes, 1847) Otoliths in the Western African Waters. *Open Journal of Marine Science*, 14, 41-62.

<https://doi.org/10.4236/ojms.2024.143003>

Received: February 22, 2024

Accepted: June 7, 2024

Published: June 11, 2024

Copyright © 2024 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Abstract

The importance of this study lies in the in-depth exploration of the ecological diversity of otoliths in *Elops lacerta*, based on the analysis of data from 260 individuals collected from various sites, including the Porto Novo lagoon, the Cotonou lagoon, Lake Nokoué, and the Atlantic coast in southern Benin. The results highlight significant variations in otolith morphology, establishing relevant links with the biological parameters of the fish at each site. Exploration of the asymmetry between the right and left sides reveals notable distinctions between these two aspects. Analysis of otolith shape thus emerges as a valuable tool for discriminating between stocks and providing a better understanding of ecological variations. The local diversity observed highlights the crucial importance of implementing adaptive management strategies to ensure effective conservation of the species and its habitat.

Keywords

Analysis, Porto-Novo Lagoon, Cotonou Lagoon, Lake Nokoué, Coast Atlantic

1. Introduction

West Africa's aquatic ecosystems are the habitat of remarkable biodiversity and

play an essential role in the subsistence of local communities [1]. These systems, which include lakes, lagoons and coastal areas, are habitat to many species of fish and other marine organisms, contributing to the region's food and economic security. However, these ecosystems are under increasing pressure from urbanization, pollution and environmental change [2]. It is essential to understand the complex dynamics of the species to ensure its long-term conservation and management. This is also a study of an economically crucial fish species in Beninese waters.

It is in this perspective that this study was initiated and seeks to develop our understanding of the ecological relationships associated with the West African ladybug, *Elops lacerta*, based on otolith analysis. Member of the Elopidae family, this species comprises one genus and six distinct species.

Otoliths are a pair of calcified white pieces that develop during the fish's lifetime. This continuous development makes it possible to determine age by reading the growth bands. Otoliths are also sound transducers, playing an important role in fish hearing. The shape of the otoliths is directly related to the spatial development of the lobes. Otoliths provide basic data and are used as a tool in taxonomy and phylogeny [3], evolution and ontogeny [4], spatial and temporal stock discrimination [5] [6] [7], population management [8] [9] [10]. Otolith shape and size are used because they reflect the environment in which the species inhabits [11] [12]. They depend on endogenous and exogenous factors such as environmental temperature and salinity [13] [14], luminosity [15] and depth [16] [17]. Otolith shape reveals both interspecific [18] and intraspecific differences [4]-[11]. Otolith shape within a population can be influenced by several confounding factors, including sex, age, fish size [19] and sexual maturity [7] [8] [9]. These factors, which describe the fish's life history, reflect the ontogenetic component [20]. However, we must also take into account the possibility of intra-individual variability linked to a possible asymmetry between the otoliths of the right and left ears. Of the three types of asymmetry that exist (fluctuating asymmetry, bilateral asymmetry, antisymmetry), fluctuating asymmetry is a characteristic that can potentially reflect stressful situations or environmental heterogeneity [21] [22] [23] [24]. Directional asymmetry, on the other hand, is not the result of chance, but of genetic components and/or phenotypic plasticity. Thus, the degree of directional asymmetry could also vary between different geographical areas for the same species.

The study of otoliths is therefore a means of stock discrimination for better management of fishery resources [8]-[26]. The study of otoliths is therefore a means of stock discrimination for better management of fishery resources [6]-[25]. In this context, the objectives of the study were to explore the fluctuating asymmetry of otoliths within *E. lacerta* and to explore any spatial variation within the study areas, which are: the Atlantic coasts in southern Benin, Lake Nokoué, Cotonou lagoon and Porto-Novo lagoon. These sites are distinctive for their unique characteristics in terms of geography, biodiversity and environmen-

tal constraints.

Elops lacerta is very common in tropical waters and can sometimes be observed in temperate zones [27]. This fish reproduces in the marine environment and their larvae disperse in estuarine habitats which, according to [27], are in decline and degradation. Most *E. lacerta* populations are faced with significant challenges related to habitat degradation and alteration, due to human activity, making them vulnerable to habitat degradation and overfishing [26]. It is also a fish species that has received little attention internationally due to its low economic status [28]. *E. lacerta* coexists with *E. senegalensis* in tropical and subtropical marine and estuarine areas, and is often confused in the West African estuaries of Benin and Nigeria. It has 17 to 19 branchiospines on the lower part of the first gill arch and 72 to 83 scales on the lateral line, adorned with unbranched tubules. Its flanks are silvery and shiny; the back is grey-black and the fins are all pale, tinged with yellow and more or less broadly edged with dark grey [27] [29] [30]. *Elopes* species reproduce at sea [31] [32] [33]. According to Beckley (1984) and McBride *et al.* (2001), juvenile fish ecophases take place in the low-salinity areas of estuaries without entering freshwater, but juveniles are capable of surviving hypersaline conditions. *E. lacerta* can withstand salinities ranging from 0 to 110 [34]. *E. lacerta* is a carnivorous species with piscivorous tendencies [35]. It is a marine-spawning species [36]. It generally develops rapidly in lagoons, where it is represented by its immature phasing. There is a positive correlation between age and length of fork in *E. lacerta* [35].

This study is based on an analysis including otolith shape and morphometric parameters (length, width, area, perimeter) of the otolith, as well as the morphological data of the fish. The aim of this study was to assess whether spatial variation in fluctuating asymmetry and differences in fish otolith shape could be exploited as a potential tool for differentiating fish stocks. This approach was intended to improve our understanding of the species' adaptability to various habitats, and to contribute to efforts to manage and conserve aquatic resources.

2. Material and Methods

2.1. Sampling Site

This comparative study examined the waters of the Porto-Novo lagoon, the Cotonou lagoon and Lake Nokoué (Figure 1). The Porto-Novo lagoon, covering an area of around 35 km², is located in southeastern Benin between parallels 6°25' and 6°30' North and meridians 2°30' and 2°38' East. Lake Nokoué lies between parallels 6°20' and 6°30' N and meridians 2°20' and 2°35'E. The Porto-Novo lagoon is located in the Ouémé department, between parallels 6°25' - 6°30' N and meridians 2°30' - 2°38'E. Both the Nokoué and Porto-Novo lagoons function as catchment basins for the waters of the Ouémé and Sô rivers. These two environments are interconnected and receive water inflows during low-water periods, when the Atlantic tides are strong. However, they become highly brackish for an extended period of 4 to 5 months each year. The Cotonou lagoon has a northern latitude of 6°22' and a longitude of 2°25'60" E. Benin's coastline, link-

ing the marine and coastal environment to the mainland, represents a transition zone where interactions between the Atlantic Ocean and the mainland are intensive. This part of southern Benin is home to several bodies of water in communication with the sea, geographically located between 1°20' and 3°00' E longitude and 3°00' and 6°40' N latitude.

2.2. Sampling

The sample totaled 260 individuals of *Elops lacerta*, distributed as follows: 64 from the Porto-Novo Lagoon, 62 from the Cotonou Lagoon, 74 from Lake Nokoué, and 60 from the Atlantic Sea. For each fish, the total length (TL \pm 0.1 cm) and the total weight (W \pm 0.1 g) were measured. (Table 1)

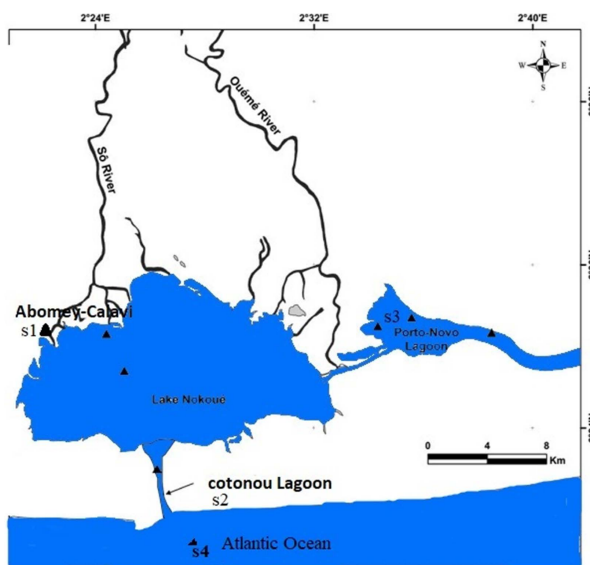


Figure 1. Map of *Elops lacerta* sampling sites (S1: Lake Nokoué; S2: Cotonou Lagoon, S3 Porto-Novo Lagoon, S4 Atlantic coast in southern Benin).

Table 1. Sampling information (total length and total weight) of *E. lacerta* in the Benin waters according to the sampling sites.

		Lagoon of Porto Novo	Lagoon of Cotonou	Lake Nokoué	Atlantic coast south of Benin
Standard Length (cm)	Mean \pm CV	23.0 \pm 2.87	25.0 \pm 3.13	22.65 \pm 1.91	35.36 \pm 1.83
	max	31.0	33.4	28.2	39.2
	min	16.6	19.2	18.0	30.0
Total Weight (g)	Mean \pm CV	60.5 \pm 24.8	74.2 \pm 31.3	53.7 \pm 15.2	256.7 \pm 128.7
	max	140	192	190	1178
	min	20	28	24	134

2.3. Of the Otolith and Image Processing

The present study was based on the *sagittae* (left and right inner sides). Extraction of this pair of otoliths (The left and right *sagittae*) was performed by cutting off the head and then removing the gills. The otoliths were collected with forceps, cleaned with distilled water, dried and preserved in Eppendorf tubes. The species name, area, and date of sampling were noted on a label adhered to the tube. Otoliths image acquisition was realized from a Canon powershot digital camera (12.1 Mega pixels) through a binocular microscope. Image processing of the whole otoliths was performed using Photoshop CS6 image processing software. In order to compare the shapes of the left and right otoliths, a mirror image of the left otolith was used.

2.4. Otoliths Shape Analysis

The otolith outline was described using Fourier elliptic analysis [37] on each otolith. The contour was delimited and extracted after image pre-processing leading to a transformation of the original image into a binary image. The OpenCV library was then used to detect the otolith contours in the pre-processed image. This enabled the shape of the otolith to be represented as accurately as possible. The coordinates (x, y) of the main contour describing the shape of the contour were extracted [38]. Elliptical Fourier analysis [37] was done on each otolith contour delimited and extracted after binarization of the image. For each otolith, the first 100 elliptical Fourier harmonics (H) were extracted and normalized with respect to the first harmonic and were therefore invariant to size, rotation and the starting point of the otolith contour description [39]. To determine the number of harmonics required to reconstruct the otolith contour, the cumulative Fourier power (F) was calculated for each individual otolith as a measure of the accuracy of the contour reconstruction obtained with n harmonics): nk harmonics (*i.e.* the proportion of variance in the contour coordinates explained by the k

$$F(nk) = \sum_{k=0}^{nk} \frac{Ai^2i + Bi^2 + Ci^2 + Di^2}{2}$$

where Ai , Bi , Ci and Di are the harmonic coefficients and nk is the total number of harmonics included.

The value of nk was chosen so that $F(nk)$ explains 99.99% of the variance in contour coordinates, *i.e.* it reconstructs the shape with 99.99% accuracy [37].

In the second part of the study, ImageJ software was used (using a predefined scale of 1 millimeter) to determine otolith biometric parameters (length (Lo), width (Wo), area (Ao) and perimeter (Po)).

Size parameters are measures directly related to otolith size, unlike shape indices, which are dimensionless measures and therefore independent of otolith size. The shape of the otolith relative to a geometric reference shape such as an ellipse for ellipticity (E), and a square for aspect ratio, was determined. They are simple to obtain, and the biological interpretation of the associated results is less complex than that of results obtained from multivariate data [18] [40].

3. Statistical Analysis

Length-weight relations in fish are considered to be allometric growth models of the type:

$$W = a \times TL^b$$

Three types of descriptors were analyzed, including otolith size parameters, shape indices (Ellipticity and aspect ratio), and EFDs.

The analysis focused on the asymmetry between left and right otolith shapes, examining the impact of the side on their morphology. To evaluate fluctuating asymmetry, the absolute value of the difference between the right and left sides for length, width, area and perimeter measurements was calculated. Then, the mean of the absolute value of the difference was calculated for each measurement. A Shapiro-Wilk normality test for each measurement was performed to assess the distribution of the data. Finally, a Student's t-test to determine whether the mean differs significantly from zero was performed. The percentage of asymmetry using the mean of the absolute difference of otolith size parameters and the mean of the right side for each species was calculated. Finally, whisker box plots for each measure (length, width, area and perimeter) as a function of species and sampling site selected to visualize data distributions were produced. Principal component analysis (PCA) was applied to an otolith size matrix and the elliptical Fourier descriptor (EFD) matrix [41]. It enabled us to reduce the data size of the elliptical Fourier descriptor (EFD) matrix while retaining as much information as possible, and to obtain a subset of the principal components. The selected principal components (PCs) can be used as shape descriptors of the otolith in our analysis [42]. Each principal component represents a specific shape feature. Then a matrix of the selected EFDs was created by organizing the selected elliptical Fourier descriptors into columns and the individual otoliths into rows [42]. Each cell of the matrix represents the value of the descriptor for a given otolith. For each pair of otoliths, the Euclidean distance was calculated.

A mixed-effects model was used to test the effects of inner ear side, sampling site, sex, fish size and fish weight on otolith shape, but also the effect of sampling site, sex and side on size parameters. Their interactions were also taken into account. Analysis of variance (ANOVA) was performed. Using the mixed-effects model. This statistic measures the difference between the estimated variance of the model's random effects and the residual variance (or error).

For a better estimate of the divergences between samples, we performed multivariate analyses treating all traits simultaneously. Linear discriminant analysis (LDA) is a statistical analysis commonly used for classification and dimension reduction [43]. It is used to extract discriminant information from multivariate data for classification.

Applied LDA is a classification algorithm that seeks to maximize the separation between classes using a linear combination of features.

LDA using geographical positions to define the groups to be tested revealed

principal components that significantly explained the variation in otolith shape. Canonical discriminant analysis (CDA) and mixed factorial discriminant analysis (MDFA) were then performed to assess the effect of gender, side and sampling site.

All statistical tests were performed using the following packages in a Python environment (Numpy, matplotlib, pyplot, Scikit-learn, Pandas, mapply, Plotnine, Plydata, statsmodels, seaborn, scipy) [44].

4. Results

4.1. Relations between Length and Weight of Fish

The relationship between fish length and fish weight (**Figure 2**) varied considerably from site to site. Lagoon Porto-Novo and Lake Nokoué show a strong linear relationship between these two variables, with a large proportion of the variability explained. The Atlantic Sea, on the other hand, shows a very weak and insignificant relationship.

4.2. Relations between Fish Size and Otolith Morphometrics

The correlation between total fish length and otolith size (Supplementary Appendix **Table S1**), examined at several fishing sites, reveals significant variations in the strength of this relation from one site to another. In particular, at Lake Nokoué, the correlation is remarkably robust, indicating a significant influence of otolith length on total fish length (**Figure 3**). In the South Atlantic coast of Benin, on the other hand, the correlation is lower, indicating a less significant contribution of otolith size to variation in total fish length. Data analysis reveals a significant relation between total fish length and otolith length, with substantial

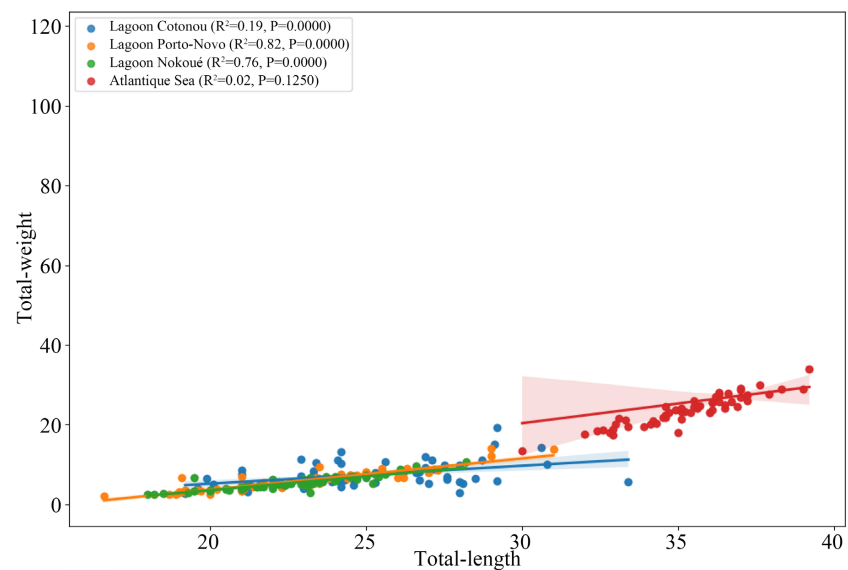


Figure 2. Regression showing the correlation between a fish total length (TL) and weight (W).

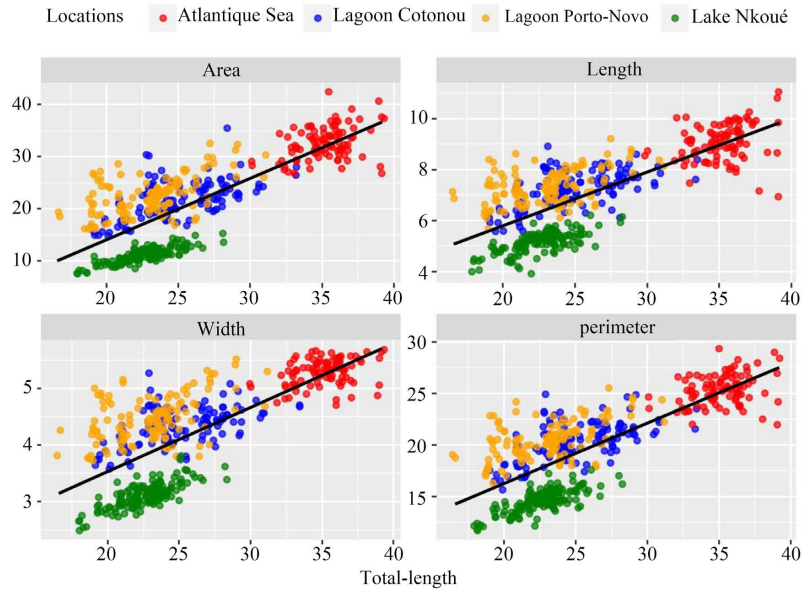


Figure 3. Regression showing the correlation between fish size and otolith morphometrics (A: Area; B: Length; C: Width; D: Perimeter).

variation in this relation according to the fishing site. The other otolith variables (width, area, perimeter) also have significant relationships with total fish length, but their impact also varies from site to site.

a) Analysis of Euclidean Distances

The analysis of Euclidean distances between the right and left sides at the different study sites offers interesting insights into ecological symmetry or asymmetry in the ecosystems examined. Average distances vary from site to site, reflecting different levels of similarity between the right and left sides.

b) Mixed-Effect Linear Analysis

At Lagoon Cotonou and Lake Nokoué, mean distances are relatively low (4.49 and 4.17 respectively), indicating some regularity or similarity between the sides. These results suggest ecological consistency, although local variations may also be present.

In contrast, the Lagoon Porto-Novo and southern Atlantic coast sites show higher mean distances (6.17 and 6.26 respectively), suggesting greater disparity between the right and left sides. These results could indicate greater ecological variation or significant differences between habitats on these two sides.

The results of analysis of variance (ANOVA) tests for different morphological variables (Length, Width, Area, Perimeter) as a function of the Sites:Side and Sites:Sex factors (Table 2) reveal that for Length, the Sites:Side factor (P -value > 0.05), while the Sites:Sex factor shows a tendency towards significance (P -value approaching 0.06). As for width, the Sites:Side factor shows no significant difference, but the Sites:Sex factor is significant (P -value < 0.05). Finally For Area and Perimeter, neither the Sites:Side nor Sites:Sex factors show significant differences.

4.3. Analysis of Otolith Fluctuating Asymmetry

Wilcoxon analysis was used to estimate asymmetries in otolith size (length, width, area, perimeter) at various study sites (Supplementary Appendix **Table S2**). The results show that there are disparities between right and left (**Figure 4**) otolith lengths in the Lake Nokoué and Cotonou lagoons ($p < 0.05$), while the Porto-Novo (0.071) and Atlantic coast (0.480) lagoons show no significant difference. Lake Nokoué and the Atlantic coast reveal a significant fluctuating asymmetry in width ($p < 0.05$), suggesting significant variations between these sites. On the other hand, no significant difference was found in the Porto-Novo (0.899) and Cotonou lagoons (0.422). For otolith surface area, Lake Nokoué,

Table 2. Linear mixed model on biometric data.

Otolith parameters		sum_sq	df	F	P-value
Length	Sites:Side	1.844	3.0	1.493	2.153e-01
	Sites:Sex	2.657	3.0	2.485	0.060
Width	Sites:Side	0.676	3.0	1.783	1.492e-01
	Sites:Sex	8.726e-01	3.0	2.761	0.041
Area	Sites:Side	35.607	3.0	1.181	3.161e-01
	Sites:Sex	6.667e+01	3.0	2.488	6.003e-02
Perimeter	Sites:Side	35.607	3.0	1.181	3.161e-01
	Sites:Sex	1.583e+01	3.0	2.045	0.107

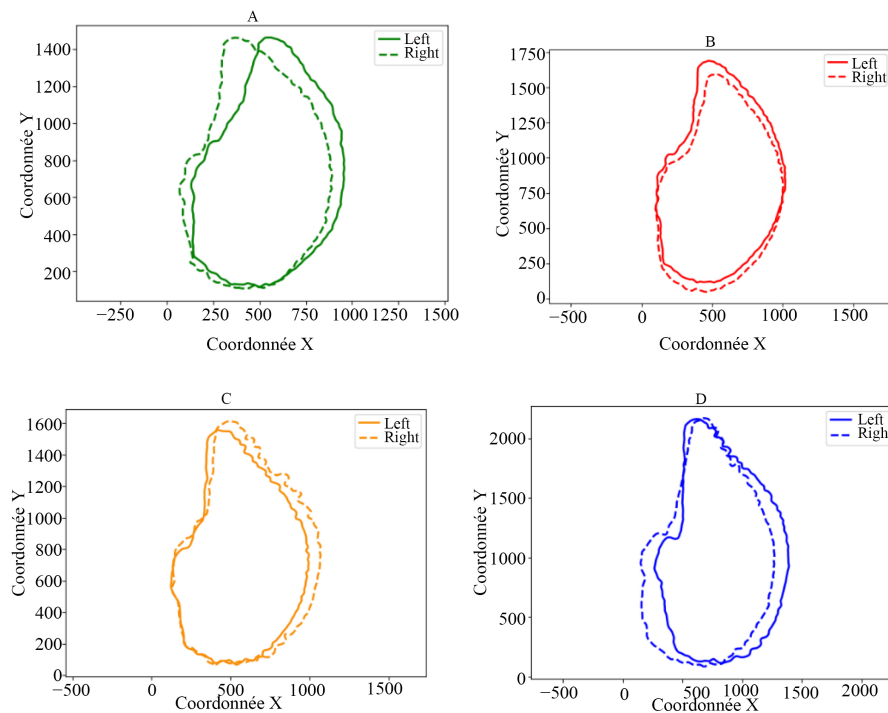


Figure 4. Difference between the mean shapes of the reconstructed left and right otoliths at each station (A: Porto Novo Lagoon, B: Cotonou Lagoon, C: Lake Nokoué, D: Atlantic coast).

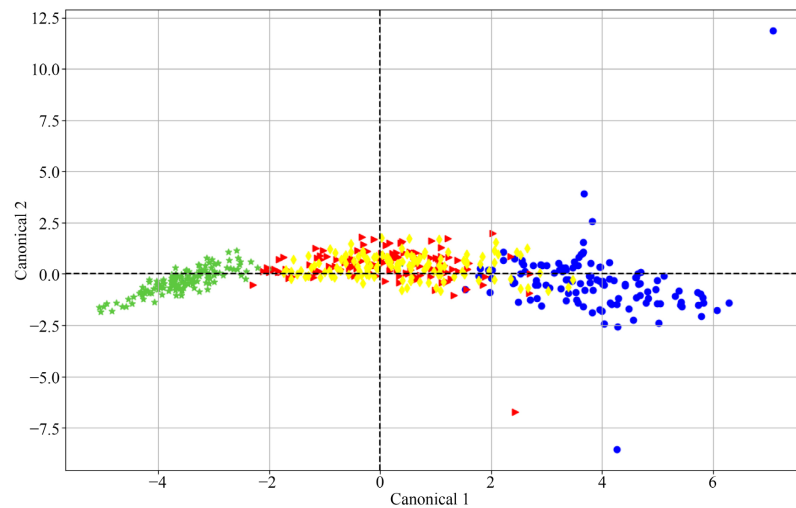


Figure 5. Canonical Discriminant Analysis with the first two canonical variables of the biometric parameters for 4 classes (Lake Nokoué (green), Porto-Novo Lagoon (yellow), Cotonou Lagoon (red), Atlantic Coast (blue)).

Cotonou Lagoon and the Atlantic coast showed significant fluctuating asymmetry ($p < 0.05$), highlighting differences between these sites.

Analysis of Otolith Characteristic Variations

ANOVA results indicate that otolith length, width and area are variables that significantly differ between groups ($p < 0.05$). Width and area appear to be particularly important in discriminating between groups as a function of the independent variable. Perimeter also shows a significant but less pronounced difference (Supplementary Appendix [Table S3](#)).

The graphical representation of the first two canonical variables of the biometric parameters ([Figure 5](#)) offers a significant visualization of the complex relationships between these variables. The scattering of points in the graph indicates a grouping of the two lagoon environments.

The absence of a statistically significant Mantel correlation (-0.20) with a p -value greater than 0.05 suggests that no clear association was identified between the Mahalanobis distances of otolith biometric parameters and geographical differences. In other words, spatial variation in otolith biometric characteristics does not appear to be closely related to the geographical differences examined in this analysis.

4.4. Otolith Shape Analysis

The results of the analysis of variance (ANOVA) reveal that height, weight and side have significant effects ($p < 0.05$) on otolith shape variation, while gender shows no significant difference ($p = 0.31$). The various interactions between these variables are presented in the table, along with F-statistics, explained variability and corresponding p -values.

The interaction between gender and sites shows no significant difference ($p =$

0.233). For the interaction between side and sites, although the p-value is slightly above the traditional threshold ($p = 0.084$), it indicates a trend towards significance. Finally, the interaction between length and sites shows ($p > 0.05$), also suggesting a trend towards significance, albeit just above the standard threshold.

These results suggest subtle relationships between the biological characteristics studied and otolith shape (**Table 3**).

The MANOVA analysis (Supplementary Appendix **Table S4**) suggests that there are significant differences between the different sites ($p < 0.0001$). The graphical representation of the first two canonical variables of the morphological parameters (**Figure 6**) offers a significant visualization of the complex relationships in otolith shape at each site. The dispersion of points in the graph clearly indicates a distinct grouping of the two lagoon environments, the lake environment and the marine environment.

The Mantel correlation between the mahalanobis distance of morphological parameters and geographic distance is -0.34 , with a $p > 0.05$. This correlation is not statistically significant, meaning that there is no clear association detected between the two data sets. In other words, there is no significant linear relationship between the observations of the two datasets.

Table 3. Mixed linear shape model.

	sum_sq	df	F	P-value
Sex:Sites	35.732	3.0	1.427	0.233
Side:Sites	54.591	3.0	2.225	0.084
Length:Sites	61.469	3.0	2.470	0.060

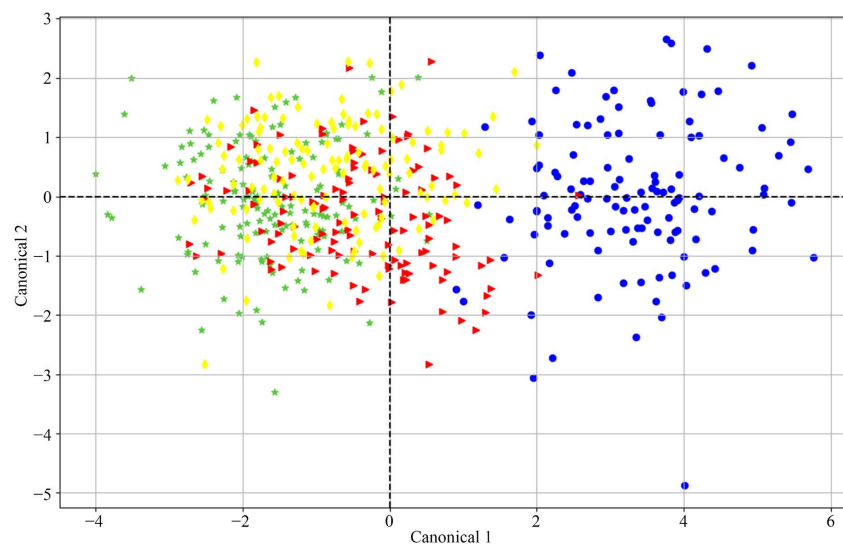


Figure 6. Canonical Discriminant Analysis with the first of two canonical otolith shape variables for 4 classes (Lake Nokoué (green), Porto-Novo Lagoon (yellow), Cotonou Lagoon (red), Atlantic Coast (blue)).

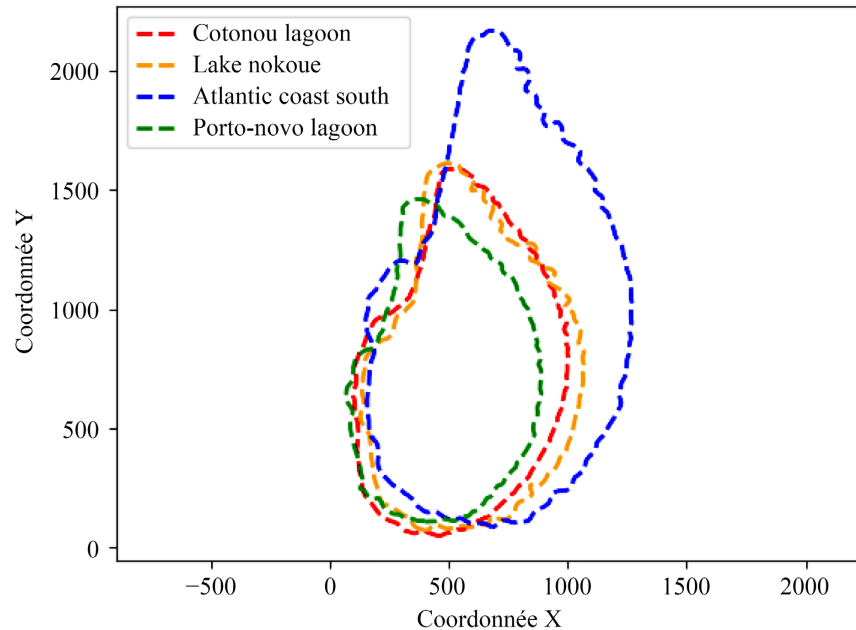


Figure 7. Difference in mean shapes of reconstructed right otoliths between the four sites used for *Elops lacerta* identification.

Dendrogram analysis based on Euclidean distance reveals (Supplementary Appendix **Figure S1**) distinct groupings between the sites studied. More specifically, the Porto lagoon and Lake Nokoué are grouped on the same branch, indicating a higher morphometric similarity between these two sites. The Cotonou lagoon follows this grouping, showing an affinity with the Porto lagoon and Lake Nokoué. In contrast, the sea is separated from these three sites, forming a distinct branch, highlighting significant differences in otolith morphology between marine and lagoon environments. This organization of the dendrogram suggests structured relationships between sites in terms of otolith morphometric variability.

The lowest Width/Length ratio is associated with the “Atlantic Sea” class, with a value of 0.59. Otoliths from the Porto Novo lagoon were closer to those from Lake Nokoué, which in turn were closer to those from the Cotonou lagoon (**Figure 7**). The amplitudes of directional asymmetry at all sites, measured as the percentage of non-overlapping area between right and left otolith shape, averaged 6.793%, 6.921, 5.627% and 5.181% respectively for *E. lacerta* individuals sampled on the southern Atlantic coast, in Lake Nokoué and in the Cotonou and Porto-Novo lagoons). These mean values show a significant directional asymmetry for *E. lacerta*.

5. Discussion

The present study has shown that the *Elops lacerta* population differs by geographical area. Overall, the results are coherent with those of previous studies on pelagic fish species [45] [46]. The results of our analysis reveal substantial varia-

tion in the relationship between otolith morphology and fish biological parameters at different study sites, demonstrating the importance of taking local variability into account in these aquatic ecosystems.

The linear relation observed between fish length and weight in the Porto-Novo lagoon and Lake Nokoué suggests a significant correlation between these two parameters at these sites. In contrast, the southern Atlantic coast shows a weak, non-significant relation. These differences could be attributed to variations in environmental conditions, such as the availability of food resources [47]. The significant variation in the influence of otolith biometric parameters on the total fish length between sites suggests a differentiated morphological response of the *Elops lacerta* species to the local environment.

This first study of the morphology of *Elops lacerta* otoliths at different sites in Benin provides crucial information on ecological relationships in these aquatic ecosystems. Analysis of the asymmetry between the right and left sides revealed that the differences observed could be linked to specific environmental conditions, such as the availability of food resources, water quality or other ecological factors [6]-[52]. This type of asymmetry is very common in biology, and represents developmental instability, *i.e.* the inability of an organism to produce a regular phenotype under several stress conditions [50] [51] [52] [53]. Fluctuating asymmetry, defined as random deviations from perfect symmetry between the left and right otoliths, has been reported for some species of roundfish and flatfish [22]-[56]. The significant variations in fluctuating otolith asymmetry between sites underline the morphological plasticity of the *Elops lacerta* species. These differences could be influenced by local selective pressures, such as predation, competition or site-specific environmental conditions [19]. However, the fluctuating asymmetry detected within each site for any biometric parameter (length, width, area, perimeter) could be explained by the vulnerability of this trait to immediate changes in environmental factors, such as pollution, extreme physical conditions and habitat quality [57] [58] [59]. In the same context, some works have published the presence of a fluctuating asymmetry between the two sides of the otoliths, right and left, and have suggested this variability to numerous biotic and abiotic factors and explained that these factors can be a tool to measure developmental instability [60] [61].

In biology, symmetry in bilaterally symmetrical organisms such as vertebrates is so consistent that it is generally regarded as the norm, supported by homeostatic processes [62]. Symmetry between the left and right otoliths, showing the two strictly similar parts of the vestibular system, has been observed in *Gadus morhua* [7]-[63], *Coryphaena hippurus* [64], *Xiphias gladius* [65], *Scomber scombrus* [8], *Melanogrammus aeglefinus* [12], *Mullus barbatus* [12], *Clupea harengus* [61] and *Lutjanus kasmira* [65]. Directional asymmetry has been measured for several fish species. This directional asymmetry of otoliths, showing lateralisation, was observed for the round fish *Liza ramada* [66], *Diplodus annularis* [67], *Scomberomorus niphonius* [68] and *Merlangius merlangus* [61] *Solea solea* [9], *Pleuronectes platessa* [12], *Limanda limanda* [61] and *Lepi-*

dorhombus whiffiagonis [60]. This study identified a directional asymmetry in the shape of the otoliths of *Elops lacerta*. Sex, weight, size and their interaction were analyzed to assess sources of uncertainty and reveal actual differences in otolith shape between the four sampling sites. The results obtained suggest its utility as a stock differentiation tool. The results of the otolith shape analysis suggest its potential use as a stock differentiation tool. Asymmetry in otolith shape was observed both within and between populations. These results showed the significant impact of size, weight and side on variation in otolith shape, suggesting that factors intrinsic to the fish, such as its size or weight, could play a crucial role in determining otolith morphology [6]. Volpedo and Echeverria (2003), have also confirmed this hypothesis. There is no difference in otolith shape between the sexes. This result has already been proven in Atlantic mackerel *Scomber scombrus* [8], Atlantic cod (*Gadus morhua* [49]) and blue whiting (*Micromesistius poutassou* [42]). Differences in environmental conditions can have a considerable influence on otolith growth and, consequently, on the shape of the otoliths formed [69]. The shape of sagittas is conservative enough and reflects many life histories to be considered specific [70] [71]. Its capacity for morphological variability is considerable and strongly influenced by biotic and abiotic parameters [72] [73]. In addition, the composition of the diet in terms of essential polyunsaturated fatty acid concentration affects endolymph composition and thus generates shape variability. The composition of the alimentary bolus explains otolith shape variation better than the amount of food ingested by the animal [61]. The importance of otolith shape analysis goes beyond differentiation, as it also enables us to understand the events that influence the life history of each individual [73] [74]. Mentel's test indicates that spatial variability in otolith characteristics does not necessarily follow geographical differences. This could be due to active fish migration or to local adaptations independent of geography.

In conclusion, this study contributes significantly to the discrimination of *Elops lacerta* sampled at different sites. The asymmetry found between the right and left otoliths validates previous research findings on stock distinction, using otolith morphology and biometric parameters. Understanding the variability of morpho-biological relationships is crucial for aquatic resource management.

6. Conclusion

This study makes a significant contribution to the discrimination of *Elops lacerta* populations at different sites. The asymmetries observed between otoliths validate the potential use of morphology and biometric parameters to differentiate stocks. Understanding the variability of morpho-biological relationships is essential for effective management of aquatic resources.

Acknowledgements

I would like to express my sincere gratitude to Dr. Kakpo Césaire, CEO of K-

POLYGONE multinational, for the financial support you provided for my research work. Your interest and encouragement were essential elements that enriched this experience.

This work has benefited also from the grant “ANR-21-EXES-0011” as part of the IFSEA graduate school (which originates from the National Research Agency under the Investments for the Future program).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

References

- [1] Villanueva, M.C. (2004) Biodiversity and Trophic Relationships in Some Estuarine and Lagoon Environments of West Africa: Adaptations to Environmental Pressures. Ph.D. Thesis, Institut national polytechnique de Toulouse, Toulouse.
- [2] Ben Bouih, H., Nassali, H., Leblans, M. and Srhiri, A. (2004) Contamination en métaux traces des sédiments du lac Fouarat. *Afrique Science. Revue Internationale des Sciences et Technologie*, **1**, 109-125. <https://doi.org/10.4314/afsci.v1i1.35403>
- [3] Chao, L.N. (1978) A Basis for Classifying Western Atlantic Sciaenidae (Teleostei: Perciformes). NOAA Technical Report NMFS Circular.
- [4] Mahé, K., Ider, D., Massaro, A., Hamed, O., Jurado-Ruzafa, A., Goncalves, P., *et al.* (2019) Directional Bilateral Asymmetry in Otolith Morphology May Affect Fish Stock Discrimination Based on Otolith Shape Analysis. *ICES Journal of Marine Science*, **76**, 232-243. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsy163>
- [5] Bolles, K.L. and Begg, G.A. (2000) Distinctions between Silver Hake (*Merluccius bilinearis*) Stocks in U.S. Waters of the Northwest Atlantic Based on Whole Otolith Morphometric. *Fishery Bulletin*, **98**, 451-462.
- [6] Campana, S.E. and Casselman, J.M. (1993) Stock Discrimination Using Otolith Shape Analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**, 1062-1108. <https://doi.org/10.1139/f93-123>
- [7] Cardinale, M., Doering-Arjes, P., Kastowsky, M. and Mosegaard, H. (2004) Effects of Sex, Stock, and Environment on the Shape of Known-Age Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **61**, 158-167. <https://doi.org/10.1139/f03-151>
- [8] Castonguay, M., Simard, P. and Gagnon, P. (1991) Usefulness of Fourier Analysis of Otolith Shape for Atlantic Mackerel (*Scomber scobrus*) Stock Discrimination. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **48**, 296-302. <https://doi.org/10.1139/f91-041>
- [9] Merigot, B., Letourneur, Y. and Lecomte-Finiger, R. (2007) Characterization of Local Populations of the Common Sole *Solea solea* (Pisces, Soleidae) in the NW Mediterranean through Otolith Morphometrics and Shape Analysis. *Marine Biology*, **151**, 997-1008. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0549-0>
- [10] Mejri, M., Trojette, M., Allaya, H., Ben Faleh, A., Jmil, I. and Chalh, A. (2018) Use of Otolith Shape to Differentiate Two Lagoon Populations of *Pagellus erythrinus* (Actinopterygii: Perciformes: Sparidae) in Tunisian Waters. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, **48**, 153-161. <https://doi.org/10.3750/AIEP/02376>
- [11] Begg, G.A. and Brown, R.W. (2000) Stock Identification of Haddock *Melanogram-*

- mus aeglefinus* on the Georges Bank Based on Otolith Shape Analysis. *Transactions of the American Fisheries Society*, **129**, 935-945. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(2000\)129<0935:SIOHMA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(2000)129<0935:SIOHMA>2.3.CO;2)
- [12] Mille, T., Mahe, K., Villanueva, M.C., De Pontual, H. and Ernande, B. (2015) Sagittal Otolith Morphogenesis Asymmetry in Marine Fishes. *Journal of Fish Biology*, **87**, 646-663. <https://doi.org/10.1111/jfb.12746>
- [13] Lombarte, A. and Leonart, J. (1993) Otolith Size Changes Related with Body Growth, Habitat Depth and Temperature. *Environmental Biology of Fishes*, **37**, 297-306. <https://doi.org/10.1007/BF00004637>
- [14] Ben Labidi, M., Mejri, M., Shahin, A., Quignard, J.P., Trabelsi, M. and Ben Faleh, A. (2020) Asymetrie fluctuante des otolithes dans les *Boops boops* (actinopterygii, sparidae) de deux stations marines (bizerte et kelibia) dans les eaux tunisiennes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **100**, 2-16. <https://doi.org/10.1017/S0025315420001022>
- [15] Paxton, J.R. (2000) Fish Otoliths: Do Sizes Correlate with Taxonomic Group, Habitat and/or Luminescence? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **355**, 1299-1303. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0688>
- [16] Tuset, V.M., Lombarte, A., Gonzalez, J.A., Pertusa, J.F. and Lorente, M.J. (2003) Comparative Morphology of the Sagittal Otolith in *Serranus* spp. *Journal of Fish Biology*, **63**, 1491-1504. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2003.00262.x>
- [17] Lombarte, A. and Cruz, A. (2007) Otolith Size Trends in Marine Fish Communities from Different Depth Strata. *Journal of Fish Biology*, **71**, 53-76. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01465.x>
- [18] Stransky, C. and MacLellan, S.E. (2005) Species Separation and Zoogeography of Redfish and Rockfish (Genus *Sebastes*) by Otolith Shape Analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **62**, 2265-2276. <https://doi.org/10.1139/f05-143>
- [19] Hüssy, K. (2008) Otolith Shape in Juvenile Cod (*Gadus morhua*): Ontogenetic and Environmental Effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **364**, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.06.026>
- [20] Leonart, J., Salat, J. and Torres, G.J. (2000) Removing Allometric Effects of Body Size in Morphological Analysis. *Journal of Theoretical Biology*, **205**, 85-93. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2000.2043>
- [21] Downhower, J.F., Blumer, L.S., Lejeune, P., Gaudin, P., Marconato, A. and Bisazza, A. (1990) Otolith Asymmetry in Cottus Bairdi and Cottus Gobio. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, **37**, 209-220.
- [22] Lemberget, T. and McCormick, M.I. (2009) Replenishment Success Linked to Fluctuating Asymmetry in Larval Fish. *Oecologia*, **159**, 83-93. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1212-x>
- [23] DiAz-Gil, C., Palmer, M., Catalan, I.A., Alos, J., Fuiman, L.A., Garcia, E., Del Mar Gil, M., *et al.* (2015) Otolith Fluctuating Asymmetry: A Misconception of Its Biological Relevance? *ICES Journal of Marine Science*, **72**, 2079-2089. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsv067>
- [24] Green, A.A., Mosaliganti, K.R., Swinburne, I.A., Obholzer, N.D. and Megason, S.G. (2017) Recovery of Shape and Size in a Developing Organ Pair. *Developmental Dynamics*, **246**, 451-465. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24498>
- [25] Bird, J.L., Eppler, D.T. and Checkley Jr., D.M. (1986) Comparison of Herring Otoliths Using Fourier Series Shape Analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **43**, 1228-1234. <https://doi.org/10.1139/f86-152>

- [26] Begg, G.A. and Brown, R.W. (2000) Stock Identification of Haddock *Melanogrammus aeglefinus* on the Georges Bank Based on Otolith Shape Analysis. *Transactions of the American Fisheries Society*, **129**, 935-945. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(2000\)129<0935:SIOHMA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(2000)129<0935:SIOHMA>2.3.CO;2)
- [27] Adams, A.J., Horodysky, A.Z., McBride, R.S., Guindon, K., Shenker, J., MacDonald, T.C., *et al.* (2013) Global Conservation Status and Research Needs for Tarpons (Megalopidae), Ladyfishes (Elopidae) and Bonefishes (Albulidae). *Fish and Fisheries*, **15**, 280-311.
- [28] Levesque, J. (2010) Habitat Use Patterns of Juvenile Ladyfish (*Elopes saurus*) in Florida (USA) Estuaries. *Wildlife Biology in Practice*, **6**, 39-56. <https://doi.org/10.2461/wbp.2010.6.4>
- [29] Agboola, J.I. and Anetekhai, M.A. (2008) Length-Weight Relationships of Some Fresh and Brackish Water Fishes in Badagry Creek, Nigeria. *Journal of Applied Ichthyology*, **24**, 623-625. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01079.x>
- [30] Abowei, J.F.N. (2010) The Condition Factor, Lengthweight Relationship and Abundance of *Elops seneganensis* (Regan, 1909) from Nkoro River, Niger Delta, Nigeria. *Advance Journal of Food Science and Technology*, **2**, 16-21.
- [31] Ugwumba, O.A. (1989) Distribution and Growth Pattern of the Ten-Pounder (Val.) in the Freshwater, Estuarine and Marine Environments of Lagos, Nigeria. *Archiv für Hydrobiologie*, **115**, 451-462. <https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/115/1989/451>
- [32] Aceves-Medina, G., Jim Enez-Rosenberg, S.P.A. and Hinojosa-Medina, A. (2003) Fish Larvae from the Gulf of California. *Scientia Marina*, **67**, 1-11. <https://doi.org/10.3989/scimar.2003.67n11>
- [33] Tzeng, W.N., Chen, H.L. and Teng, H.Y. (2005) The Recruitment Dynamic of *Elops hawaiiensis* Leptocephalus in Gongshytyan Creek Estuary of Northern Taiwan. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*, **32**, 129-130.
- [34] Pandare, D. and Tamoikine, M.Y. (1997) Etude de l'ichthyoplancton dans les eaux cotieres et estuariennes bordees de mangroves en afrique de l'ouest, guineeetsen egal. In: Kjerfve, B., Drude De Lacerda, L. and El Hadji Salif, D., Eds., *Mangrove Ecosystem Studies in Latin America and Africa*, UNESCO, Paris, 241-263.
- [35] Hie-Dare, J.P. (1982) Croissance de la phase lagunaire de *Elops lacerta*. Documents Scientifiques, Centre de Recherches Océanologiques, Abidjan (Côte d'Ivoire).
- [36] Albaret, J.J. (1987) Les peuplements de poissons de la casamance (senegal) en periode de secheresse. *Revue d'hydrobiologie tropicale*, **20**, 291-310.
- [37] Lestrel, P.E. (1997) Fourier Descriptors and Their Applications in Biology. Cambridge University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511529870>
- [38] Andrialovanirina, N., Caillault, É.P., Couette, S., Laffont, R., Poloni, L., Lutet-Toti, C. and Mahé, K. (2023) Asymmetry of Sagittal Otolith Shape Based on Inner Ear Side Tested on Mediterranean Red Mullet (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758): Comparative Analysis of 2D and 3D Otolith Shape Data. *Symmetry*, **15**, Article 1067. <https://doi.org/10.3390/sym15051067>
- [39] Kuhl, F. and Giardina, C. (1982) Elliptic Fourier Features of a Closed Contour. *Computer Graphics and Image Processing*, **18**, 236-258. [https://doi.org/10.1016/0146-664X\(82\)90034-X](https://doi.org/10.1016/0146-664X(82)90034-X)
- [40] Cadrin, S.X. and Friedland, K.D. (1999) The Utility of Image Processing Techniques for Morphometric Analysis and Stock Identification. *Fisheries Research*, **43**, 129-139. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(99\)00070-3](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(99)00070-3)

- [41] Rohlf, F.J. and Archie, J.W. (1984) A Comparison of Fourier Methods for the Description of Wing Shape in Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Systematic Biology*, **33**, 302-317. <https://doi.org/10.2307/2413076>
- [42] MahE, K., Evano, H., Mille, T., Muths, D. and Bourjea, J. (2016) Otolith Shape as a Valuable Tool to Evaluate the Stock Structure of Swordfish *Xiphias gladius* in the Indian Ocean. *African Journal of Marine Science*, **38**, 457-464. <https://doi.org/10.2989/1814232X.2016.1224205>
- [43] Allam, N. (2018) Application de l'analyse discriminante lineaire (lda) dans la reconnaissance du visage. Memoire de fin D'etude.
- [44] Boschetti, A. and Massaron L. (2016) Python Data Science Essentials. 2nd Edition, Springer, Dordrecht.
- [45] Moreira, C., Froufe, E., Vaz-Pires, P. and Correia, A.T. (2019) Otolith Shape Analysis as a Tool to Infer the Population Structure of the Blue Jack Mackerel, *Trachurus picturatus*, in the NE Atlantic. *Fisheries Research*, **209**, 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2018.09.010>
- [46] Muniz, A.A., Moura, A., Triay-Portella, R., Moreira, C., Santos, P.T. and Correia, A.T. (2020) Population Structure of the Chub Mackerel (*Scomber colias*) in the North-East Atlantic Inferred from Otolith Shape and Body Morphometrics. *Marine and Freshwater Research*, **72**, 341-352. <https://doi.org/10.1071/MF19389>
- [47] Ndour, F., Le Loc'H, O.T., Thiaw, J.M. and Laë, R. (2011) Étude du régime alimentaire de deux espèces de Cichlidae en situation contrastée dans un estuaire tropical inverse d'Afrique de l'Ouest (Casamance, Sénégal) [Study of the Diet of Two Species of Cichlidae in Contrasting Situation in a West African (Casamance, Senegal) Inverse Tropical Estuary]. *Journal des Sciences Halieutiques et Aquatiques*, **4**, 120-133.
- [48] Torres, G.J., Lombarte, A. and Morales-Nin, B. (2000) Sagittal Otolith Size and Shape Variability to Identify Geographical Intraspecific Differences in Three Species of Genus *Merluccius*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **80**, 333-342. <https://doi.org/10.1017/S0025315499001915>
- [49] Cardinale, M., Doerin-Arjes, P., Kastowsky, M. and Mosegaard, H. (2004) Effects of Sex, Stock, and Environment on the Shape of Known-Age Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **61**, 158-167. <https://doi.org/10.1139/f03-151>
- [50] Gagliano, M. and McCormick, M.I. (2004) Feeding History Influences Otolith Shape in Tropical Fish. *Marine Ecology Progress Series*, **278**, 291-296. <https://doi.org/10.3354/meps278291>
- [51] Swan, S.C., Geffen, A.J., Morales-Nin, B., Gordon, J.D.M., Shimmield, T., Sawyer, T. and Massuti, E. (2006) Otolith Chemistry: An Aid to Stock Separation of *Helicolenus dactylopterus* (Bluemouth) and *Merluccius merluccius* (European Hake) in the Northeast Atlantic and Mediterranean. *ICES Journal of Marine Science*, **63**, 504-513. <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2005.08.012>
- [52] Vignon, M. and Morat, F. (2010) Environmental and Genetic Determinant of Otolith Shape Revealed by a Non-Indigenous Tropical Fish. *Marine Ecology Progress Series*, **411**, 231-241. <https://doi.org/10.3354/meps08651>
- [53] GrønkJaer, P. and M.K. (2003) Fluctuating Asymmetry and Nutritional Condition of Baltic Cod (*Gadus morhua*) Larvae. *Marine Biology*, **143**, 191-197. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1064-1>
- [54] Lychakov, D.V. and Rebane, Y.T. (2005) Fish Otolith Mass Asymmetry: Morphometry and Influence on Acoustic Functionality. *Hearing Research*, **201**, 55-69.

- <https://doi.org/10.1016/j.heares.2004.08.017>
- [55] Lychakov, D.V., Rebane, Y.T., Lombarte, A., Demestre, M. and Fuiman, L.A. (2008) Saccular Otolith Mass Asymmetry in Adult Flatfishes. *Journal of Fish Biology*, **72**, 2579-2594. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01869.x>
- [56] Lychakov, D. (2013) Behavioral Lateralization and Otolith Asymmetry. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **49**, 441-456. <https://doi.org/10.1134/S0022093013040099>
- [57] Møller, A.P. and Shykoff, J.A. (1999) Morphological Developmental Stability in Plants: Patterns and Causes. *International Journal of Plant Sciences*, **160**, S135-S146. <https://doi.org/10.1086/314219>
- [58] Cañas, L., Stransky, C., Schlickeisen, J., Sampedro, M.P. and Fariña A.C. (2012) Use of the Otolith Shape Analysis in Stock Identification of Anglerfish (*Lophius piscatorius*) in the Northeast Atlantic. *ICES Journal of Marine Science*, **69**, 250-256. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fss006>
- [59] Al-Rasady, I.H., Jawad, L.A., Al-Mamry, J.M., Al-Mamari, H.M., Al-Yarubi, M. and Mamary, D.S. (2010) Fluctuating Asymmetry in the Otolith Length and Width of Rhynchorhamphus Georgi (Valenciennes, 1846) (Family: Hemiramphidae) Collected from the Sea of Oman. *Museo Civico di Storia Naturale—Ferrara*, **13**, 85-89.
- [60] Jawad, L.A. and Al-Mamry, J.M. (2012) Relationship between Fish Length and Otolith Dimensions in the Carangid Fish (*Carangoides Coeruleopinnatus* (Rüppell, 1830)) Collected from the Sea of Oman. *Journal of Fisheries Sciences.com*, **6**, 203-208.
- [61] Mille, T. (2015) Sources de variation intra-populationnelle de la morphologie des otolithes: Asymétrie directionnelle et régime alimentaire. Master's Thesis, Université de Lille, Villeneuve-d'Ascq.
- [62] Palmer, A.R. (2009) Animal Asymmetry. *Current Biology*, **19**, 473-477. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.006>
- [63] Petursdottir, G., Begg, G.A. and Marteinsdottir, G. (2006) Discrimination between Icelandic Cod (*Gadus morhua* L.) Populations from Adjacent Spawning Areas Based on Otolith Growth and Shape. *Fisheries Research*, **80**, 182-189. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.05.002>
- [64] Duarte-Neto, P., Lessa, R., Stosic, B. and Morize, E. (2008) L'utilisation d'otolithes sagittaux dans la discrimination des stocks de coryphènes communes (*Coryphaena hippurus*) au large du nord-est du Brésil à l'aide de descripteurs multifformes *ICES Journal of Marine Science*, **65**, 1144-1152. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsn090>
- [65] Mahé, K., Oudard, C., Mille, T., Keating, J., Goncalves, P., Worsoe Clausen, L., *et al.* (2016) Identifying Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*) Stock Structure in the Northeast Atlantic by Otolith Shape Analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **73**, 1-10. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2015-0332>
- [66] Rebaya, M., Ben Faleh, A.R., Allaya, H., Khedher, M., Trojette, M., Marsaoui, B., Fatnassi, M., Chalh, A., Quignard, J.P. and Trabelsi, M. (2017) Otolith Shape Discrimination of *Liza ramada* (Actinopterygii: Mugiliformes: Mugilidae) from Marine and Estuarine Populations in Tunisia. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, **47**, 13-21. <https://doi.org/10.3750/AIEP/02006>
- [67] Trojette, M., Ben Faleh, A., Fatnassi, M., Marsaoui, B., Mahouachi, N.H., Chalh, A., Quignard, J.P. and Trabelsi, M. (2015) Stock Discrimination of Two Insular Populations of *Diplodus annularis* (Actinopterygii: Perciformes: Sparidae) along the Coast of Tunisia by Analysis of Otolith Shape. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, **45**,

- 363-372. <https://doi.org/10.3750/AIP2015.45.4.04>
- [68] Zhang, C., Ye, Z., Li, Z., Wan, R., Ren, Y. and Dou, S. (2016) Population Structure of Japanese Spanish Mackerel *Scomberomorus niphonius* in the Bohai Sea, the Yellow Sea and the East China Sea: Evidence from Random Forests Based on Otolith Features. *Fisheries Science*, **82**, 251-256. <https://doi.org/10.1007/s12562-016-0968-x>
- [69] Campana, S.E. and Neilson, J.D. (1985) Microstructure of Fish Otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **42**, 1014-1032. <https://doi.org/10.1139/f85-127>
- [70] Abée-Lund, J.H. (1988) Otolith Shape Discriminates between Juvenile Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., and Brown Trout, *Salmo trutta* L. *Journal of Fish Biology*, **33**, 899-903. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05538.x>
- [71] Tuset, V.M., Rosin, P.L. and Lombarte, A. (2006) Sagittal Otolith Shape Used in the Identification of Fishes of the Genus *Serranus*. *Fisheries Research*, **81**, 316-325. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.06.020>
- [72] Monteiro, L.R., Di Benedetto, A.P.M., Guillermo, L.H. and Rivera, L.A. (2005) Allometric Changes and Shape Differentiation of Sagittal Otoliths in Sciaenid Fishes. *Fisheries Research*, **74**, 288-299. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2005.03.002>
- [73] Reichenbacher, B., Feulner, G.R. and Schulz-Mirbach, T. (2009) Geographic Variation in Otolith Morphology among Freshwater Populations of *Aphanius dispar* (Teleostei, Cyprinodontiformes) from the Southeastern Arabian Peninsula. *Journal of Morphology*, **270**, 469-484. <https://doi.org/10.1002/jmor.10702>
- [74] Campana, S.E. and Thorrold, S.R. (2001) Otoliths, Increments, and Elements: Keys to a Comprehensive Understanding of Fish Populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **58**, 30-38. <https://doi.org/10.1139/f00-177>

Appendix

Table S1. Regression results for biometric data.

Species	Variable	R-Squared	P-Value
1) Lagoon Cotonou	Length	0.312310	1.528003e-11
2) Lagoon Cotonou	Width	0.288971	1.214285e-10
3) Lagoon Cotonou	Area	0.336841	1.607686e-12
4) Lagoon Cotonou	Perimeter	0.348560	5.330115e-13
5) Lagoon Porto-Novu	Length	0.212284	4.435396e-08
6) Lagoon Porto-Novu	Width	0.225754	1.453738e-08
7) Lagoon Porto-Novu	Area	0.292954	4.215640e-11
8) Lagoon Porto-Novu	Perimeter	0.271582	2.852656e-10
9) Lake Nokoué	Length	0.477551	2.474792e-22
10) Lake Nokoué	Width	0.579334	3.039971e-29
11) Lake Nokoué	Area	0.686779	1.248478e-38
12) Lake Nokoué	Perimeter	0.557913	1.162805e-27
13) Atlantique Sea	Length	0.054956	2.295220e-02
14) Atlantique Sea	Width	0.092842	2.826567e-03
15) Atlantique Sea	Area	0.130784	3.418303e-04
16) Atlantique Sea	Perimeter	0.086244	4.068379e-03

Table S2. P-value of asymmetry fluctuating between right and left.

SITES	P VALUE			
	LN	LP	LC	AS
Length	0.0009 ***	0.071	0.007***	0.480
Width	3.66e-08***	0.899	0.422	7.57e-05***
Area	1.79e-12***	0.859	0.018**	0.0002***
Perimeter	4.21e-08***	0.373	0.0003***	0.005***

Table S3. ANOVA results for otolith length, width and surface area between groups.

Parameter	Wilks L.	Partial L.	F	P-Value
Length	0.106	0.977	3.95	<0.0001
Width	0.119	0.865	26.57	<0.0001
Area	0.119	0.869	25.757	<0.0001
Perimeter	0.105	0.978	3.75	<0.0001

Table S4. MANOVA of principal components.

	Value	DF	F Value	P Value
Wilks' Lambda	0.19	39.00	27.77	<0.0001
Pillai's Trace	0.87	39.00	16.12	<0.0001
Hotelling-Lawley Trace	3.64	39.00	47.01	<0.0001
Roy's Greatest Root	3.54	13.00	137.87	<0.0001

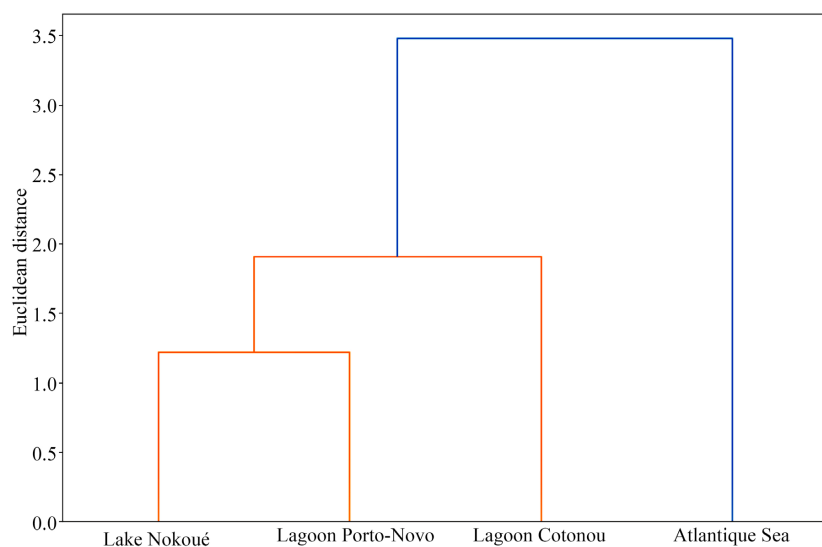


Figure S1. Dendrogram of studied sites.

6.2 Annexe 2 : Asymétrie des otolithes du *Pseudotolithus senegalensis*

Analysis of Otolith Shape as a Tool for Discriminating Stocks of Cassava Croaker (*Pseudotolithus senegalensis*) in Beninese Waters

Madel Floriane Adjibayo Houeto^{1*}, Marius Sounouvou², Malek Tazarki¹, Nicolas Andrialovanirina³, Meriam Ben Ghorbel¹, Marwa Mejri¹, Pierre Dossou-Yovo⁴, Abdellah Chalh⁵, Jean-Pierre Quignard⁶, Kélig Mahé³, Monia Trabelsi¹

¹Laboratory of Ecology, Biology and Physiology of Aquatic Organisms, Faculty of Sciences of Tunis, University of Tunis El Manar, Tunis, Tunisia

²Institute of Mathematics and Physical Sciences, University of Abomey-Calavi (UAC), Abomey-Calavi, Benin

³Fisheries Resources Laboratory, Unit HMMN, French Institute for Ocean Science (IFREMER), Boulogne-sur-Mer, France

⁴Laboratory for Research into the Processing and Conservation of Fishery Products (LAREPROH), University of Abomey Calavi (UAC), Abomey-Calavi, Bénin

⁵Unit of Population Genetics and Biological Resources, Faculty of Sciences of Tunis, University of Tunis El Manar, Tunis, Tunisia

⁶Ichthyology Laboratory, Montpellier University II, Montpellier, France

Email: *houetoflori@gmail.com

How to cite this paper: Houeto, M.F.A., Sounouvou, M., Tazarki, M., Andrialovanirina, N., Ghorbel, M.B., Mejri, M., Dossou-Yovo, P., Chalh, A., Quignard, J.-P., Mahé, K. and Trabelsi, M. (2024) Analysis of Otolith Shape as a Tool for Discriminating Stocks of Cassava Croaker (*Pseudotolithus senegalensis*) in Beninese Waters. *Open Journal of Marine Science*, **14**, 96-114. <https://doi.org/10.4236/ojms.2024.144006>

Received: June 19, 2024

Accepted: October 28, 2024

Published: October 31, 2024

Copyright © 2024 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

This study examined the right and left otoliths of 174 individuals of *Pseudotolithus senegalensis* from the Porto-Novo lagoon, Lake Nokoué and the Atlantic coast. The results show a significant variation in the population according to geographic location. Mixed-effects linear analysis showed no significant variation by site, side or sex ($p > 0.05$). Analysis of otolith shape using ANOVA showed significant differences for length, width and area ($p < 0.05$), but not for perimeter ($p > 0.05$). Canonical discriminant analysis revealed significant differences between sites ($p < 0.05$). Finally, shape analyses showed significant differences between sites ($p = 0.0001$) and between right and left sides ($p = 0.007$), but no difference by sex ($p = 0.395$). The study of otolith morphology is therefore proving to be a valuable tool for differentiating stocks and understanding ecological variations.

Keywords

Otoliths, *Pseudotolithus senegalensis*, Factorial Analysis, Porto-Novo Lagoon, Atlantic Coast and Lake Nokoué

1. Introduction

Total local production from marine, river, lagoon and lake fisheries is insufficient to meet the demand of the Beninese population. Artisanal fisheries mainly catch species with a high market value, such as Sciaenidae (21.75%), Polynemidae (8.77%), Lutjanidae (5.52%) and Sparidae (4.07%) [1]. The Sciaenidae are a diverse and abundant family of fish closely related to snappers, but they are distinguished by a short spiny dorsal fin and much longer adipose fin than anal fin, which has only one or two spines [2]. This family includes a large diversity of fishes, such as curvins, drum fishes, meagre fishes and weak fishes. It comprises around 70 genera and 270 species, 14 of which are sampled along the Gulf of Guinea, on the coast of West Africa [2]. The genus *Pseudotolithus senegalensis* (Valenciennes, 1833), belonging to the family Sciaenidae, represents an abundant and economically important group of fish in the coastal waters of Benin [3]-[5], and along the Atlantic coast of West Africa [6].

In tropical waters, it is particularly difficult to determine the age of fish from otoliths because of the similarity of the seasons throughout the year. The otolith is a mineral formation found in the vestibular organ of the inner ear. The sensory structures of the inner ear include the utricle, saccule and *lagena*, with individual otoliths: the *lapillus*, *sagitta* and *astericus* [7]. These otoliths are metabolically inert, meaning that they cannot be modified or generally resorbed [8]. Several studies have exploited otoliths as tools in the field of fisheries science [9]. These formations are considered to be natural archives, permanently preserving information about the environment, past climate and the life history of the individual. Their form has proved useful in fish age studies [10]-[12], ontogenetic processes [13] and the spatial and temporal migrations of fish [14].

Sagittal otoliths show relatively higher inter- and intra-specific variability in terms of shape and size. This makes them effective for identifying fish species [15]-[17], populations [18] and stocks [12]-[20]. In addition, genetic and exogenous factors such as water temperature, salinity, depth and food supply have some influence on otolith morphological variability [21]-[23]. Our aim here is to assess the morphometric and morphological variability of *P. senegalensis* otoliths in lagoon and marine environments.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

This comparative study was carried out at three different locations: the Porto-Novo lagoon, Lake Nokoué and the coast of Benin on the Atlantic Ocean (Figure 1). The Porto-Novo lagoon, covering an area of approximately 35 km², is located in south-east Benin between latitudes 6°25' and 6°30' North and longitudes 2°30' and 2°38' East. Lake Nokoué lies between latitudes 6°20' and 6°30' North and longitudes 2°20' and 2°35' East. These two environments are receptacles for the waters of the Ouémé and Sô rivers, and they communicate with each other, especially

during the low-water period when Atlantic tides are strong. The coast of the Atlantic, south of Benin, comprises various bodies of water in communication with the sea, located between 1°20' and 3°00' East longitude and 3°00' and 6°40' North latitude. The sample totaled 174 individuals of *Pseudotolithus senegalensis*, distributed as follows: 50 from the Porto-Novo Lagoon, 62 from Lake Nokoué, 62 from the Atlantic coast (**Table S1**). Each individual was sampled with measures of total length (TL \pm 0.1 cm) and total weight (W \pm 0.1 g).

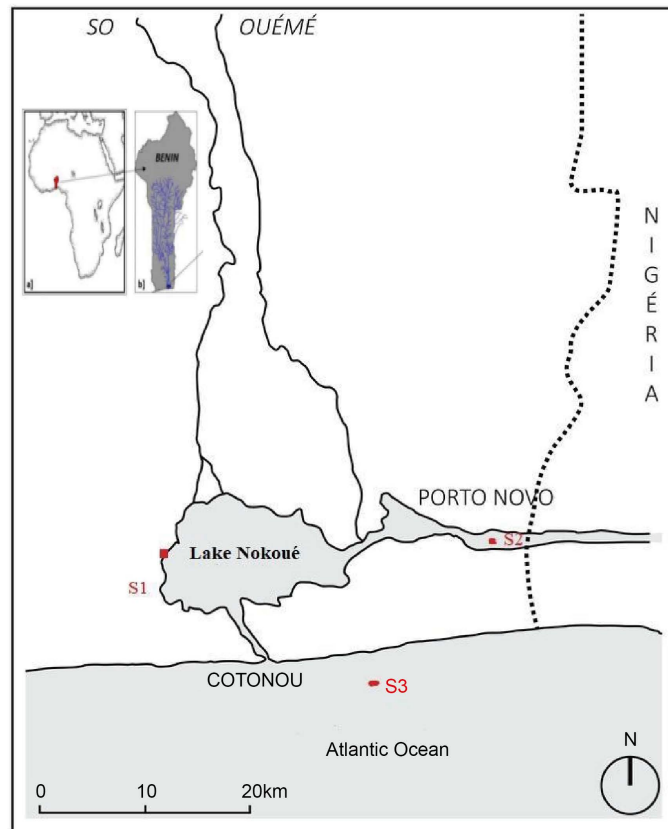


Figure 1. Map of *Pseudotolithus senegalensis* sampling locations (S1: Lake Nokoué; S2: Porto-Novo Lagoon, S3: Atlantic coast).

2.2. Extraction of the Otolith and Image Processing

Extraction of each pair of otoliths (the left and right sagittal otoliths) was performed by cutting off the head and then removing the gills. The otoliths were collected with forceps, cleaned with distilled water, then dried and preserved in Eppendorf tubes. The species name, area, and date of sampling were noted on a label adhered to the tube. Otolith images were acquired using a Canon powershot digital camera (12.1 mega pixels) through a binocular microscope. Image processing of the whole otoliths was performed using photoshop CS6 image processing software. In order to compare the shapes of the left and right otoliths, a mirror image of the left otolith was used.

2.3. Otoliths Shape Analysis

The otolith outline was described using Fourier elliptic analysis [24] on each otolith. The contour was delimited and extracted after image pre-processing leading to a transformation of the original image into a binary image. The OpenCV library was then used to detect the otolith contours in the pre-processed image. This enabled the shape of the otolith to be represented as accurately as possible. The coordinates (x, y) of the main contour describing the shape of the contour were extracted [25]. Elliptical Fourier analysis [24] was carried out on each otolith outline and extracted after binarization of the image. For each otolith, the first 100 elliptical Fourier harmonics (H) were extracted and normalized with respect to the first harmonic and were therefore invariant to size, rotation and the starting point of the otolith contour description [26]. To determine the number of harmonics required to reconstruct the otolith contour, the cumulative Fourier power (F) was calculated for each individual otolith as a measure of the accuracy of the contour reconstruction obtained with n harmonics: n_k harmonics (*i.e.*, the proportion of variance in the contour coordinates explained by the k

$$F(n_k) = \sum_{i=0}^{n_k} \frac{Ai^2 + Bi^2 + Ci^2 + Di^2}{2}$$

where Ai , Bi , Ci and Di are the harmonic coefficients and n_k is the total number of harmonics included. The value of n_k was chosen so that $F(n_k)$ explains 99.99% of the variance in contour coordinates, *i.e.* it reconstructs the shape with 99.99% accuracy [24]. In the second part of the study, ImageJ software was used (using a predefined scale of 1 millimeter) to determine otolith biometric parameters (length (Lo), width (Wo), area (Ao) and perimeter (Po)). Size parameters are measures directly related to otolith size, unlike shape indices, which are dimensionless measures and therefore independent of otolith size. The shape of the otolith relative to a geometric reference shape such as an ellipse for ellipticity (E), and a square for aspect ratio, was determined. They are simple to obtain, and the biological interpretation of the associated results is less complex than that of results obtained from multivariate data [27] [28].

2.4. Statistical Analysis

Length-weight relationships in fish are considered to be allometric growth models of the type:

$$\text{Total Weight} = K \times \text{Total Length}^b$$

The parameters of such a model are estimated by linear regression on data that have undergone a log-log transformation:

$$\text{Log}(\text{Total Weight}) = \text{Log}(K) + b \times \text{Log}(\text{Total Length}).$$

Three types of descriptors were analyzed, including otolith size parameters (Length: Lo ; Width: Wo ; Perimeter: Po ; Area: Ao), shape indices (Ellipticity and Aspect Ratio), and EFDs. The analysis focused on the asymmetry between left and right otolith shapes, examining the impact of side on their morphology. To evaluate

fluctuating asymmetry, the absolute value of the difference between the right and left sides for length, width, area and perimeter measurements was calculated. Then, the mean of the absolute value of the difference was calculated for each measurement. A Shapiro-Wilk normality test for each measurement was performed to assess the distribution of the data. Finally, a student's t test to determine whether the mean differs significantly from zero was performed. The percentage of asymmetry using the mean of the absolute difference of otolith size parameters and the mean of the right side for each species was calculated. Finally, whisker box plots for each measure (length, width, area and perimeter) as a function of species and sampling site selected were produced to visualize data distributions. Principal component analysis (PCA) was applied to an otolith size matrix and the Elliptical Fourier Descriptor (EFD) matrix [29], enabling reduction of the data size of EFD matrix while retaining as much information as possible, and acquisition of a subset of the principal components. The selected principal components (PCs) can be used as shape descriptors of the otolith in the analysis [30], where each principal component represents a specific shape feature. Then a matrix of the selected EFDs was created by organizing the selected elliptical Fourier descriptors into columns and the individual otoliths into rows [30]. Each cell of the matrix represents the value of the descriptor for a given otolith. For each pair of otoliths, the Euclidean distance was then calculated. A mixed-effects model was used to test the effects of inner ear side, sampling site, sex, fish size and fish weight on otolith shape, but also the effect of sampling site, sex and side on size parameters (Length; Width; Perimeter; Area). Their interactions were also taken into account. Analysis of variance (ANOVA) was performed. using the mixed-effects model. This statistic measures the difference between the estimated variance of the model's random effects and the residual variance. For a better estimate of the divergences between samples, multivariate analyses were performed treating all traits simultaneously. Linear discriminant analysis (LDA) is a statistical analysis commonly used for classification and dimension reduction [31]. It is used to extract discriminant information from multivariate data for classification. Applied LDA is a classification algorithm that seeks to maximize the separation between classes using a linear combination of features. LDA using geographical positions to define the groups to be tested revealed principal components that significantly explained the variation in otolith shape. Canonical discriminant analysis (CDA) and mixed factorial discriminant analysis (MDFFA) were then performed to assess the effect of sex, side and sampling site. All statistical tests were performed using the following packages in a python environment Numpy [32], matplotlib [32], pyplot, Scikit-learn [32], Pandas, mapply, Plotnine, Plydata, statsmodels [32], seaborn, scipy [32].

3. Results

3.1. W-TL Relationship

The relationship between total weight and total length of fish was examined at different locations, including the Porto-Novo lagoon, Lake Nokoué and the coast

of the Atlantic Ocean (**Figure 2**). The results showed significant differences in the length-weight relationship between the three sites studied. Lake Nokoué showed the most robust correlation, followed by the coast of the Atlantic Ocean, while the Porto-Novo lagoon showed the weakest correlation.

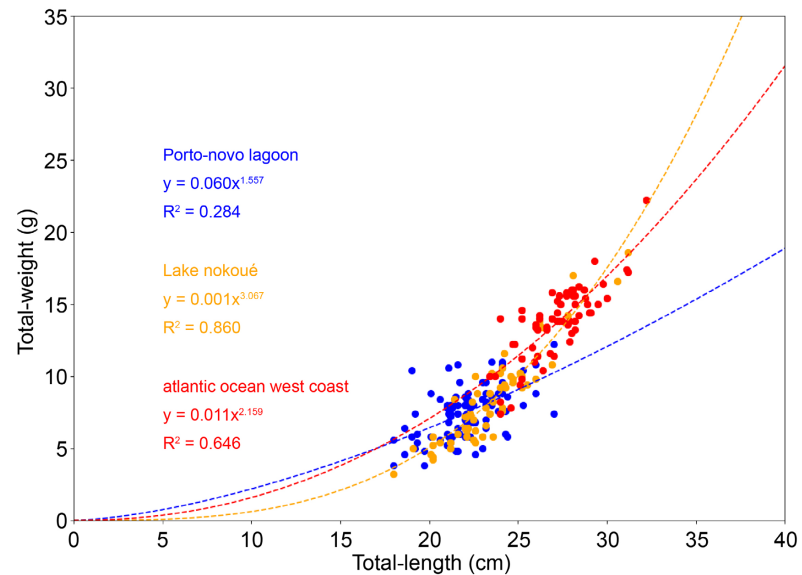


Figure 2. The length-weight relationship of *Pseudotolithus senegalensis* according to the sampling area, each point represents an individual fish.

3.2. TL-Otolith Measurements Relationship

The relationship between total fish length and the different otolith measurements varied considerably between locations (**Table S2**). **Figure 3** shows various morphometric measurements (length, width, area, perimeter, aspect ratio and ellipticity) as a function of total length for different aquatic sites: Porto-Novo lagoon, Lake Nokoué and the coast of the Atlantic Ocean. The Porto-Novo lagoon shows the highest dispersion with weak or moderate exponential trends. Differences between right and left are minimal. As for Lake Nokoué, there are well-defined exponential trends in all the morphometric measurements, with clear differences between right and left. This suggests a stronger correlation between measurements and total length at this site. Finally, for the coast of the Atlantic Ocean, the clusters of points are more scattered and showed few clear trends, while the differences between right and left are also minimal.

3.3. Effect of Various Factors on the Biometric Parameters of Otoliths

The results of the linear mixed-effects analysis (**Table 1**) examining the effect of site, side and sex on different otolith measurements, such as length, width, area and perimeter, indicate that these otolith characteristics did not vary significantly according to location, side and sex ($p > 0.05$).

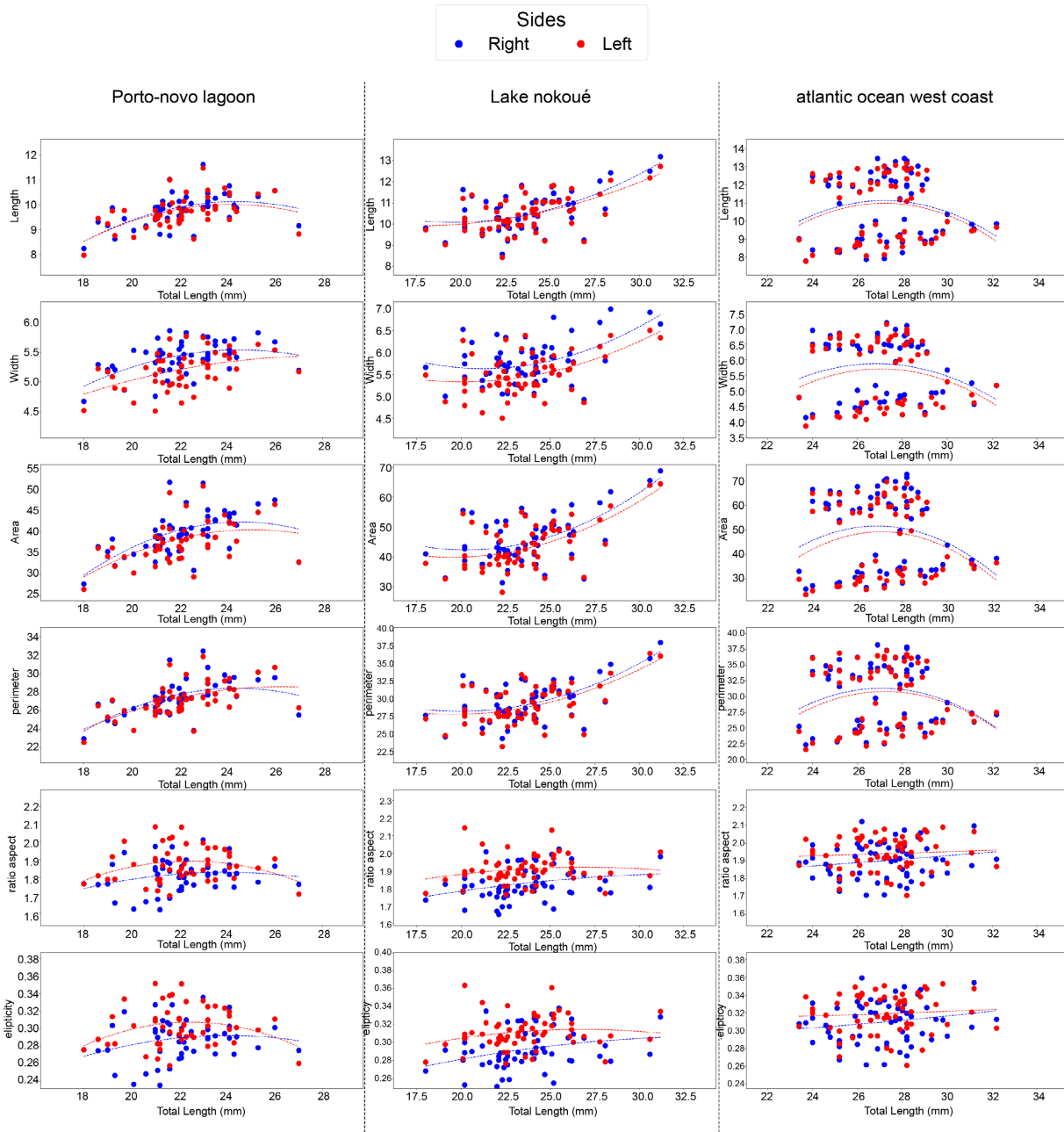


Figure 3. Regression showing the correlation between fish size and otolith morphometrics for right (blue) and left (red) otoliths.

Table 1. Results of linear mixed model by each otolith morphological descriptor with the interaction between location and inner ear side and sex of *Pseudotolithus senegalensis*.

Otolith Parameters		sum_sq	Df	F	P-value
Length	Location:Side	0.124	2	0.040	0.960
	Location:Sex	0.393	2	0.127	0.880
Width	Location:Side	0.147	2	0.153	0.857
	Location:Sex	0.189	2	0.193	0.823

Continued

Area	Location:Side	6.170	2	0.02	0.973
	Location:Sex	52.353	2	0.224	0.799
Perimeter	Location:Side	0.941	2	0.036	0.963
	Location:Sex	2.186	2	0.085	0.918

3.4. Analysis of Fluctuating Otolith Asymmetry

Analysis of the asymmetry percentages (Supplementary Appendix **Table S3**) by parameter and by site revealed interesting variations in otolith symmetry between the different localities studied (**Figure 4**). For otolith width, the Porto-Novo lagoon showed an average asymmetry percentage of 4.12%, while the coast of the Atlantic Ocean and Lake Nokoué showed slightly different values, with 3.60% and 4.85% respectively. There are also differences between locations in terms of otolith surface area. The Porto-Novo lagoon has an average asymmetry percentage of 4.66%, while the coast of the Atlantic Ocean has the highest level of asymmetry at 5.78%, and Lake Nokoué has an intermediate value of 4.58%. Similar trends were observed for otolith perimeter and length. The coast of the Atlantic Ocean has the largest percentage of asymmetry, followed closely by the Porto-Novo lagoon, while Lake Nokoué has the lowest values.

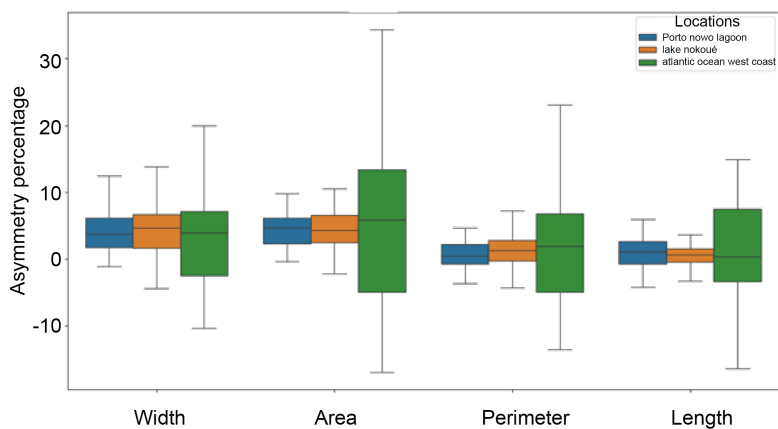


Figure 4. boxplot percentage asymmetry of otolith biometric parameters by each sampling location.

Wilcoxon analysis was used to estimate otolith size asymmetries (length, width, area, perimeter) in the different study locations (**Table S4**). The results showed that at the Atlantic Ocean coast, there were significant differences between the areas and widths of otoliths on the right and left sides ($p < 0.05$), but no significant differences were observed for length and perimeter ($p > 0.05$).

As for Porto-Novo Lagoon, the results showed significant differences in all otolith characteristics between the right and left sides ($p < 0.05$), suggesting a marked asymmetry in the otoliths of fish from this site. Finally, at Lake Nokoué, analyses

indicated significant differences between the length, perimeter, width and area of otoliths on the right and left sides ($p < 0.05$), suggesting a pronounced asymmetry in the otoliths *Pseudotolithus senegalensis* of Lake Nokoué (Figure 5).

The results of the ANOVA indicate that otolith length, width and surface area are variables that differ significantly between groups ($p < 0.05$). The perimeter showed a p-value of 0.45, suggesting a non-significant relationship (Supplementary Appendix Table S5, Supplementary Appendix Figure S1).

3.5. Analysis of Otolith Shape

The results of the analysis of variance (ANOVA) reveal that the interaction of size, weight and side with site have significant effects ($p < 0.05$) on variation in otolith shape. The interaction between sex and site did not show a significant difference ($p > 0.05$). The different interactions between sex, fish length and fish weight as a function of site are presented in Table 2, with the corresponding F statistics, variability explained and p-values.

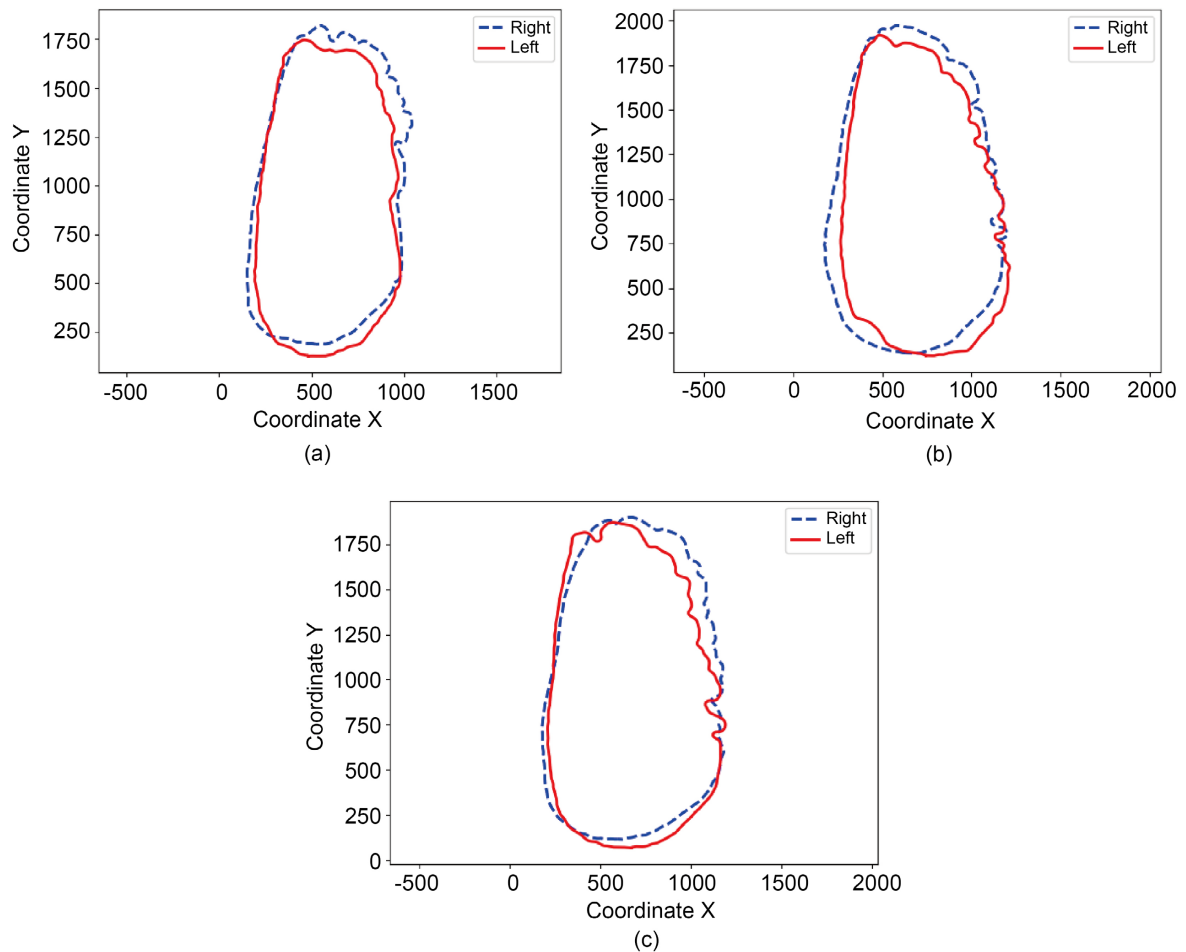


Figure 5. Difference between the mean shapes of the reconstructed left and right otoliths at each station ((a): Lake Nokoué, (b): Atlantic coast, (c): Porto-Novo Lagoon).

Table 2. Mixed linear shape model on otolith morphological parameters.

	sum_sq	df	F	P-value
Sex: locations	4.169e+04	3	1.257	0.285
Side: locations	1.420e+05	3	4.447	0.012
Length: locations	1.016e+05	3	3.859	0.046
Weight: locations	1.263e+05	3	3.859	0.022

The effect of sampling location on otolith shape was significant in the multivariate mixed-effects model (**Table S6**, **Table S7**), suggesting variation in otolith shape that could be used to discriminate between individuals from different stations. The multivariate mixed-effects model on the *S* shape matrix showed that there was a significant difference between left and right otoliths ($p < 0.05$) when considering sampling locations, but no difference between individuals according to sex ($p > 0.05$). After PCA on the Fourier elliptical descriptors (FED), the first two PCs performed (**Figure S2**) explained 82% of the total variance of the FED.

The lowest width/length ratio is associated with the “Atlantic coast” class, with a value of 0.52. Otoliths from the Porto Novo lagoon are closer to those from Lake Nokoué, which are themselves closer to those from the Porto Novo lagoon (**Figure 6**). The magnitudes of directional asymmetry at all locations, measured as the percentage of the surface not overlapping between the shape of the right otolith and that of the left otolith, were on average 10.78%, 4.56% and 4.53% respectively for *Pseudotolithus senegalensis* individuals sampled on the Atlantic coast, in Lake Nokoué and in the Porto-Novo lagoons). These mean values showed a significant directional asymmetry for *Pseudotolithus senegalensis*.

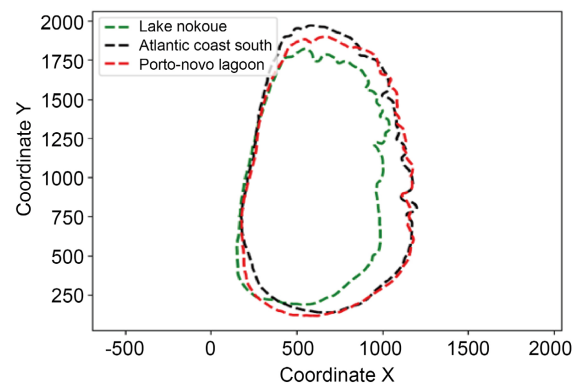


Figure 6. Difference in mean shapes of reconstructed right otoliths between the three locations used for *Pseudotolithus senegalensis* identification.

4. Discussion

4.1. Impact of the Weight-Length Relationship on the Population of *Pseudotolithus senegalensis* According to Sampling Location

The results of this study indicated that the population of *Pseudotolithus*

senegalensis varies according to geographical area. The Porto-Novo lagoon and the Atlantic coast show cases of positive allometry, with different degrees of growth between the weight and length of the fish. Troadec (1971) and Sun (1975) drew similar conclusions concerning the length-weight relationships of *P. senegalensis* in Congo and Senegal respectively, showing positive allometric growth. This observation contrasts with the results of Sossoukpe *et al.* (2013) who found isometric growth for *P. senegalensis* in Beninese water bodies, but is similar to those of Adjigbe *et al.* (2023) also in Beninese water bodies. In fact, length-weight relationships do not remain uniform throughout the year, but show variations influenced by factors such as food availability, feeding rate, gonad development and the physiological state of the animal, as indicated by Santos *et al.* (2002).

4.2. Influence of Environmental Factors on Otolith Growth

The fluctuation in the relationship between total fish length and various otolith measurements across different geographical locations reveals complex dynamics, suggesting a strong influence on the specific geographical location. The results indicate that the relationship is most robust and significant in the Porto-Novo lagoon, with significant correlations for measures such as otolith length and width, as well as otolith area. This finding suggests that otolith growth and development are closely related to total fish length in this specific environment. However, this relationship loses its strength and significance in other locations such as Lake Nokoué and the coast of the Atlantic Ocean. In these regions, the correlation between total fish length and otolith characteristics is less significant or even weak. For example, although the relationship is significant for the otolith perimeter in the Porto-Novo lagoon, it is less marked in the other locations studied. According to Taylor 1985, given that calcium absorption and serum calcium levels are associated, there is a biological justification for associating changes in fish size with otolith growth. Conceptually, daily variations in fish size are associated with the amplitude of a period of CaCO_3 deposition (*i.e.* the area under a peak). Thus, otolith growth is determined by the period of deposition, and each period amplitude can be linked to the age and size of the fish. In all cases, the allometry is positive. This indicates that otolith characteristics increase in proportion to the total length of the fish. Such results have been published by several authors who have provided evidence of the allometric growth of otoliths [13]-[38]. To begin with, the differences observed in the width of the otoliths between the locations suggest variations in the symmetry of this anatomical feature. The Porto-Novo lagoon has a slightly higher average percentage of asymmetry than the coast of the Atlantic Ocean and Lake Nokoué. This could reflect differences in selective pressures or environmental conditions specific to each site, potentially influencing the growth and development of otoliths. The origin and consequences of fluctuating otolith asymmetry in fish remain largely unknown and debated, although it has been documented in several fish species and is regularly associated with stress and/or environmental heterogeneity, and therefore considered an indicator of developmental

instability. These results reveal the importance of interactions between several factors, such as size, weight, side and site, on variation in otolith shape in *Pseudotolithus senegalensis*, whereas no influence was observed for the morphometric parameter. They also show the potential of otolith shape as a marker to discriminate between individuals from different stations and suggest promising avenues for future research into the biology and ecology of this species. In our case study, no effect of sex was observed. It has previously been shown that sexual dimorphism has no effect on otolith shape in swordfish, Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* [35]), haddock (*Melanogrammus aeglefinus* [39]), Atlantic cod (*Gadus morhua* [40]) or blue whiting (*Micromesistius poutassou* [30]).

4.3. Multifactorial Interactions on Otolith Shape

The shape of otoliths in fish from different geographical origins is influenced by a combination of abiotic environmental factors, such as temperature and salinity, and biotic factors, such as the availability of prey. Moreover, this form also depends on the individual genotype of the fish [41]-[45]. In addition, ontogenic changes in otolith configuration, often assessed through variations associated with size, have been observed to result from the diversity of growth rates as a function of habitat quality and development processes [46] [47].

4.4. Directional Asymmetry between Sites

Analysis of the amplitudes of directional asymmetry reveals significant differences between locations. Individuals sampled on the Atlantic coast show significantly higher directional asymmetry than those sampled in Lake Nokoué and the Porto-Novo lagoons. This observation may indicate differences in environmental constraints or growth patterns that influence otolith symmetry in *Pseudotolithus senegalensis* in these different habitats. Our results show that DA can be observed in otolith shape in round fish such as *Pseudotolithus senegalensis*. DA between right and left otolith shapes has already been described for other roundfish species such as *Liza ramada* [48], *Diplodus annularis* [49], *Diplodus puntazzo* [50], *Clupea harengus* [51] and *Scomberomorus niphonius*. Otoliths from the Porto-Novo lagoon appear to be closer to those from Lake Nokoué, and vice versa, than those collected on the Atlantic coast. This similarity between otolith shapes in lagoons and lakes may reflect similar environmental conditions or comparable growth patterns in these coastal and freshwater habitats, as opposed to the more contrasting marine environment of the southern Atlantic coast.

5. Conclusion

This study revealed variations in the shape of otoliths of *Pseudotolithus senegalensis* across different locations, notably the Porto-Novo lagoon, Lake Nokoué and the Atlantic coast. Analyses revealed that the relationship between otolith morphometric measurements and total fish length was most robust and significant in the Porto-Novo lagoon, moderate on the Atlantic coast, and weak in Lake Nokoué.

Site, side or sex factors had no effect on the biometric parameters. Canonical discriminant analysis showed significant differences between sites, indicating the influence of the environment on otolith shape.

Acknowledgments

We would like to express our sincere gratitude to Dr Kakpo Césaire, CEO of K-POLY-GONE multinational, for the financial support you provided for this research work. Your interest and encouragement were essential elements that enriched this experience.

This work has benefited also from the grant “ANR-21-EXES-0011” as part of the IFSEA graduate school (which originates from National Research Agency under the Investments for the Future program).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

References

- [1] Anato, C.B. (1996) Les ressources marines vivantes du Golfe de Guinée de la Guinée Conakry à l'Angola: Cas du Bénin. *Atelier Sous Régional du Comité Océ-anographique International UNESCO*, Cotonou, 5-7 juin 1996, 43.
- [2] Edwards, A.J., Gill, A.C. and Abohweyere, P.O. (2001) A Revision of Irvine' Marine Fishes of Tropical West Africa. *Darwin Initiative Report*, **2**, 157.
- [3] Gbaguidi, A. (2000) Statistiques de la pêche maritime artisanale. Direction des Pêches, p. 40.
- [4] Gbaguidi, A. (2001) Etude de l'impact écologique et socio-économique de la senne de plage sur les moyens d'existence des communautés de pêche au Bénin. Programme des Moyens d'Existence Durable dans la Pêche. Rapport d'étude. Direction des Pêches, p. 53.
- [5] Sossoukpe, E. (2011) Études écologiques sur les *Pseudotolithus senegalensis* spp (*Sciaenidae*) dans les eaux littorales du Bénin (Afrique de l'Ouest): Implications pour la conservation et la gestion. Master's Thesis, Université du Ghana.
- [6] Bayagbona, E.O. (1969) Détermination de l'âge et paramètres de croissance bertalanffy de *Pseudotolithus senegalensis* typus et *Pseudotolithus senegalensis* en utilisant la «Technique des Otolithes Brûlés». *Colloque Actes Océanographie et Ressources Halieutiques Atlantique Tropical, UNESCO*, Abidjan, 349-359.
- [7] Kasumyan, A.O. (2004) The Vestibular System and Sense of Equilibrium in Fish. *Journal of Ichthyology*, **44**, S224.
- [8] Casselman, J.M. (1987) Détermination de l'âge et de la croissance. In: Weatherley, A.H. and Gill, H.S., Eds., *Dans La biologie de la croissance des poissons*, Academic Press, 209-242.
- [9] Reibisch, J. (1899) Ueber die Einzahl bei Pleuronectes platessa und die Altersbestimmung dieser Form aus den Otolithen. *Helgol Wiss Meeresunters*, **4**, 233-248.
- [10] Campana, S.E. and Jones, C.M. (1992) Analysis of Otolith Microstructure Data. In: Stevenson, D.K. and Campana, S.E., Eds., *Otolith Microstructure Examination and Analysis*, Canadian Special Publication Fisheries Aquatic Sciences, 73-100.

- [11] Gettel, G.M., Deegan, L.A. and Harvey, C.J. (1997) A Comparison of Whole and Thin-Sectioned Otolith Aging Techniques and Validation of Annuli for Arctic Grayling. *Northwest Science*, **71**, 224-232.
- [12] Mendoza, R.P.R. (2006) Otoliths and Their Applications in Fishery Science. *Ribarstvo*, **64**, 89-102.
- [13] Capoccioni, F., Costa, C., Aguzzi, J., Menesatti, P., Lombarte, A. and Ciccotti, E. (2011) Ontogenetic and Environmental Effects on Otolith Shape Variability in Three Mediterranean European Eel (*Anguilla anguilla*, L.) Local Stocks. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **397**, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.11.011>
- [14] Smith, W.E. and Kwak, T.J. (2014) A Capture-Recapture Model of Amphidromous Fish Dispersal. *Journal of Fish Biology*, **84**, 897-912. <https://doi.org/10.1111/jfb.12316>
- [15] Tuset, V.M., Lombarte, A. and Assis, C.A. (2008) Otolith Atlas for the Western Mediterranean, North and Central Eastern Atlantic. *Scientia Marina*, **72**, 7-198. <https://doi.org/10.3989/scimar.2008.72s1199>
- [16] Bani, A., Poursaeid, S. and Tuset, V.M. (2013) Comparative Morphology of the Sagittal Otolith in Three Species of South Caspian Gobies. *Journal of Fish Biology*, **82**, 1321-1332. <https://doi.org/10.1111/jfb.12073>
- [17] Jawad, L.A., Hoedemakers, K., Ibáñez, A.L., Ahmed, Y.A., Abu El-Regal, M.A. and Mehanna, S.F. (2017) Morphology Study of the Otoliths of the Parrotfish, *Chlorurus sordidus* (Forsskål, 1775) and *Hipposcarus harid* (Forsskål, 1775) from the Red Sea Coast of Egypt (Family: Scaridae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **98**, 819-828. <https://doi.org/10.1017/s0025315416002034>
- [18] Bose, A.P.H., Adragna, J.B. and Balshine, S. (2016) Otolith Morphology Varies between Populations, Sexes and Male Alternative Reproductive Tactics in a Vocal Toadfish *Porichthys notatus*. *Journal of Fish Biology*, **90**, 311-325. <https://doi.org/10.1111/jfb.13187>
- [19] Pothin, K., Gonzalez-Salas, C., Chabanet, P. and Lecomte-Finiger, R. (2006) Distinction between *Mulloidichthys flavolineatus* Juveniles from Reunion Island and Mauritius Island (South-West Indian Ocean) Based on Otolith Morphometrics. *Journal of Fish Biology*, **69**, 38-53. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01047.x>
- [20] Duarte-Neto, P., Lessa, R., Stosic, B. and Morize, E. (2008) The Use of Sagittal Otoliths in Discriminating Stocks of Common Dolphinfin (*Coryphaena hippurus*) off Northeastern Brazil Using Multishape Descriptors. *ICES Journal of Marine Science*, **65**, 1144-1152. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsn090>
- [21] Hüseyin, K. (2008) Otolith Shape in Juvenile Cod (*Gadus morhua*): Ontogenetic and Environmental Effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **364**, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.06.026>
- [22] Berg, F., Almeland, O.W., Skadal, J., Slotte, A., Andersson, L. and Folkvord, A. (2018) Genetic Factors Have a Major Effect on Growth, Number of Vertebrae and Otolith Shape in Atlantic Herring (*Clupea harengus*). *PLOS ONE*, **13**, e0190995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190995>
- [23] Bremm, C. and Schulz, U. (2014) Otolith Atlas of Fish of the Sinos River. *Brazilian Journal of Biology*, **74**, 274-282. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.11612>
- [24] Lestrel, P.E. (1997) Fourier Descriptors and Their Applications in Biology. Cambridge University Press.
- [25] Andrialovanirina, N., Caillault, É.P., Couette, S., Laffont, R., Poloni, L., Lutet-Toti, C., *et al.* (2023) Asymmetry of Sagittal Otolith Shape Based on Inner Ear Side Tested

- on Mediterranean Red Mullet (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758): Comparative Analysis of 2D and 3D Otolith Shape Data. *Symmetry*, **15**, Article No. 1067. <https://doi.org/10.3390/sym15051067>
- [26] Kuhl, F.P. and Giardina, C.R. (1982) Elliptic Fourier Features of a Closed Contour. *Computer Graphics and Image Processing*, **18**, 236-258. [https://doi.org/10.1016/0146-664x\(82\)90034-x](https://doi.org/10.1016/0146-664x(82)90034-x)
- [27] Cadrin, S.X. and Friedland, K.D. (1999) The Utility of Image Processing Techniques for Morphometric Analysis and Stock Identification. *Fisheries Research*, **43**, 129-139. [https://doi.org/10.1016/s0165-7836\(99\)00070-3](https://doi.org/10.1016/s0165-7836(99)00070-3)
- [28] Stransky, C. and MacLellan, S.E. (2005) Species Separation and Zoogeography of Redfish and Rockfish (Genus *Sebastes*) by Otolith Shape Analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **62**, 2265-2276. <https://doi.org/10.1139/f05-143>
- [29] Rohlf, F.J. and Archie, J.W. (1984) A Comparison of Fourier Methods for the Description of Wing Shape in Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Systematic Zoology*, **33**, 302-317. <https://doi.org/10.2307/2413076>
- [30] Mahe, K., Oudard, C., Mille, T., Keating, J., Gonçalves, P., Clausen, L.W., *et al.* (2016) Identifying Blue Whiting (*Micromesistius Poutassou*) Stock Structure in the North-east Atlantic by Otolith Shape Analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **73**, 1363-1371. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2015-0332>
- [31] Peng, J., Heisterkamp, D.R. and Dai, H.K. (2003) LDA/SVM Driven Nearest Neighbor Classification. *IEEE Transactions on Neural Networks*, **14**, 940-942. <https://doi.org/10.1109/tnn.2003.813835>
- [32] Boschetti, A. and Massaron, L. (2016) Python Data Science Essentials. 2nd Edition, Springer.
- [33] Adjigbe, G., Gangbazo Kpogue, D. and Zounon, Y. (2023) Study of the Population Structure, Exploitation Level and Growth in Relation to the Otoliths Weight of Pseudotolithus Senegalensis (Valenciennes, 1833) and Pseudotolithus Senegalensis Typus (Bleeker, 1863) in Benin Coasts. Research Square.
- [34] Santos, J.E.P., Villasenor, M., De Peters, E.J., Robinson P.H., Baldwin B.C. (2002). Type de graines de coton et de gossypol dans l'alimentation des vaches laitières en lactation: Performances lactationnelles et gossypol plasmatique. *Journal des sciences laitières*, **85**, 1491-1501.
- [35] Castonguay, M., Simard, P. and Gagnon, P. (1991) Usefulness of Fourier Analysis of Otolith Shape for Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) Stock Discrimination. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **48**, 296-302. <https://doi.org/10.1139/f91-041>
- [36] Campana, S.E. and Casselman, J.M. (1993) Stock Discrimination Using Otolith Shape Analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**, 1062-1083. <https://doi.org/10.1139/f93-123>
- [37] Begg, G., Overholtz, W. and Munroe, N. (2001) The Use of Internal Otolith Morphometrics for Identification of Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) Stocks on George Bank. *Fishery Bulletin*, **99**, 1-14.
- [38] Reis-Santos, P., Vasconcelos, R.P., Tanner, S.E., Fonseca, V.F., Cabral, H.N. and Gilanders, B.M. (2018) Extrinsic and Intrinsic Factors Shape the Ability of Using Otolith Chemistry to Characterize Estuarine Environmental Histories. *Marine Environmental Research*, **140**, 332-341. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.06.002>
- [39] Begg, G.A. and Brown, R.W. (2000) Stock Identification of Haddock *Melanogrammus*

- aeglefinus* on Georges Bank Based on Otolith Shape Analysis. *Transactions of the American Fisheries Society*, **129**, 935-945.
[https://doi.org/10.1577/1548-8659\(2000\)129<0935:siohma>2.3.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(2000)129<0935:siohma>2.3.co;2)
- [40] Cardinale, M., Doering-Arjes, P., Kastowsky, M. and Mosegaard, H. (2004) Effects of Sex, Stock, and Environment on the Shape of Known-Age Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **61**, 158-167.
<https://doi.org/10.1139/f03-151>
- [41] Torres, G.J., Lombarte, A. and Morales-Nin, B. (2000) Sagittal Otolith Size and Shape Variability to Identify Geographical Intraspecific Differences in Three Species of the Genus *Merluccius*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **80**, 333-342. <https://doi.org/10.1017/s0025315499001915>
- [42] Gagliano, M. and McCormick, M. (2004) Feeding History Influences Otolith Shape in Tropical Fish. *Marine Ecology Progress Series*, **278**, 291-296.
<https://doi.org/10.3354/meps278291>
- [43] Swan, S.C., Geffen, A.J., Morales-Nin, B., Gordon, J.D.M., Shimmield, T., Sawyer, T., *et al.* (2006) Otolith Chemistry: An Aid to Stock Separation of *Helicolenus dactylopterus* (Bluemouth) and *Merluccius merluccius* (European Hake) in the Northeast Atlantic and Mediterranean. *ICES Journal of Marine Science*, **63**, 504-513.
<https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2005.08.012>
- [44] Vignon, M. and Morat, F. (2010) Environmental and Genetic Determinant of Otolith Shape Revealed by a Non-Indigenous Tropical Fish. *Marine Ecology Progress Series*, **411**, 231-241. <https://doi.org/10.3354/meps08651>
- [45] Simoneau, M., Casselman, J.M. and Fortin, R. (2000) Determining the Effect of Negative Allometry (Length/Height Relationship) on Variation in Otolith Shape in Lake Trout (*Salvelinus namaycush*), Using Fourier-Series Analysis. *Canadian Journal of Zoology*, **78**, 1597-1603. <https://doi.org/10.1139/z00-093>
- [46] Monteiro, L.R., Benedetto, A.P.M.D., Guillermo, L.H. and Rivera, L.A. (2005) Allometric Changes and Shape Differentiation of Sagitta Otoliths in Sciaenid Fishes. *Fisheries Research*, **74**, 288-299. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2005.03.002>
- [47] Rebaya, M., Ben Faleh, R., Khedher, M., Trojette, M., Marsaoui, B., Fatnassi, M., *et al.* (2017) Otolith Shape Discrimination of *Liza ramada* (Actinopterygii: Mugiliformes: Mugilidae) from Marine and Estuarine Populations in Tunisia. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, **47**, 13-21. <https://doi.org/10.3750/aiep/02006>
- [48] Trojette, M. (2015) Stock Discrimination of Two Insular Populations of *Diplodus annularis* (Actinopterygii: Perciformes: Sparidae) along the Coast of Tunisia by Analysis of Otolith Shape. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, **45**, 363-372.
<https://doi.org/10.3750/aip2015.45.4.04>
- [49] Bostanci, D., Yilmaz, M., Yedier, S., Kurucu, G., Kontas, S., Darçin, M., *et al.* (2016) Sagittal Otolith Morphology of Sharpnose Seabream *Diplodus puntazzo* (Walbaum, 1792) in the Aegean Sea. *International Journal of Morphology*, **34**, 484-488.
<https://doi.org/10.4067/s0717-95022016000200012>
- [50] Bird, J.L., Eppler, D.T. and Checkley Jr., D.M. (1986) Comparisons of Herring Otoliths Using Fourier Series Shape Analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **43**, 1228-1234. <https://doi.org/10.1139/f86-152>
- [51] Zhang, C., Ye, Z., Li, Z., Wan, R., Ren, Y. and Dou, S. (2016) Population Structure of Japanese Spanish Mackerel *Scomberomorus niphonius* in the Bohai Sea, the Yellow Sea and the East China Sea: Evidence from Random Forests Based on Otolith Features. *Fisheries Science*, **82**, 251-256. <https://doi.org/10.1007/s12562-016-0968-x>

Supplementary

Table S1. Sampling information (total length and total weight) of *Pseudotolithus senegalensis* in Benin waters according to the sampling locations.

Sampling locations		Lagoon of Porto Novo	Lake Nokoué	Atlantic coast
Total length (cm)	Mean ± SD	22.1 ± 1.8	23.6 ± 2.5	27.2 ± 1.9
	max	27.0	31.2	32.2
	min	18.0	18.0	23.4
Total weight (g)	Mean ± SD	3.8 ± 1.8	8.70 ± 3.3	13.7 ± 2.5
	max	12.2	18.6	22.2
	min	3.8	3.2	7.4

Table S2. Regression results.

Location	Variable	R-squared	P-value
Lake Nokoué	Length	0.016	1.632e-01
	Width	0.012	2.259e-01
	Area	0.023	9.025e-02
	Perimeter	0.022	9.920e-02
Atlantic coast	Length	2.02e-04	8.838e-01
	Width	0.002	6.106e-01
	Area	0.003	5.566e-01
	Perimeter	3.33e-04	8.512e-01
Porto-Novo Lagoon	Length	0.209	1.664e-06
	Width	0.165	2.638e-05
	Area	0.228	5.018e-07
	perimeter	0.269	3.108e-08

Table S3. Percentage asymmetry of biometric parameters per location.

Otolith parameters	Porto-Novo Lagoon	Lake Nokoué	Atlantic coast
Length	0.774	0.596	1.501
Width	4.118	4.849	3.602
Area	4.656	4.578	5.779
Perimeter	0.906	1.410	1.891

Table S4. P-value of asymmetry fluctuating between right and left.

Otolith parameters	Locations		
	LN	LP	AC
Length	0.015**	0.0282**	0.314
Width	3.352e-10***	4.380e-11***	0.003***
Area	3.282e-11***	5.329e-15***	0.01**
Perimeter	2.367e-05***	0.023**	0.164

** : Significant at $p < 0.01$; *** : Significant at $p < 0.001$.

Table S5. ANOVA results for otolith length, width and surface area between groups.

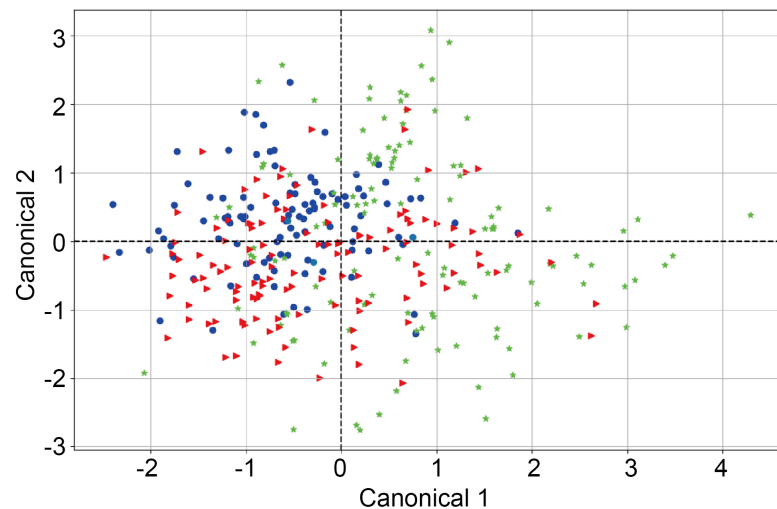
Attribute	Wilks L.	Partial L.	F	p-value
Length	0.724	0.981	3.198	P < 0.05
Width	0.862	0.824	36.418	P < 0.05
Area	0.815	0.872	25.071	P < 0.05
Perimeter	0.714	0.995	0.806	P > 0.05

Table S6. MANOVA of principal components: location side.

locations: side	Value	DF	F Value	P value
Wilks' lambda	0.792	44.00	1.796	<0.0001
Pillai's trace	0.215	44.00	1.76	<0.0001
Hotelling-Lawley trace	0.251	44.00	0.72	<0.0001
Roy's greatest root	0.202	22.00	2.96	<0.0001

Table S7. MANOVA of principal components: location sex.

locations: sex	Value	DF	F Value	P value
Wilks' lambda	0.91	44.00	0.72	0.908
Pillai's trace	0.09	44.00	0.73	0.906
Hotelling-Lawley trace	0.10	44.00	1.82	0.909
Roy's greatest root	0.05	22.00	0.84	0.669

**Figure S1.** Canonical Discriminant Analysis with the first two canonical variables of the biometric parameters for 4 classes (Lake Nokoué (red), Porto-Novo lagoon (blue), Atlantic coast (green)).

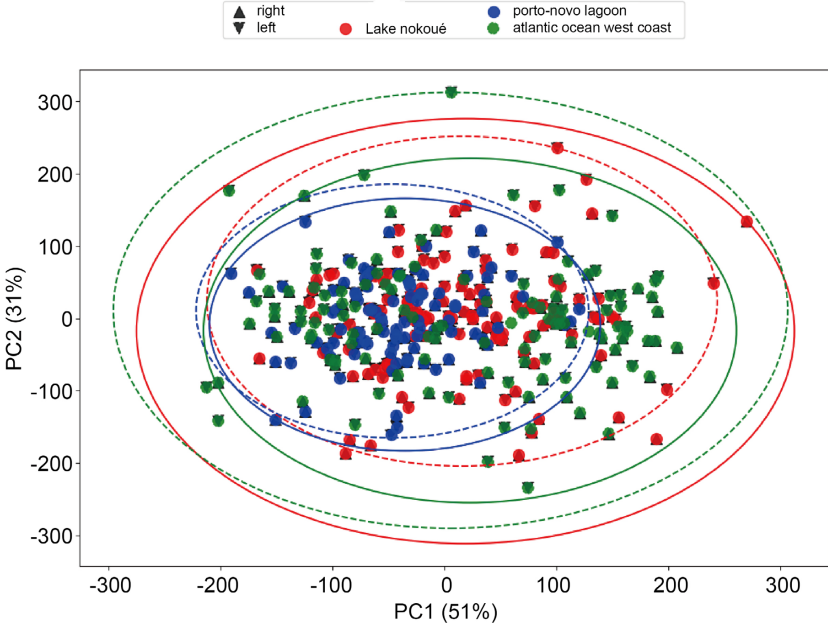


Figure S2. Difference in mean shapes of reconstructed otoliths between identified stock units: Lake Nokoué (red; Left: solid line, Right: dotted line), Atlantic coast (green; Left: solid line, Right: dotted line), Porto-Novo Lagoon (blue; Left: solid line, Right: dotted line).

6.3 Annexe 3 : Bibliographie personnelle

Ensemble des publications à juillet 2024

Articles dans revues internationales à comité de lecture

- [1] Nicolas ANDRIALOVANIRINA, Alizée HACHE, Kélig MAHÉ, Sébastien COUETTE et Émilie POISSON CAILLAULT. "Automatic method to transform routine otolith images for a standardized otolith database using R". In : *Cybium* 47.1 (2023), p. 31-42. DOI : 10.26028/CYBIUM/2023-471-003.
- [2] Nicolas ANDRIALOVANIRINA, Émilie POISSON CAILLAULT, Sébastien COUETTE, Rémi LAFFONT, Lauriane POLONI, Camille LUTET-TOTI et Kélig MAHÉ. "Asymmetry of Sagittal Otolith Shape Based on Inner Ear Side Tested on Mediterranean Red Mullet (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758) : Comparative Analysis of 2D and 3D Otolith Shape Data". In : *Symmetry* 15.5 (2023), p. 1067. DOI : 10.3390/SYM15051067.
- [3] Nicolas ANDRIALOVANIRINA, David ROOS, Claire GENTIL, Solène TELLIEZ, Antoine DUSSUEL, Romain ELLEBOODE, Kirsteen MACKENZIE, Émilie POISSON CAILLAULT, Sébastien COUETTE et Kélig MAHÉ. "Spatial structuring of the main demersal fish around Réunion Island (Western Indian Ocean) based on the external shape of their otoliths". In : *Cybium* 47.1 (2023), p. 43-57. DOI : 10.26028/CYBIUM/2023-471-004.
- [4] N. ANDRIALOVANIRINA, R. LAFFONT, S. COUETTE, A. MATÉOS, K. MAHÉ et E. POISSON CAILLAULT. "3D sagittal otolith reconstruction from spherical Fourier descriptors". In : *RFIAP 2024, SSFAM (Société Savante Française d'Apprentissage Machine); AFRIF (Association Française pour la Reconnaissance et l'Interprétation des Formes)*, Lille, France. hal-04610027 (2024).
- [5] N. ANDRIALOVANIRINA, E. POISSON CAILLAULT et K. MAHÉ. "Red mullet stock identification without any reference using otolith shape". In : *RFIAP 2024, SSFAM (Société Savante Française d'Apprentissage Machine); AFRIF (Association Française pour la Reconnaissance et l'Interprétation des Formes)*, Lille, France. hal-4610033 (2024).
- [6] Nicolas ANDRIALOVANIRINA, Lauriane POLONI, Rémi LAFFONT, Émilie POISSON CAILLAULT, Sébastien COUETTE et Kélig MAHÉ. "3D meshes dataset of sagittal otoliths from red mullet in the Mediterranean Sea". In : *Scientific Data* 11.1 (juil. 2024). ISSN : 2052-4463. DOI : 10.1038/s41597-024-03641-1. URL : <http://dx.doi.org/10.1038/s41597-024-03641-1>.
- [7] Madel Floriane Adjibayo HOUETO, Marwa MEJRI, Malek TAZARKI, Marius SOUNOUVOU, Nicolas ANDRIALOVANIRINA, Meriem Ben GHORBEL, Pierre DOSSOU-YOVO, Abdellah CHALH, Pierre QUIGNARD, Monia TRABELSI et Kélig MAHÉ. "Fluctuating Asymmetry of *Elopes lacerta* (Valenciennes, 1847) Otoliths in the Western African Waters". In : *Open Journal of Marine Science* 14.03 (2024), 41-62. ISSN : 2161-7392. DOI : 10.4236/ojms.2024.143003. URL : <http://dx.doi.org/10.4236/ojms.2024.143003>.
- [8] Madel Floriane Adjibayo HOUETO, Marius SOUNOUVOU, Malek TAZARKI, Nicolas ANDRIALOVANIRINA, Meriem Ben GHORBEL, Marwa MEJRI, Pierre DOSSOU-YOVO, Abdellah CHALH, Jean-Pierre QUIGNARD, Kélig MAHÉ et Monia TRABELSI. "Analysis of otolith shape as a tool for discriminating stocks of Cas-sava croaker (*Pseudotolithus senegalensis*) in Beninese waters". In : *Open Journal of Marine Science (article accepté)* (2024).

Ouvrages

- [9] Kélig MAHÉ, Nicolas ANDRIALOVANIRINA, Aurélie MATÉOS, Sébastien COUETTE, Laffont RÉMI, Kirsteen MACKENZIE et Émilie POISSON CAILLAULT. *Identification des poissons par leurs otolithes en imagerie 3D*. fr. Sous la dir. d'Éditions QUAE. EAN13 9782759238651. Juin 2024.

Conférences nationales ou internationales sur résumé, congrès, GDR

- [10] Nicolas ANDRIALOVANIRINA. *Analyse comparative des données de forme d'otolithes 2d et 3d sur l'effet côté des otolithes*. Journée Manche Mer du Nord. Cherbourg, France. Présentation. 25 oct. 2022.
- [11] Nicolas ANDRIALOVANIRINA, Alizée HACHE, Kélig MAHÉ, Sébastien COUETTE et Émilie POISSON CAILLAULT. *Nouvelle méthode de transformation des images d'otolithes acquises en routine pour une base de données d'otolithes standardisés*. Rencontre de l'Ichtyologie en France. Paris, France. Présentation. 13 mar. 2022.
- [12] Nicolas ANDRIALOVANIRINA, Émilie POISSON CAILLAULT, Sébastien COUETTE, Rémi LAFFONT, Lauriane POLONI, Camille LUTET-TOTI et Kélig MAHÉ. *Side effect of the otolith shape applied to the red mullet (Mullus barbatus) in the Mediterranean sea : comparative analysis of 2D and 3D otolith shape data*. Virtual 6th International Sclerochronology 2022. Poster. 13 sept. 2022.
- [13] Nicolas ANDRIALOVANIRINA, David ROOS, Claire GENTIL, Solène TELLIEZ, Antoine DUSSUEL, Romain ELLEBOODE, Émilie POISSON CAILLAULT et Kélig MAHÉ. *Structuration spatiale des principaux poissons démersaux autour de l'île de la Réunion (Océan Indien Ouest) à partir de la forme externe de leurs otolithes*. Rencontre de l'Ichtyologie en France. Paris, France. Présentation. 15 mar. 2022.
- [14] Nicolas ANDRIALOVANIRINA, KÉLIG MAHÉ, Sébastien COUETTE, Aurélie MATEOS, KIRSTEEN M. MACKENZIE, Rémi LAFFONT, Lauriane POLONI et ÉMILIE POISSON CAILLAULT. *3D otolith shape for the main commercial species (flatfish and roundfish) in the Eastern Channel and the North Sea*. en. 7th International Otolith Symposium 2023. Viña del Mar, Chili. Poster. 2023. DOI : 10.13140/RG.2.2.30290.32962.

Séminaires et journées des doctorants

- [15] Nicolas ANDRIALOVANIRINA, Émilie POISSON CAILLAULT, Sébastien COUETTE, Rémi LAFFONT, Lauriane POLONI, Camille LUTET-TOTI et Kélig MAHÉ. "Analyse de forme en 3D des otolithes pour mieux délimiter les stocks du rouget barbet de vase en utilisant l'asymétrie des côtés de l'oreille interne". 9ème Journée Régionale des Doctorants en Automatique. Lille, France. doctorant". 21 juin 2023.
- [16] Nicolas ANDRIALOVANIRINA, Émilie POISSON CAILLAULT, Sébastien COUETTE, Aurélie MATEOS, Kirsteen MACKENZIE, Rémi LAFFONT, Lauriane POLONI et Kélig MAHÉ. "Identification des poissons par leurs otolithes en imagerie 3D. Journée des doctorants de la Structure Fédérative de Recherche Campus de la mer. Wimereux, France". doctorant. 28 nov. 2023.
- [17] Nicolas ANDRIALOVANIRINA. "2D and 3D shape of fish otoliths : from standardization to classification. Séminaire CEFAS. Lowestoft, Angleterre". 22 mai 2024.
- [18] Nicolas ANDRIALOVANIRINA, Émilie POISSON CAILLAULT, Sébastien COUETTE, Rémi LAFFONT, Lauriane POLONI, Camille LUTET-TOTI et Kélig MAHÉ. "Analyse de forme en 3D des otolithes pour mieux délimiter les stocks du rouget barbet de vase en utilisant l'asymétrie des côtés de l'oreille interne, Journée Régionale des Doctorants en Sciences de la Mer et Automatique. Boulogne-sur-mer, France - 1er Prix." 8 juil. 2024.
- [19] Valeriia BONDARENKO, Émilie POISSON CAILLAULT, Nicolas ANDRIALOVANIRINA et Kélig MAHÉ. "Clustering : Fish Environment vs Fish Stocks. Journées A2U IA-Optim". 5 juin 2024.

Datasets

- [20] Nicolas ANDRIALOVANIRINA, Alizee HACHE, Kelig MAHE, Sébastien COUETTE et Emilie POISSON CAILLAULT. *Data applied to automatic method to transform routine otolith images for a standardized otolith database using R*. 2022. DOI : 10.17882/91023. URL : <https://www.seanoe.org/data/00798/91023/> (visité le 29/03/2024).
- [21] Nicolas ANDRIALOVANIRINA, Lauriane POLONI, Rémi LAFFONT, Emilie POISSON CAILLAULT, Sébastien COUETTE et Kélig MAHÉ. *3D otolith mesh dataset of red mullet (Mullus barbatus) in the Mediterranean Sea*. SEANOE. 2024. DOI : 10.17882/99980. URL : <https://doi.org/10.17882/99980> (visité le 04/05/2024).

Rapports techniques

- [22] Nicolas ANDRIALOVANIRINA. *Rapport d'avancement, 1ère année de thèse*. Rapp. tech. 7 sept. 2022, p. 16.
- [23] Nicolas ANDRIALOVANIRINA. *Rapport d'avancement, 2ème année de thèse*. Rapp. tech. 3 juil. 2023, p. 13.

6.4 Annexe 4 : Posters associés à la thèse

Titre : Potential directional asymmetry of the otolith shape tested on the red mullet (*Mullus barbatus*) in the Mediterranean Sea: comparative analysis of 2D and 3D otolith shape data

Auteurs : Nicolas Andrialovanirina ^{1,2}, Emilie Poisson Caillault ¹, Sébastien Couette ³, Rémi Laffont ³, Lauriane Poloni ³, Camille Lutet-Toti ³, Kélig Mahé ²

Affiliations :

¹ Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), 62228 Calais, France

² Ifremer, Laboratoire Ressources Halieutiques, 62321 Boulogne-sur-Mer, France.

³ Ecole Pratique des Hautes Etudes, PSL, Paris & UMR Biogéosciences, université de Bourgogne, 21000 Dijon, France.

Conférence : vISC 2022 - Virtual International Sclerochronology Conference. 13-15 September 2022, Online

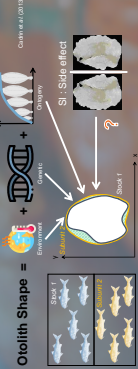
Abstract: A wide number of techniques were developed and applied to identify and discriminate stocks. Among them, otolith's shape, which is affected by environment and genetic factors, can be used as a tool to identify the populations within the species. Before to identify the boundaries of stocks, the potential drivers, which control the otolith shape, must be analysed. In this study, Directional Asymmetry (DA; the effect of otolith's location side, i.e., left *versus* right inner ear) was tested combining the approaches to otolith shape in 2D and 3D on 560 adults of the red mullet *Mullus barbatus* (Linnaeus, 1758) which is one of the most abundant demersal fish species in the Mediterranean Sea. Studied individual were sampled from 7 subunits for 2D analysis (476 individuals) and 3 subunits for 3D analysis (84 individuals) of geographical subareas (GSAs). To analyse otolith shape, the normalized Elliptical Fourier Descriptors (EFDs) computed from the two-dimensional outlines (extracted from otolithes 2D pictures) and Spherical Harmonic shape descriptors computed from three-dimensional surfaces/meshes (extracted from otolithes 3D scans) were analysed with principal component analysis (PCA) method. PCA's scores were used in the multivariate mixed-effects model with side and subunits effects. From 3D surfaces/meshes, the univariate variables (i.e. otolith's surface and volume) were analysed with Redundancy analysis (RDA) too. The EFDs from 2D images showed that the side effect was significant on the otolith shape (p -value<0.00001). The reconstructed outlines of the mean Fourier harmonics of the left and right side were plotted and the percentage of non-overlapping surface was 1.010%. However, the interaction between side and geographical subareawas nosignificant from 2D images. The EFDs from 3D images showed that the side effect was signifiant (p -value<0.00001). In additionnal, the interaction between side effect and geographical subarea was signifiant (p -value< 0.00001) from 3D images. The relationship between the fish length and the surface of 3D otolith shape was significant (p -value =0.001), this trend was not observed by the otolith volume (p -value=0.698). For these two univariate descriptors of 3D otolith shape, there were no significant difference between left and right otoliths. This comparative analysis of otolith shape in 2D and in 3D showed showed that the 3D approach, presents the data with more accuracy than those extracted from the regularly used 2D approach. This difference is very important because the directionnal asymmetry was significant on the relationship between the otolith 3D shape and the geographical area of sampling while this trend is not observable from the otolith 2D shape. This first study showing the difference between 2D and 3D approaches should be confirmed in the future.

SIDE EFFECT OF THE OTOLITH SHAPE APPLIED TO THE RED MULLET (*Mullus barbatus*) IN THE MEDITERRANEAN SEA: COMPARATIVE ANALYSIS OF 2D AND 3D OTOLITH SHAPE DATA

Nicolas Andriatovarinina ^{1,2}, Emilie Poisson Caillaud ¹, Sébastien Couette ³, Rémi Laffont ³, Lauriane Poloni ³, Camille Lutet-Toti ^{3,4}, Kélig Mahé ²



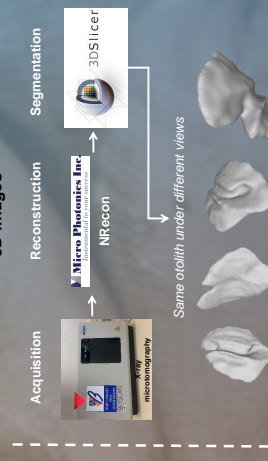
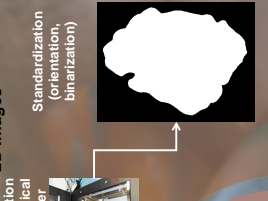
1. CONTEXT



2D → The same dataset (3 GSA)
 GSA 18c, n = 29 fishes
 GSA 22b, n = 30 fishes
 GSA 27b, n = 23 fishes
 GSA: Geographical Sub Areas of the Mediterranean Sea

3D → 2nd most caught fish in the Mediterranean sea
 TL (Total Length)

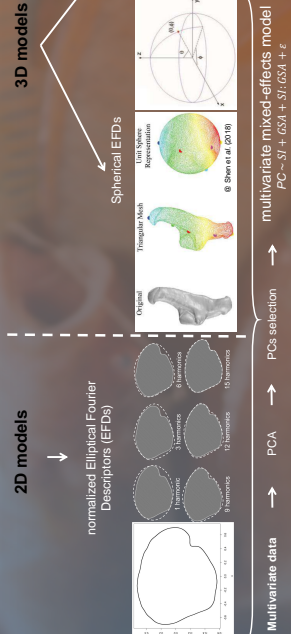
2. MATERIAL



3. CONCLUSIONS

- 3D analysis have more shape information than 2D but it is time consuming
- Otolith 3D shape was significant on the relationship between the side effect and the geographical area of sampling (otolith 2D shape was not significant from SI)
- 3D data: High resolution significant (EFDs) on SI / low resolution non significant on SI (OS & OV)
- 3D & 2D otolith data did not show the same trend for SI

3. METHODS



4. RESULTS

EFDs 2D

PC	P-value
PC	-2.2×10^{-16}
PC:SI	0.09
PC:GSA	-2.2×10^{-16}
PC:SIGSA	0.43

NH = 7 harmonics
 nPC = 6
 Variance by 70%

EFDs 3D

PC	P-value
PC	2.2×10^{-16}
PC:SI	0.02
PC:GSA	2.2×10^{-16}
PC:SIGSA	0.0001

NH = 11 harmonics
 nPC = 6
 Variance by 30%

Contact: nicolas.andriatovarinina@ifremer.fr

Shan L., Fard H., & McPeak M. A. (2020). Modeling three-dimensional morphological structures using spherical harmonics. *Evolution*, 74, 1033-1046.

Carla S., Kiri L., & Menni S. (2019). Shape identification. *Molecular Evolution in Fishes*. Springer, Second Edition.

Ulco Université de la Côte d'Azur

Ifremer Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

Compus 3D by Ifremer

anr Agence Nationale de la Recherche

REPUBLIQUE FRANÇAISE

Ministère de l'Environnement, du Climat et de la Souveraineté

Ministère de l'Énergie, du Climat et de la Souveraineté

Ministère de l'Énergie, du Climat et de la Souveraineté

Ministère de l'Environnement, du Climat et de la Souveraineté

Ministère de l'Environnement, du Climat et de la Souveraineté

Titre : Comparaison analyses 2D et 3D de la forme des otolithes de rougets barbets pour discriminer les populations

Auteurs : Nicolas Andrialovanirina ^{1,2}, Émilie Poisson Caillault ¹, Sébastien Couette ³, Rémi Laffont ^{3,4}, Lauriane Poloni ³, Kélig Mahé ²

Affiliations :

¹ Université du Littoral Côte d'Opale, UR 4491, LISIC, Laboratoire d'Informatique Signal et Image de la Côte d'Opale, F-62100 Calais, France

² Ifremer, Laboratoire Ressources Halieutiques, 62321 Boulogne-sur-Mer, France

³ Ecole Pratique des Hautes Etudes, PSL Université, 75014, Paris, France

⁴ CNRS, Biogéosciences, UMR 6282, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France

Conférence : Journée du Laboratoire d'Informatique Signal et Image de la Côte d'Opale. 11 Juillet 2022, Calais

Résumé : Selon l'estimation de la FAO, la population mondiale atteindra plus de 9 milliards d'habitants d'ici 2050. De ce fait, le besoin en protéines ne cesse de croître alors que 33% des stocks poissons dans le monde sont en surexploitation. Une gestion durable des ressources halieutiques est ainsi nécessaire pour subvenir au besoin présent et futur. Cette gestion passe d'abord par la délimitation des unités de gestion ou des stocks. Il existe plusieurs éléments d'analyse possibles comme la microchimie et la forme de l'otolithe, les marqueurs génétiques ou naturels (parasite...). L'otolithe est une pièce calcifiée dans l'oreille interne du poisson dont la forme varie selon sa génétique et son environnement. Cette forme de l'otolithe est très utilisée actuellement, d'une part parce qu'elle permet d'intégrer les composantes génétiques et phénotypiques et d'autre part parce qu'elle présente une analyse à faible coût de traitement par rapport aux autres méthodes. De plus, leurs analyses sont de plus en plus standardisées (packages, codes R/Python). Actuellement les images acquises en 2D sont utilisées pour la délimitation des stocks de poissons. Ces images sont acquises à partir de scanners ou loupes binoculaires puis standardisées pour être enfin analysées notamment à l'aide des descripteurs elliptiques de Fourier. Cette analyse pourrait être améliorée grâce à des images 3D. L'acquisition d'images en 3D se fait en 3 étapes avec la prise d'images radiographiques sur plusieurs angles à l'aide d'un microtomographe à rayon X, puis la reconstruction en 3D des images 2D, et enfin la segmentation par seuillage des objets 3D. Chaque point de la surface de l'objet 3D (vertex) est projeté sur une sphère et leurs coordonnées sont leur distance angulaire à une origine des axes x, y et z. L'analyse de descripteurs de Fourier en 3D se fait grâce aux angles de chaque point des meshes 3D à l'origine (x, y et z). Le rouget barbet de vase (*Mullus barbatus*), qui est un poisson benthique commercial, a été étudié à partir de 35 zones couvrant toute la mer Méditerranée. 1023 rougets barbets de vase ont été échantillonnés (en collectant les otolithes droit et gauche, leurs positions géographiques, taille, poids, sexe, génétique et les données environnementales). Ce jeu de données est utilisé aussi pour estimer l'apport de l'analyse 3D par rapport à l'analyse 2D pour connaître précisément les limites de stocks. A partir d'analyses de Fourier 2D et 3D des classifications supervisées (LDA) et non-supervisées (Clustering) sont réalisées pour délimiter les stocks. La reconstruction de la forme moyenne des otolithes pour chaque groupe différencié permettra de connaître les différences de structure de l'otolithe et de caractériser le niveau de différence entre les stocks adjacents. Le début de cette étude a montré que l'analyse en 3D des otolithes est très chronophage par rapport à l'analyse 2D mais elle permet de prendre en compte la globalité de la forme de l'otolithe. A la fin de cette étude, nous espérons caractériser les effets qui expliquent les changements de forme de l'otolithe (génétique, environnement, symétrie), comprendre la morphogenèse de l'otolithe vis-à-vis de ces 3 facteurs, identifier la précision des analyses 2D et 3D et enfin mesurer l'intérêt de l'analyse 3D.

Comparaison analyses 2D et 3D de la forme des otolithes de rougets barbets pour discriminer les populations

Nicolas Andrialovanirina ^{1,2}, Émilie Poisson Caillaud ¹, Sébastien Couette ³, Rémi Laffont ³, Lauriane Poloni ³, Kélig Mahé ²



CONTEXTE

33 % des stocks de poissons surexploités



Besoin croissant en protéines
> + 9 milliards d'habitants en 2050 (source : FAO)

Délimitation des unités de gestion (stocks)

Méthodes utilisées
Cadrin et al., 2013

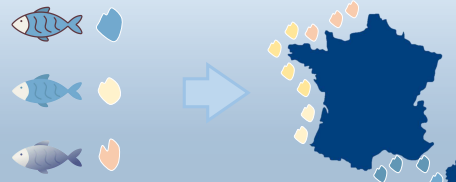
Forme de l'otolithe

Microchimie de l'otolithe

Marqueur génétique

Marqueur naturel (parasite...)

Forme externe de l'otolithe = Génétique + Environnement



Otolithe : pièce calcifiée de l'oreille interne des poissons

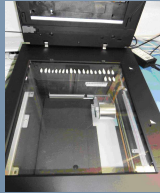
METHODE

Projection 2D

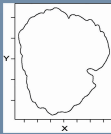
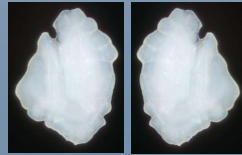
versus

Projection 3D

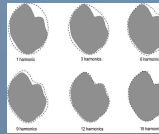
Acquisition : scanner otolithe en 2D (temps : 60 s)



Standardisation des images (temps : 1 s)



Fourier 2D
Utilisant les coordonnées x, y



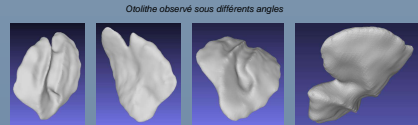
Acquisition : prise d'image radiographique sur 180/360° (temps : 360 s)



Reconstruction : 3D à partir de plusieurs coupes virtuelles (image 2D) (temps : 120 s)

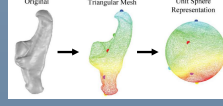


Segmentation : sélection des otolithes par seuillage (temps : 60 s)

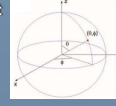


Otolithe observé sous différents angles

Extraction des informations de la forme 3D



Standardisation / alignement Fourier 3D selon les coordonnées (angles à l'origine des coordonnées x, y, z par mesh)



mesh : maillage d'un objet 3D organisé en polygones

Shen et al., 2009

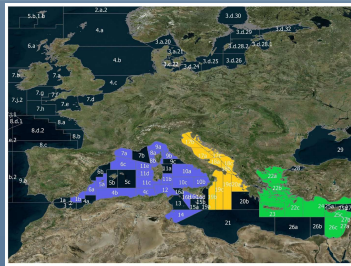
CAS D'ETUDE

Rouget barbet de vase (*Mullus barbatus*)

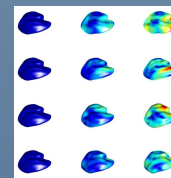


Poisson benthique d'intérêt commercial

- 1 023 poissons
- 35 zones en Méditerranée
- 30 poissons/zone
- Informations individuelles collectées :
 - Position géographique
 - Taille/poids/sexe
 - Otolithes droit et gauche
 - Données génétiques
 - Âge estimé
 - Environnement reconstruit (température, salinité, oxygène...)



Analyses



- Classification supervisée (LDA) et non-supervisée (Clustering) pour identifier les stocks
- Reconstruction forme moyenne pour quantifier degré de différence entre stocks
- Caractériser les effets expliquant les changements de forme : les facteurs génétiques / environnementaux influençant la forme des otolithes

PERSPECTIVES

Apports de l'analyse 3D par rapport au 2D ?



Génétique



Changements globaux



Symétrie



3D forme globale analysée
2D faiblement chronophage



3D très chronophage/coûteux
2D analyse partielle de la forme

- Comparaison : descripteurs 1D et 2D comparés entre images 2D et 3D
- Identifier les limites de stocks et la précision observée à partir des images 2D et 3D
- Intérêt d'utiliser des images 3D par rapport aux images 2D
- Compréhension de la morphogenèse de l'otolithe : génétique, environnement, anatomie (droit et gauche)

Cadrin S., Kerr L., & Mariani S., (2013). Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science: Second Edition.

Shen L., Farid H., & McPeck M. A., (2009). Modeling three-dimensional morphological structures using spherical harmonics. Evolution, 63: 1003-1016.

Financiers :



Contact: nicolas.andrialovanirina@ifremer.fr

Projet IFSEA (ANR-21-EXES-0011)

Titre : 3D otolith shape for the main commercial species (flatfish and roundfish) in the Eastern Channel and the North Sea

Auteurs : Nicolas Andrialovanirina ^{1,2}, Kélig Mahé ¹, Sébastien Couette ^{4,5}, Aurélie Matéos ³, Rémi Laffont ⁵, Lauriane Poloni ⁵, Émilie Poisson Caillault ¹

Affiliations :

¹ Ifremer, Laboratoire Ressources Halieutiques, 62321 Boulogne-sur-Mer, France

² Université du Littoral Côte d'Opale, UR 4491, LISIC, Laboratoire d'Informatique Signal et Image de la Côte d'Opale, F-62100 Calais, France

³ Université d'Artois, Unité BioEcoAgro UMR 1158, Arras, France

⁴ Ecole Pratique des Hautes Etudes, PSL Université, Paris, France

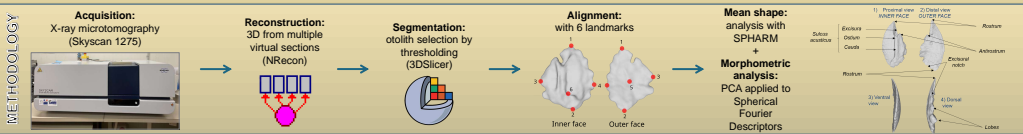
⁵ Biogéosciences, UMR 6282 CNRS, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France

Conférence : IOS 2023 - 7th International Otolith Symposium. October 9-13 2023, Chile

Abstract : Otolith shape analysis is commonly used in fisheries sciences to validate the relationship with fish length, to discriminate between stock units of fish, and to identify fish species from archeological data or stomach contents. However, all otolith studies have used two-dimensional (2D) images, a partial representation of the whole shape of the otolith. This study presents a comparative analysis of 2D and three-dimensional (3D) otolith shape data for many commercial species (flatfish: *Lepidorhombus whiffiagonis*, *Scophthalmus maximus*, *Scophthalmus rhombus*, *Solea solea*, *Limanda limanda*, *Microstomus kitt*, *Platichthys flesus*, *Pleuronectes platessa* and roundfish: *Clupea harengus*, *Sardina pilchardus*, *Sprattus sprattus*, *Engraulis encrasicolus*, *Gadus morhua*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Merlangius merlangus*, *Trisopterus luscus*, *Mullus surmuletus*, *Eutrigla gurnardus*, *Chelidonichthys cuculus*, *Chelidonichthys lucerna*, *Trachurus trachurus*, *Zeus faber*) in the Eastern English Channel and the North Sea. 2D otolith images were made with an optical scanner, and 3D otolith images with an X-ray microtomograph. For each species, several specimens were selected from the complete size range. Otolith shape was assessed by analyzing several descriptors from 2D and 3D images from the otolith size parameters (Length, Width, Perimeter, Area and Volume). The relationship between fish length and otolith shape parameters are not the same within species and/or among species for 2D versus 3D data. Moreover, the relationship between 2D otolith size parameters and 3D otolith parameters are different among species. These results demonstrate the importance of 3D otolith shape analysis. In the future, the number of studies using otolith shape analysis in three dimensions must be increased strongly to validate previous studies on 2D images.

3D otolith shape for the main commercial species (flatfish and roundfish) in the Eastern Channel and the North Sea

Nicolas Andrialovanirina^{1,2,3}, Kélig Mahé³, Sébastien Couette^{4,5}, Aurélie Mateos^{6,7}, Kirsteen MacKenzie³, Rémi Laffont⁵, Lauriane Poloni^{4,5}, Emilie Poisson Caillault^{1,2}



Titre : Analyse de forme en 3D des otolithes pour mieux délimiter les stocks du rouget barbet de vase en utilisant l'asymétrie des côtés de l'oreille interne

Auteurs : Nicolas Andrialovanirina ^{1,2}, Émilie Poisson Caillault ¹, Sébastien Couette ³, Rémi Laffont ^{3,4}, Lauriane Poloni ³, Camille Lutet-Toti ^{4,5}, Kélig Mahé ²

Affiliations :

¹ Université du Littoral Côte d'Opale, UR 4491, LISIC, Laboratoire d'Informatique Signal et Image de la Côte d'Opale, F-62100 Calais, France

² Ifremer, Laboratoire Ressources Halieutiques, 62321 Boulogne-sur-Mer, France

³ Ecole Pratique des Hautes Etudes, PSL Université, 75014, Paris, France

⁴ CNRS, Biogéosciences, UMR 6282, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France

⁵ Alma Mater, Studiorum –Università di Bologna, 40126 Bologna, Italie

Conférence : 9^{ÈME} JOURNÉE RÉGIONALE DES DOCTORANTS EN AUTOMATIQUE (JRDA), juin 2023, Lille, France

Résumé : L'analyse de la forme de l'otolithe est l'une des techniques les plus répandues dans le monde pour distinguer les unités de stock de poissons, car elle intègre à la fois des facteurs environnementaux et génétiques. Toutes les études précédentes sur la forme de l'otolithe ont été réalisées à l'aide d'images bidimensionnelles (2D), une représentation partielle de la forme totale de l'otolithe. Avant d'identifier les limites des unités de stock, l'influence d'autres facteurs potentiels contrôlant la forme de l'otolithe doit être analysée afin de limiter leur biais. Dans cette étude, la présence d'une asymétrie dans la forme de l'otolithe en fonction du côté de l'oreille interne (c'est-à-dire l'oreille interne gauche par rapport à l'oreille interne droite) a été testée sur le rouget barbet de vase (*Mullus barbatus*) provenant de la mer Méditerranée ; en comparant les approches des analyses de la forme de l'otolithe en 2D et en trois dimensions (3D).

21
Juin
2023

9 ÈME JOURNÉE RÉGIONALE DES DOCTORANTS EN AUTOMATIQUE

Analyse de forme en 3D des otolithes pour mieux délimiter les stocks du rouget barbet de vase en utilisant l'asymétrie des côtés de l'oreille interne

Nicolas Andriolovanirina^{1,2}, Émilie Poisson Caillault¹, Sébastien Couette³, Rémi Laffont^{3,4}, Lauriane Poloni³, Camille Lutet-Toti^{4,5}, Kélig Mahé²



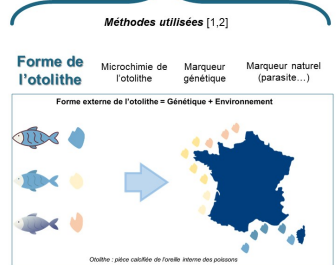
¹ Université du Littoral Côte d'Opale, UR 4491, LISIC, Laboratoire d'Informatique Signal et Image de la Côte d'Opale, F-62100 Calais, France
² Ifremer, Laboratoire Ressources Halieutiques, 62321 Boulogne-sur-Mer, France
³ Ecole Pratique des Hautes Études, PSL Université, 75014, Paris, France
⁴ CNRS, Biogéosciences, UMR 6282, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France
⁵ Alma Mater, Studiorum – Università di Bologna, 40126 Bologna, Italie



Contexte
 33 % des stocks de poissons surexploités Besoin croissant en protéines > +9 milliards d'habitants en 2050 (source : FAO)



Délimitation des unités de gestion (stocks)



Problématique

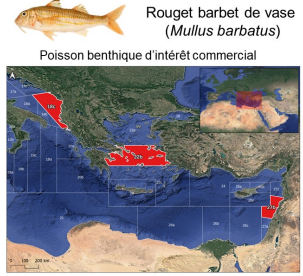
- Forme de l'otolithe extraite des images 2D [3]
- Image 2D = 1 plan de projection d'un objet 3D
- Un biais potentiel peut exister en raison de la position de l'objet lors de l'acquisition en 2D.

L'analyse en 3D de la forme de l'otolithe apporte-t-elle plus de précision et d'information à l'identification de stock ?

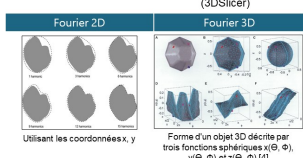
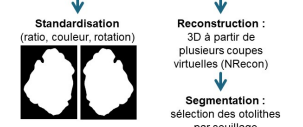
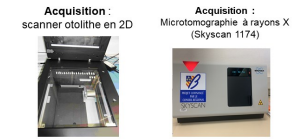
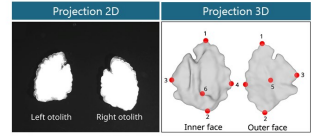
Objectifs

- Tester le biais potentiel des différences de côté de l'oreille interne en comparant la forme de l'otolithe de l'oreille interne gauche et droite entre les approches 2D et 3D
- Comparer la variation morphologique des otolithes en fonction de la localisation (c.-à-d. les limites des unités de stock)

Méthodologie



82 poissons : 29 mer Adriatique (18c), 30 mer Egée (22b), 23 bassin du Levant (27b)



Modèle mixte

$$O \sim \alpha_0 + \alpha_1 SI + \alpha_2 GSA + \alpha_3 SI.GSA$$

O: Forme de l'otolithe
 SI: Côté de l'otolithe (gauche ou droite)
 GSA: Localisation (géographique sub-arc)

Résultats

Type of Data	Response Variable	Explanatory Variable	p-Value
2D	O	O	<0.001 ***
		SI	0.000 ***
		GSA	<0.001 ***
		SI.GSA	0.000 ***

Type of Data	Response Variable	Explanatory Variable	p-Value
3D	O	O	<0.001 ***
		SI	<0.001 ***
		GSA	<0.001 ***
		SI.GSA	<0.001 ***

Conclusion

- 3D montre une différence significative entre les otolithes gauche et droit des mêmes individus
- La Méditerranée Est (27b) se distingue du reste (18c et 22b) par la forme de l'otolithe en 2D et en 3D
- 3D plus précis que le 2D, montre des différences non observables en 2D
- Une étude à plus large échelle géographique est en cours de réalisation

Références

[1] Caillat, S., Kerr, L., Mariani, S. Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science. PhD. Elsevier Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014. ISBN 978-0-323-98725-3
 [2] ICES Stock Identification Methods Working Group (SIMWG). ICES Sci Rep. 2022, 4, 66. <https://doi.org/10.1093/ices/spab020>
 [3] Bird, J.L., Epler, D.T., Cheekley, D.M., Jr. Comparisons of Herring Otoliths Using Fourier Series Shape Analysis. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1986, 43, 1028-1034. <https://doi.org/10.1139/f86-150>
 [4] Shen, L., Fard, H., McPhee, M.A. Modeling Three-Dimensional Morphological Structures Using Spherical Harmonics. Evolution 2008, 63, 1000-1010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.00027.x>
 Article reference: <https://doi.org/10.3389/gen.2022.1050197>

Financiers



Contact: nicolas.andriolovanirina@ifremer.fr

Titre : Clustering: Fish Environment and Fish Stocks

Auteurs : Valeriia Bondarenko ¹, Emilie Poisson Caillault ¹, Andrialoanirina Nicolas ^{1,2}, Kélig Mahé ²

Affiliations :

¹ Université du Littoral Côte d'Opale, UR 4491, LISIC, Laboratoire d'Informatique Signal et Image de la Côte d'Opale, F-62100 Calais, France

² Ifremer, Laboratoire Ressources Halieutiques, 62321 Boulogne-sur-Mer, France

Conférence : 2ème Workshop IA-Optimisation de l'A2U. 5-6 Juin 2024, Calais

Abstract : Otolith shape are commonly used to discriminate fish populations and intra-species stocks. These fish stocks and their otolith shape could be influenced by three sources: its ontogeny, its genetics and the fish environmental conditions. We analyze an approach for modeling between the fish otolith structure and socio-ecological or environmental changes at various spatial scales and consider the possibility to develop the clustering criteria for evaluating environmental models. They will participate in a competition with a goal to choose the most adequate and applied clustering method using information criteria (Rand index, Adjusted rand index, mean and fuzzy silhouette). Median and range of each environmental variable from Y-year time period considered (Y=1,3,5) are computed from OGS MED-Units Task data extracted from the models produced by the E.U. Copernicus Marine Service and available on the Copernicus website (<https://marine.copernicus.eu/>).

The analysis of long memory and persistence in the process of influence modification for the considered year, three years and five years is studied. The adequacy of the model has been tested on real time data using partial and full Geographical sub area (parts of the Mediterranean Sea). The important task is the development and checking of quality criteria model building, which allows us to analyze the number of ecological regions and select the most adequate number of clusters. The model of estimation clustering algorithms is proved by numerical experiment. During the process of creating software, a hierarchical framework was conducted as described in this poster (selection of clustering approaches, selection of criteria, statistical validation). Having considered the information criteria in spatial and temporal resolution, we tried to explain the impact of data from different years on the influences of environmental changes. The performance of the clustering algorithms presented constitutes a benchmark against which several improvement strategies are possible. The results obtained allow operational use of the clustering techniques of fish stock of Red Mullet in Mediterranean sea according to *a priori* frontiers as Strait of Sicile and Strait of Otranto.

Clustering: Fish Environment vs Fish Stocks

Valeria Bondarenko ; Émilie Poisson Caillaut ; Nicolas Andriahovanina ; Kélig Mahté

Université du Littoral Côte d'Opale LISIC - IFREMER LRH



CPER Cornelia

Contact: emilie.poisson@univ-littoral.fr

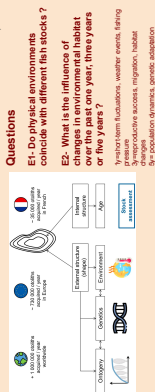


Journées IA-Optim Juin 2024, Calais



Context

- Oceanic catched structures in the inner sea of vertebrates, allow to identify the fish eaten by other fish and understand the fish life history
-
-

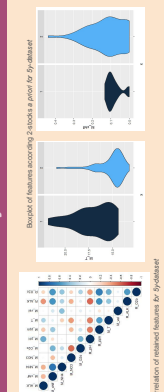


Study Case: Red Mullet in Mediterranean sea
 88 sites
 Mediterranean Sea Biogeocoenosis Researches (productivity, biomass, abundance, diversity, etc.)
 with 100 x 100 m resolution (2000-2020) and a grid of biomass increasing with depth
 5 years (2014-2018), 3 years (2016,2018), and 1 year (2018)
 a prior knowledge: 2 or 3 stocks on other species, 80% of fish and 20% of invertebrates.

What ?

- M.1. Which statistical techniques can address the question?
- M.2. How many physical environments? (i.e. number of lakes)
- M.3. Which consensus among these techniques?
- M.4. Same conditions with 1950-year past physical information?
- EE: Environment (ML: Machine Learning view)

Good features ? 5-years



Framework

Preprocessing: X: database of features
 remove features with constant (p<1% => X-reduced)
 X: spatially-reduced
 W-Local: Jaccard-Pearson Similarity, 7-neighbor
 K=2-lake (DBSCAN used for K=2)

Applied Clustering methods (R packages):
 Hierarchical methods
 Local Agglomeration by average and wardD2 criteria
 AGNES - Agglomerative Nesting by Ward
 product - Agglomerative with p-values and multiple bootstrap resampling, wardD2

One-Step Expectation Maximization methods
 EM - EM-VW: variable shape, volume and orientation
 EM - EM-VW: variable shape, volume and orientation
 EM - EM-VW: variable shape, volume and orientation
 EM - EM-VW: variable shape, volume and orientation

Expectation Maximization methods
 EM - EM-VW: variable shape, volume and orientation
 EM - EM-VW: variable shape, volume and orientation
 EM - EM-VW: variable shape, volume and orientation

Clustering-based methods
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means

Clustering-based methods
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means

Clustering-based methods
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means

Clustering-based methods
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means

Clustering-based methods
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means

Clustering-based methods
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means

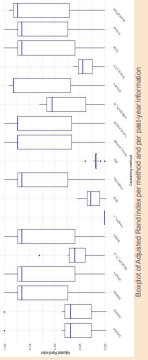
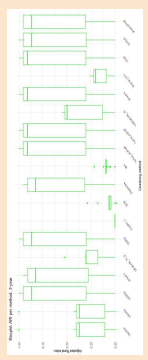
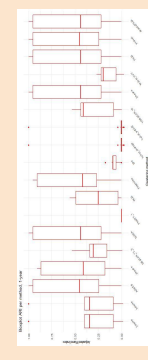
Clustering-based methods
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means

Clustering-based methods
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means

Clustering-based methods
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means

Clustering-based methods
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means
 Fuzzy - Fuzzy k-means

Results

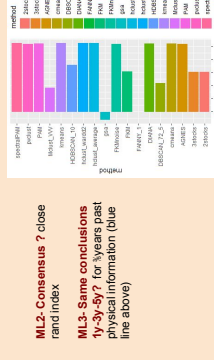
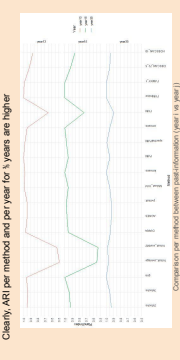


ARI > 0 in almost cases
 MeanARI(2-lakes, Method) > 0.3
 We clearly see that the analysis can be influenced by the choice of clustering algorithm, distance or similarity measure, and parameters. Different combinations of these factors can produce different clustering results, and there is no universal or optimal choice that will work for every data set.

Having considered the framework as validation criteria for fifteen methods, we believe that the objective way to measure the quality or confidence of clustering, and we need to use both internal and external criteria as well as visual and qualitative methods, to evaluate and compare the results of clustering. We need to explain the implications and applications of clustering for our problem or domain. It should be noted that analyses can be quite labor-intensive for multidimensional data sets.

Discussion

First Answers
 E1-ML1 - Do physical environments coincide with different fish stocks?
 MeanARI(2-lakes, Method) > 0.3 - a link but K-number could be higher than 2 > 4-7)
 E2-ML3 - What is the influence of changes in environmental habitat over the past one year, three years or five years?
 Clearly, ARI per method and per year for 3 years are higher



References

1. Bondarenko V, Poisson E, Caillaut N, Andriahovanina N, Mahté K. (2024) Clustering of fish environment vs fish stocks in the Mediterranean sea. *Ecology and Evolution*, 15(11), 1-15.
 2. Bondarenko V, Poisson E, Caillaut N, Andriahovanina N, Mahté K. (2024) Clustering of fish environment vs fish stocks in the Mediterranean sea. *Ecology and Evolution*, 15(11), 1-15.
 3. Bondarenko V, Poisson E, Caillaut N, Andriahovanina N, Mahté K. (2024) Clustering of fish environment vs fish stocks in the Mediterranean sea. *Ecology and Evolution*, 15(11), 1-15.
 4. Bondarenko V, Poisson E, Caillaut N, Andriahovanina N, Mahté K. (2024) Clustering of fish environment vs fish stocks in the Mediterranean sea. *Ecology and Evolution*, 15(11), 1-15.
 5. Bondarenko V, Poisson E, Caillaut N, Andriahovanina N, Mahté K. (2024) Clustering of fish environment vs fish stocks in the Mediterranean sea. *Ecology and Evolution*, 15(11), 1-15.

Titre : 3D sagittal otolith reconstruction from spherical Fourier descriptors

Auteurs : Nicolas Andrialovanirina^{1,2}, Rémi Laffont³, S. Couette^{3,4}, Aurélie Matéos^{5,6}, Kélig Mahé², Émilie Poisson Caillault¹

Affiliations :

¹Univ. Littoral Côte d'Opale, UR 4491, LISIC, F-62100 Calais, France

²Ifremer, Fisheries Laboratory, 150 quai Gambetta, 62321 Boulogne-sur-Mer, France

³UMR CNRS 6282Biogéosciences, Université de Bourgogne, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

⁴École Pratique des Hautes Études, PSL Université, 75014 Paris, France

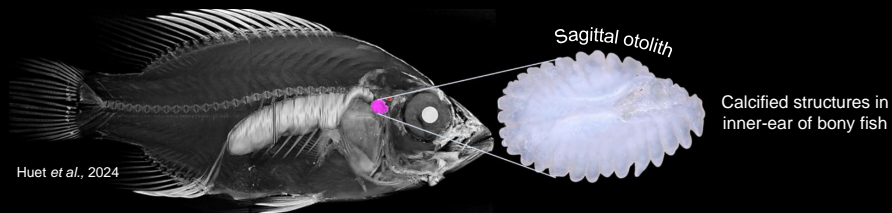
⁵Université d'Artois, 62030 Arras, France

⁶UMR Transfrontalière BioEcoAgro N°1158, 62217 Tilloy-les-Mofflaines, France

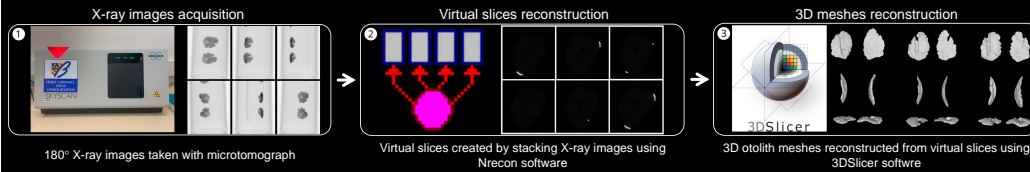
Conférence : RFIAP 2024, SSFAM (Société Savante Française d'Apprentissage Machine); AFRIF (Association Française pour la Reconnaissance et l'Interprétation des Formes), juillet 2024, Lille, France

3D SAGITTAL OTOLITH RECONSTRUCTION FROM SPHERICAL FOURIER DESCRIPTORS

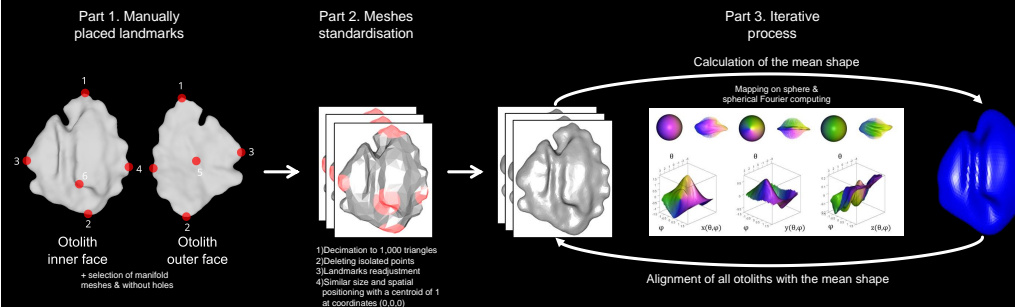
N. Andrialovanirina^{1,2} R. Laffont³ S. Couette^{3,4} A. Matéos^{5,6} K. Mahé² É. Poisson Caillault¹



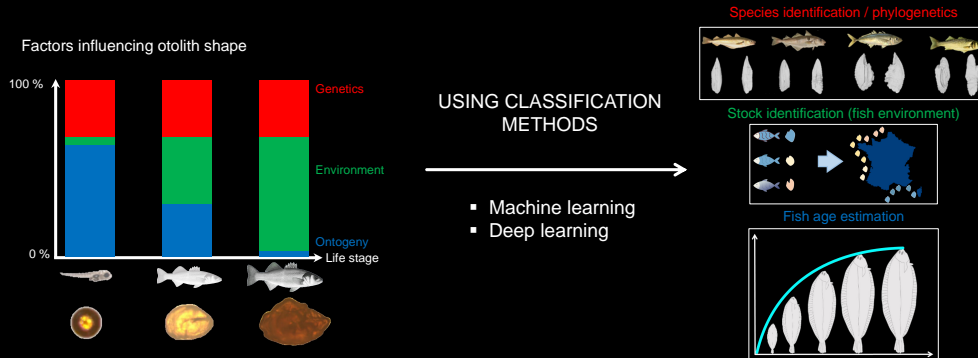
3D Image acquisition



3D Image reconstruction from Spherical Fourier



Potential use of 3D otolith shape



Funders:



Contact: nicolas.andrialovanirina@ifremer.fr

Titre : Red mullet stock identification without any reference using otolith shape

Auteurs : Nicolas Andrialovanirina^{1,2}, Émilie Poisson Caillault¹, Kélig Mahé²

Affiliations :

¹ Univ. Littoral Côte d'Opale, UR 4491, LISIC, F-62100 Calais, France

² Ifremer, Fisheries Laboratory, 150 quai Gambetta, 62321 Boulogne-sur-Mer, France

Conférence : RFIAP 2024, SSFAM (Société Savante Française d'Apprentissage Machine); AFRIF (Association Française pour la Reconnaissance et l'Interprétation des Formes), juillet 2024, Lille, France

Résumé : Dans le cadre d'une pêche durable, subissant un changement global, la connaissance préalable des limites géographiques de chaque population étudiée est requise. Dans cette étude, l'analyse automatique innovante de la forme tridimensionnelle (3D) des otolithes des rougets barbets de la Mer Méditerranée a été comparée à l'analyse conventionnelle en bidimensionnel (2D). Il a été conclu que cette nouvelle technique tridimensionnelle de la forme était plus précise pour délimiter le stock, que ce soit en utilisant une classification non supervisée ou supervisée.

RED MULLET STOCK IDENTIFICATION WITHOUT ANY REFERENCE USING OTOLITH SHAPE



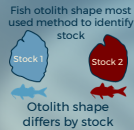
N. Andrialovanirina^{1,2}, É. Poisson Caillault¹, K. Mahé²



INTRODUCTION



Stock delineation is important for sustainable fisheries (1 stock = unique management structure)

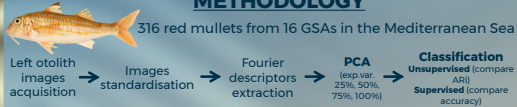


« Otolith is calcified structure in inner-ear of bony fish »

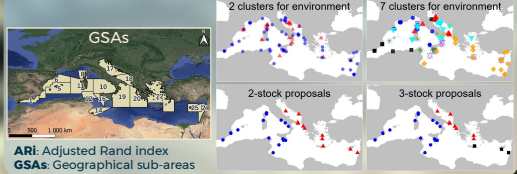


- Q1: Is 3D shape analysis more efficient than 2D shape analysis to identify stock ?
- Q2: What classifier (unsupervised or supervised) is more efficient to identify stock ?

METHODOLOGY



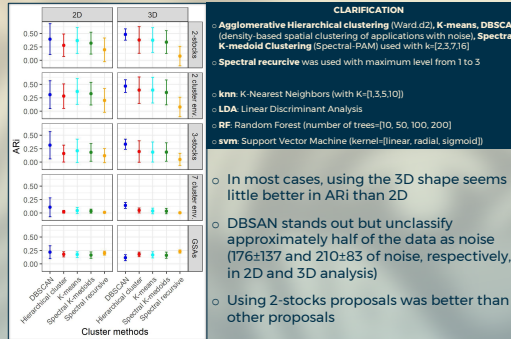
ALL PSEUDO REFERENCES TO COMPARE



UNSUPERVISED

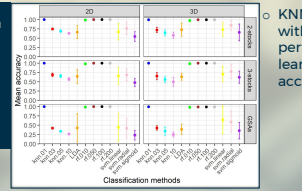
RESULTS

SUPERVISED

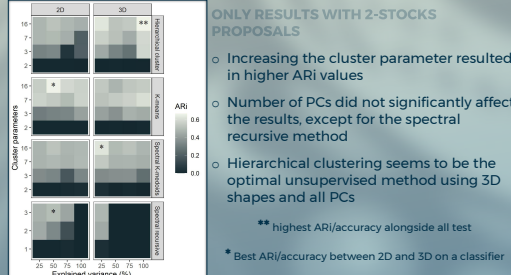


- CLARIFICATION**
- Agglomerative Hierarchical clustering (Ward.d2), K-means, DBSCAN (density based spatial clustering of applications with noise), Spectral K-meoid Clustering (Spectral-PAM) used with k=[2,3,7,16]
 - Spectral recursive was used with maximum level from 1 to 3
 - knn: K-Nearest Neighbors (with K=[1,3,5,10])
 - LDA: Linear Discriminant Analysis
 - RF: Random Forest (number of trees=[10, 50, 100, 200])
 - svm: Support Vector Machine (kernel=[linear, radial, sigmoid])

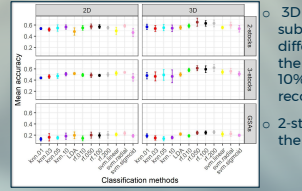
- In most cases, using the 3D shape seems a little better in ARI than 2D
- DBSCAN stands out but unclassifies approximately half of the data as noise (176±137 and 210±83 of noise, respectively, in 2D and 3D analysis)
- Using 2-stocks proposals was better than other proposals



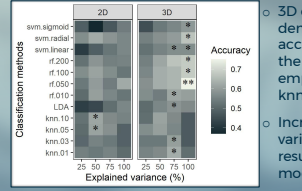
- KNN with k=1 and all RF with all ntrees tested performed the best learning rate, achieving an accuracy superior to 99%



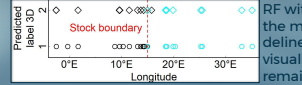
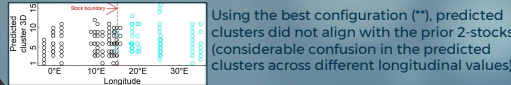
- ONLY RESULTS WITH 2-STOCKS PROPOSALS**
- Increasing the cluster parameter resulted in higher ARI values
 - Number of PCs did not significantly affect the results, except for the spectral recursive method
 - Hierarchical clustering seems to be the optimal unsupervised method using 3D shapes and all PCs
 - ** highest ARI/accuracy alongside all test
 - * Best ARI/accuracy between 2D and 3D on a classifier



- 3D descriptors showed substantial positive differences compared to the 2D descriptors (about 10% gap of successful recognition for RF)
- 2-stocks proposals were the most effective



- 3D consistently demonstrated the highest accuracy irrespective of the classification method employed except some knn
- Increasing the explained variance of the data used resulted in improved model efficiency



- RF with ntree=50(**) using 3D was the most accurate method for delineating stocks into 2 but visualizing the stock boundary remains relatively challenging

CONCLUSION

- Q1: Using 3D shape analysis is more efficient than 2D especially with supervised classification
- Q2: For unsupervised method using hierarchical clustering with 3D shape was the most efficient and RF for supervised method
- Stock identification remains complex problem with sensitivity to noise and less robust against atypical samples ; fish can move over long distances and interact with different stocks
- Samples could be larger more balanced between classes | using other method to describe the otolith shape | using other method to reduce dimensions
- Promising approach to improve stock delineation would be to conduct multi-tracer analysis, combining data on otolith shape, otolith microchemistry, and fish genetics



Funders: ifsea



European Project MED UNIT

Contact: nicolas.andrialovanirina@ifremer.fr

Titre : Otolithes 2D et 3D: de la structuration à la classification des poissons

Auteurs : Nicolas Andrialovanirina^{1,2}, Émilie Poisson Caillault¹, Kélig Mahé²

Affiliations :


¹ Univ. Littoral Côte d'Opale, UR 4491, LISIC, F-62100 Calais, France

² Ifremer, Fisheries Laboratory, 150 quai Gambetta, 62321 Boulogne-sur-Mer, France


Conférence : Journée Régionale des Doctorants en Sciences de la Mer et Automatique. 8 juillet 2024, Boulogne-sur-mer, France

Résumé : Dans le cadre d'une pêche durable, subissant un changement global, la connaissance préalable des limites géographiques de chaque population étudiée est requise. Dans cette étude, l'analyse automatique innovante de la forme tridimensionnelle (3D) des otolithes des rougets barbets de la Mer Méditerranée a été comparée à l'analyse conventionnelle en bidimensionnel (2D). Il a été conclu que cette nouvelle technique tridimensionnelle de la forme était plus précise pour délimiter le stock, que ce soit en utilisant une classification non supervisée ou supervisée.





Forme partielle





UNIVERSITÉ
DU LITTORAL
CÔTE D'OPALE

Otolithes 2D et 3D: de la structuration à la classification des poissons

Nicolas Andrialovanirina ^{1,2,*}, Emilie Poisson Caillaud ¹, Kélig Mahé ²

1 Univ. Littoral Côte d'Opale, UR 4491, LISIC, F-62100 Calais, France;
2 IFREMER, Unité HMMM, 150 quai Gambetta, F-62321 Boulogne-sur-Mer, France;
* nicolas.andrialovanirina@ifremer.fr



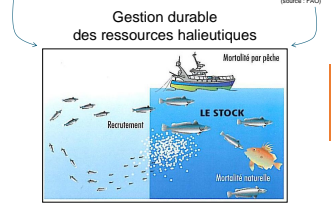


Forme complète

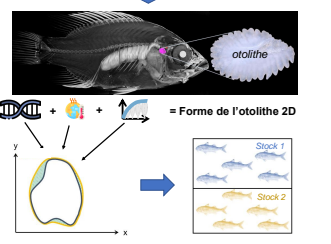
Introduction

33 % des stocks de poissons surexploités

Besoin croissant en protéines et acides gras oméga 3 + 9 milliards d'habitants en 2050 (source : FAO)



Identification des unités de gestion (stocks)



Projet scientifique de la thèse

✓ Utilisation d'images acquises non standardisées : développement méthodologique pour obtenir des « big data » (12 000 images traitées)



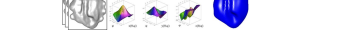
✓ Analyser les stocks à micro-échelle spatiale : Ile de la Réunion



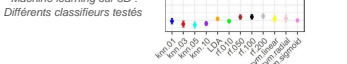
✓ Acquérir des images 2D et 3D pour étudier si le 2D est représentatif du 3D et si le 3D permet d'avoir des nouveaux résultats



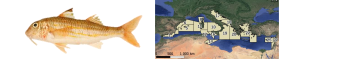
✓ Développer l'extraction des informations 3D : Spherical Fourier



✓ Optimiser les analyses de données par classification



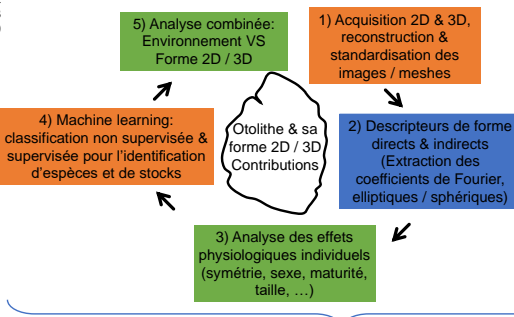
✓ Apport du 3D sur du 2D pour une même espèce en relation avec l'environnement



✓ Reconnaissance d'espèces d'un écosystème par forme 3D



Résultats de la thèse



- Disciplines**
- Mathématiques
 - Ecologie
 - Signal, Informatique

1) Au sein d'une espèce

Mullus barbatus

Asymmetry: Presence of asymmetry, Absence of asymmetry

2 clusters for environment, 7 clusters for environment

2-stock proposals, 3-stock proposals

$$O \sim \alpha_0 + \alpha_1 SI + \alpha_2 GSA + \alpha_3 SI \cdot GSA$$

O: Forme de l'otolith / SI: Côté de l'otolith (oreille gauche ou droite) / GSA: Localisation (geographical sub-areas)

1) Entre des espèces



Conclusion

Plusieurs Disciplines

- Mathématiques
- Signal, Informatique
- Ecologie

- Outil pour standardiser des big data 2D
- Développement des données Spherical 3D
- Optimisation des classifieurs aux données otolithes
- Forme 3D : analyse beaucoup plus précise en intra-espécifique en lien avec environnement et entre espèces en lien avec leur comportement

Dans le futur, continuer à développer les outils et les acquisitions 2D et 3D de l'otolith pour répondre à des questions sur les espèces actuelles et archéologiques pour prédire les futurs changements

Financiers

Collaborations