



HAL
open science

Mise au point d'une méthode de marquage vital des alevins chez l'esturgeon européen *Acipenser sturio* : rapport final 2009

Aude Lochet, Philippe Jatteau

► **To cite this version:**

Aude Lochet, Philippe Jatteau. Mise au point d'une méthode de marquage vital des alevins chez l'esturgeon européen *Acipenser sturio* : rapport final 2009. [Rapport de recherche] irstea. 2010, pp.24. hal-02596677

HAL Id: hal-02596677


<https://hal.inrae.fr/hal-02596677>

Submitted on 15 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Partenariat 2009 – **Domaine** : *Espèces aquatiques continentales* - Action n°5



Mise au point d'une méthode de marquage vital des alevins chez l'esturgeon européen *Acipenser sturio*

Rapport final 2009

***Aude Lochet
Philippe Jatteau***

Mars 2010

Contexte de programmation et de réalisation

Depuis l'année 2007, des alevinages de soutien sont régulièrement pratiqués pour l'esturgeon européen *Acipenser sturio* dans le bassin versant Gironde-Garonne-Dordogne. Afin d'évaluer l'efficacité de ces alevinages, des méthodes de marquage de masse chimique ont été mises en place. Ces méthodes doivent permettre d'identifier de façon fiable les poissons issus d'alevinage. Nous présentons ici l'efficacité des méthodes de marquage utilisées et les améliorations à apporter à nos protocoles. Nous présentons également un bilan des actions de marquage de masse menées sur les jeunes esturgeons alevinés l'année 2009.

Les auteurs

Aude Lochet

Ingénieur de Recherche

aude.lochet@cemagref.fr

Cemagref Bordeaux, Unité Ecosystèmes Estuariens et Poissons Migrateurs Amphihalins, 50 avenue de Verdun 33612 Cestas

Philippe Jatteau

Ingénieur de Recherche

philippe.jatteau@cemagref.fr

Cemagref Bordeaux, Unité Ecosystèmes Estuariens et Poissons Migrateurs Amphihalins, 50 avenue de Verdun 33612 Cestas

Les correspondants

Onema : Direction de l'action scientifique et technique

Laurent Beaulaton, laurent.beaulaton@onema.fr

Référence du document :

Cemagref : Unité de recherche Ecosystèmes estuariens et poissons migrants amphihalins

Paul Gonthier, paul.gonthier@cemagref.fr

Patrick Lambert, patrick.lambert@cemagref.fr

Référence du document :

Droits d'usage :	accès libre
Couverture géographique :	Par ex, dépt du Loiret, commune de Limoges
Niveau géographique [un seul choix] :	Mondial, national, régional, départemental, communal
Niveau de lecture [plusieurs choix possibles] :	experts
Nature de la ressource :	Document

**Mise au point d'une méthode de marquage vital des alevins chez l'esturgeon européen
Acipenser sturio
Rapport final 2009
A. Lochet, P. Jatteau**

SOMMAIRE

Introduction	9
1. Evaluation de l'efficacité du marquage et propositions d'amélioration du protocole 10	
1.1. Rappel : détection du marquage chimique chez l'esturgeon.....	10
1.2. Bilan des marquages chimiques pratiqués en 2007 et 2008.....	11
1.3. Amélioration du protocole de marquage.....	12
1.3.1. Modification des caractéristiques de balnéation à la tétracycline	13
1.3.2. Recherche d'une autre molécule de marquage.....	15
1.4. Difficultés associées à nos méthodes de marquage.....	17
2. Marquages de masse des esturgeons européens pratiqués en 2009.	19
2.1. Marquages tests des esturgeons européens avec de nouveaux marqueurs et de nouveaux protocoles.....	20
2.2. Marquage des esturgeons européens alevinés en 2009	21
Perspectives pour les marquages de masse à venir	22
Références	23

**Mise au point d'une méthode de marquage vital des alevins chez l'esturgeon européen
Acipenser sturio
A. Lochet, P. Jatteau**

RESUME

Depuis l'année 2007, plus de 130 000 jeunes esturgeons européens ont été marqués puis relâchés en Garonne et en Dordogne. Pourtant, l'efficacité des marquages réalisés en 2007 et 2008 s'avère très limitée : 6 mois après la balnéation dans du chlorhydrate de tétracycline à 300ppm pendant 8h, seulement 50% des individus présentent une marque.

Pour améliorer le succès au marquage, de nouvelles concentrations en marqueurs et de nouvelles molécules ont été testées. Dans un premier temps, les expérimentations ont été réalisées sur un modèle biologique l'esturgeon sibérien *Acipenser baerii*. Ainsi, le protocole de marquage à la tétracycline à 600ppm pendant 8h a été choisi pour marquer les 33100 esturgeons européens déversés en milieu naturel l'année 2009. En revanche, les essais de marquage à l'alizarine red S se sont avérés peu concluants sur les esturgeons européens. Des ajustements sont nécessaires avant d'utiliser cette molécule pour les marquages à venir.

Les expériences pratiquées sur notre modèle biologique, l'esturgeon sibérien, montrent que, malgré tous nos efforts pour optimiser la réussite au marquage, celle-ci reste relativement faible. Ainsi, la réussite au marquage estimée seulement un mois après balnéation n'excède pas 70%, pour les protocoles les plus efficaces. La nageoire pectorale est la structure préférentiellement prélevée chez l'esturgeon. C'est elle qui nous a permis de déterminer la présence ou non d'une marque. Cependant, une étude comparée de la qualité des marques observées sur différentes structures osseuses (les nageoires pectorales, les otolithes et les écussons dorsaux) montre que la nageoire pectorale n'est pas une structure fiable pour détecter les marques chimiques. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour identifier d'autres structures osseuses adéquates pour la détection de la marque.

MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)

Marquage de masse, esturgeon européen, esturgeon sibérien, nageoire pectorale, tétracycline, alizarine

Chemical mass-marking on European sturgeon *Acipenser sturio* young stages
A. Lochet, P. Jatteau

ABSTRACT

Since 2007, more than 130,000 young European sturgeons were marked and released in the Garonne and the Dordogne rivers. Marking success in 2007 and 2008 was very limited: six months after immersion into a tetracycline hydrochloride bath (300ppm-8h), only 50% of the fish were marked.

Consequently, our marking protocol had to be improved. New concentrations and new markers were tested using, first, our biological model Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. The marking protocol with tetracycline (600ppm-8h) was used to mark the 33,100 European sturgeons released in the rivers in 2009. However, the alizarin red S marking trials were not successful on European sturgeons. Adjustements are needed before using this molecule for mass markings.

The experiments on Siberian sturgeons also showed that, despite all our efforts, marking success remains relatively low. Considering the most efficient marking protocols, marking success do not exceed 70%, only one month after marking. Pectoral fin ray is the preferred sampled structures on sturgeons. It is the one we used to detect chemical marks. However, a comparative study of mark quality between different structures (pectoral fin rays, otoliths, dorsal scutes) showed that pectoral fin ray is not a reliable structure to check on chemical marks. Further investigations are needed to find calcified structures suitable for chemical mark detection.

KEY WORDS (THEMATIC AND GEOGRAPHICAL AREA)

Mass marking, European sturgeon, Siberian sturgeon, Pectoral fin ray, Tetracycline, Alizarin

***Mise au point d'une méthode de marquage vital des alevins chez l'esturgeon européen
Acipenser sturio
A. Lochet, P. Jatteau***

**Synthèse pour l'action opérationnelle
[4 pages maximum]**

Contexte général (quelle situation, quels enjeux), objectifs généraux du projet (à quelles questions veut-on répondre) et quelques éléments de méthodologie

La survie de la population d'esturgeons européens du bassin versant Gironde-Garonne-Dordogne passe par des alevinages de soutien. Depuis l'année 2007, des alevinages sont réalisés chaque année en Garonne et en Dordogne. Au total, plus de 130000 individus ont été relâchés. De façon à évaluer l'efficacité des alevinages, il est capital de pouvoir discriminer les esturgeons sauvages des esturgeons issus d'alevinages mais aussi de pouvoir discriminer les différents groupes d'individus alevinés (à différents endroits ou différents moments par exemple).

La méthode de marquage de masse chimique a été choisie pour la distinction des esturgeons européens issus d'alevinage. L'objectif de nos travaux est de proposer un protocole de marquage vital qui permette d'identifier de façon fiable les individus issus d'alevinage. Les travaux du Cemagref s'étaient jusqu'à maintenant focalisés sur la recherche d'un protocole de marquage n'affectant pas la survie et le comportement des individus. Ainsi, les individus des cohortes 2007 et 2008 ont été marqués à un jeune âge (environ 2-3 mois soit à un poids de 3g) au chlorhydrate de tétracycline à une concentration de 300 ppm pendant 8h, puis ont été déversés en milieu naturel.

Cependant, pour juger de l'efficacité de la méthode de marquage, il est important d'estimer également la pérennité de la marque chimique produite. L'esturgeon européen étant une espèce protégée, la détection du marquage chimique ne doit pas altérer la survie des individus. Le prélèvement d'une section du premier rayon osseux de la nageoire pectorale est une méthode idéale, puisqu'un tel prélèvement n'a pas d'effets néfastes sur la survie ou le comportement de nage des poissons.

Principaux acquis transférables obtenus et implications pratiques, recommandations, réalisations pratiques, limites de l'utilisation

- ✓ Le marquage à la tétracycline à 300ppm pendant 8h, utilisé pour les individus déversés en 2007 et 2008, présente une efficacité très limitée. Une amélioration peut être apportée en utilisant une concentration en marqueur plus forte : le marquage à la tétracycline à 600ppm pendant 8h permet d'augmenter sensiblement le pourcentage d'individus dont la nageoire pectorale présente une marque.
- ✓ Le pourcentage d'individus à nageoires pectorales marquées n'est pas le seul attribut pour déterminer le succès au marquage : la qualité de la marque intervient également. Deux types de marque peuvent être observés dès le premier mois suivant le marquage : des marques continues et discontinues. Nous avons considéré que seules les marques continues sont caractéristiques d'un marquage réussi. Elles représentent l'efficacité « réelle » du marquage. En effet, il est fort probable qu'une marque discontinue devienne particulièrement difficile à détecter à mesure que les individus grandissent.
- ✓ Plus préoccupant est la faible efficacité « optimale » du marquage à partir des nageoires pectorales. L'intensité du marquage diminue avec le temps. L'efficacité du marquage est donc maximale peu après la balnéation des individus dans le marqueur. Nos travaux sur les esturgeons sibériens montrent que l'efficacité « optimale » du marquage avoisine les 70%. Si, seulement un mois après marquage, on ne peut identifier de façon fiable que 70% des individus, qu'en sera-t-il plusieurs mois voire plusieurs années après le marquage ?
- ✓ L'efficacité limitée du marquage chimique est liée au choix de la structure choisie pour détecter le marquage chimique : la nageoire pectorale. L'efficacité du marquage a été comparée entre les nageoires pectorales, les otolithes et les écussons dorsaux. La présence de marques discontinues n'est observée que sur les nageoires pectorales. De plus, seules les nageoires pectorales présentent des pourcentages d'individus marqués très variables et parfois très faibles. Nous pensons que l'auto fluorescence et la formation ontogénique de la nageoire pectorale affectent la détection des marques chimiques.
- ✓ Si le marquage chimique est poursuivi sur l'esturgeon européen, nous proposons deux pistes de travail. 1. Il faudrait envisager le prélèvement d'une autre pièce calcifiée pour détecter le marquage chimique sur des poissons marqués aussi jeunes. Il est

capital que ce prélèvement n'affecte pas la survie des individus. 2. Si la nageoire pectorale s'avère être la seule structure dont le prélèvement n'affecte pas la survie, il peut être envisageable de marquer les poissons à un âge plus avancé. Nous disposons de quelques éléments en faveur d'une réussite au marquage plus grande lorsque le marquage est réalisé sur des individus plus âgés que 2-3mois.

° Pour en savoir plus : quelques références (dont les livrables, articles prévus...) ; adresse électronique et/ou site internet de(s) auteur(s)]

Lochet, A.; Jatteau, P.; Gessner, J., Soumis: Detection of chemical marks for stocking purposes in sturgeon species. J. appl. Ichthyol.

***Mise au point d'une méthode de marquage vital des alevins chez l'esturgeon européen
Acipenser sturio
A. Lochet, P. Jatteau***

Introduction

La survie de la population d'esturgeons européens du bassin versant Gironde-Garonne-Dordogne passe par la réussite d'alevinages de soutien. Depuis l'année 2007, des déversements de jeunes esturgeons européens sont pratiqués chaque année. Au total, plus de 130 000 poissons issus des reproductions assistées menées à la station expérimentale du Cemagref (Saint Seurin sur Isle) ont été déversés.

La réussite des alevinages de soutien dépend grandement de l'intégration des individus alevinés au milieu naturel, qui peut s'exprimer en termes de survie, de croissance, entre autres (Olney et al., 2003; Lochet et al., 2004). Pour une estimation pertinente de la réussite des alevinages, les poissons alevinés doivent pouvoir être distingués des poissons sauvages (Champigneulle and Cachera, 2003; Olney et al., 2003). A une échelle plus fine, des groupes d'individus alevinés à différents endroits ou différents moments doivent être discriminés (Caudron and Champigneulle, 2009).

Pour l'esturgeon européen, des marquages de masse chimiques sont utilisés. Le présent rapport développe nos activités menées l'année 2009, qui se sont déroulées en deux temps. Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité de nos pratiques de marquage pour ensuite proposer des améliorations au protocole. Dans un second temps, nous avons établi le bilan des marquages de masse pratiqués en 2009.

1. Evaluation de l'efficacité du marquage et propositions d'amélioration du protocole

1.1. Rappel : détection du marquage chimique chez l'esturgeon

Le marquage chimique est basé sur le principe que les molécules de marquage présentes dans l'eau sont incorporées dans les différentes pièces calcifiées des poissons. Par la suite, les molécules de marquage peuvent être détectées au sein des pièces calcifiées à l'aide d'une excitation des molécules appropriée.

La détection du marquage chimique chez l'esturgeon est réalisée sur un prélèvement de rayon de la nageoire pectorale. En effet, un tel prélèvement n'est pas létal pour l'individu (Collins & Smith 1996) et n'induit pas de changement du comportement de nage (Parsons et al. 2003).

Une coupe de rayon de nageoire pectorale est prélevée à environ 1cm de l'articulation. La section résultante est ensuite poncée sur grain 1200 et 4000 puis polie à l'aide de suspension diamant de 1µm et de silice colloïdale (Fig. 1).



Fig. 1 : Coupe de rayon de nageoire pectorale, après ponçage et polissage (x70), observée en microscopie optique.

La présence d'une marque chimique est révélée par excitation de la molécule de marquage en lumière ultra-violet et par l'utilisation d'un cube-filtre approprié, qui dépend de la molécule de marquage utilisée. Par exemple, pour des marqueurs comme la tétracycline, les

caractéristiques du cube-filtre sont : filtre d'excitation : 380-420 nm, longueur d'onde du miroir dichromatique : 430 nm, filtre d'arrêt : 450 nm. La marque de tétracycline apparaît de couleur jaune-vert. Pour des marqueurs tels que l'alizarine red S, les caractéristiques du cube-filtre sont : filtre d'excitation : 510-560 nm, longueur d'onde du miroir dichromatique : 565 nm, filtre d'arrêt : 590 nm. La marque d'alizarine red S apparaît alors de couleur rouge.

1.2. Bilan des marquages chimiques pratiqués en 2007 et 2008.

Les jeunes esturgeons européens relâchés en 2007 et 2008 en Garonne et en Dordogne ont été marqués selon le protocole mis en place en 2007 (marquage au chlorhydrate de tétracycline à 300 ppm pendant 8h).

Alors que la quasi-totalité des individus marqués a été déversée en milieu naturel, quelques dizaines ont été conservées à la structure expérimentale du Cemagref, à Saint Seurin sur l'Isle. Pour évaluer l'efficacité du marquage, nous avons observé la qualité de la marque 6 mois après balnéation dans la tétracycline sur les individus conservés en structure expérimentale (Tab. 1). L'observation de la marque a été réalisée sur une section du premier rayon osseux de la nageoire pectorale.

Il faut noter que, en 2008, les individus ont fait l'objet d'un double marquage : une première fois à un âge de 56 jours, une seconde à un âge de 127 jours, suivant le protocole évoqué ci-dessus.

Tab. 1 : Efficacité du marquage à la tétracycline (300ppm-8h) utilisé sur l'esturgeon européen. L'efficacité a été vérifiée 6 mois après marquage.

Cohorte	Espèce	Age au marquage	Poids au marquage	% d'individus marqués	Nb d'individus
2007	<i>A.sturio</i>	101j	3,9g	51%	26
2008	<i>A.sturio</i>	56j et 127j	1,22g et 17,17g	100 → 50%	25

51 % des individus de la cohorte 2007 présentaient une marque (dans certains cas, il s'agissait plutôt d'une trace de marquage). 100 % des individus de la cohorte 2008 présentaient une seule marque (Tab. 1). Cependant, ces individus auraient dû présenter deux marques puisqu'ils ont été doublement marqués : une des deux opérations de marquage n'a

donc pas été efficace. On a alors considéré une efficacité « moyenne » de marquage de l'ordre de 50% pour les individus de la cohorte 2008.

Sachant que la marque visible se situe plutôt en périphérie du rayon de la nageoire, on peut poser l'hypothèse qu'elle a été produite lors du second marquage et donc, que le marquage réalisé sur les individus de 127 jours a été le plus efficace. De plus amples analyses doivent être menées pour vérifier cette hypothèse. Néanmoins, si elle s'avère exacte, notre hypothèse suggère que la réussite au marquage est liée à la taille des individus au moment du marquage, ce qui a déjà été observé sur d'autres espèces (Secor et al., 1991; Frenkel et al., 2002).

Ces résultats ont mis en évidence une efficacité limitée du protocole de marquage mis en place en 2007 (individus d'environ 3g marqués à la tétracycline à 300ppm pendant 8h). Ils nous ont incités à améliorer notre protocole de marquage et à identifier les éléments responsables de cette efficacité limitée.

1.3. Amélioration du protocole de marquage

Afin d'améliorer notre protocole de marquage, nous avons essentiellement travaillé sur deux éléments : d'une part, la modification des caractéristiques de baignation à la tétracycline ; d'autre part, la recherche d'une autre molécule de marquage. L'analyse des travaux menés sur d'autres espèces a permis de dégager 2 molécules pouvant être testées sur l'esturgeon : la Calcéine et l'Alizarine RedS (Brooks et al. 1994, Mohler 2003, Crook et al. 2007, Baer & Rösch 2008). La première n'a pas été retenue à cause de son prix prohibitif dans le cadre de marquage de masse (environ 1 760€ pour 100g à comparer à 7,5€ pour la Tétracycline).

Pour ces deux éléments, nous avons effectué des tests sur de jeunes esturgeons sibériens *Acipenser baerii* âgés de 1 mois au moment du marquage (poids moyen de 0,6g) et qui ont été soumis à différentes procédures de marquage. Un mois après marquage, les individus ont été sacrifiés pour observation de la marque. L'idée était, par la suite, d'appliquer ces résultats à l'esturgeon européen. Les jeunes esturgeons sibériens ont été placés dans des bacs cylindriques de 1m de diamètre, avec une hauteur d'eau de 12 cm (94L). Ils ont été nourris

sur aliment sec distribué automatiquement 3 fois par heure pendant 24 heures, sauf au moment du marquage, où les individus ont été mis à jeûner au minimum 12 heures avant le marquage. Durant la balnéation dans le marqueur, le renouvellement d'eau a été stoppé (balnéation en statique). Une pompe installée dans la crépine de sortie, a assuré un brassage du bain (léger courant d'eau circulaire). Le niveau d'oxygène a été maintenu par un apport d'oxygène pur.

1.3.1. Modification des caractéristiques de balnéation à la tétracycline

Afin d'optimiser notre réussite au marquage, nous avons choisi de doubler la concentration de tétracycline habituellement utilisée pour les marquages de masse. Ainsi, nous avons travaillé sur trois lots de jeunes esturgeons sibériens : un lot d'individus marqués à la tétracycline à 300ppm pendant 8h (notre référence), un lot marqué à une concentration de 600ppm pendant 8h et un lot témoin (non marqué). L'efficacité du marquage a été vérifiée un mois après marquage, à partir d'un prélèvement du premier rayon de la nageoire pectorale (Tab. 2).

Tab. 2 : Efficacité des différents protocoles de marquage à la tétracycline sur de jeunes esturgeons sibériens

Espèce	Age/Poids au marquage	Protocole	% marque continue + % marque discontinue (% total d'individus marqués)	Nb d'individus
<i>A.baerii</i>	30j / 0,6g	TC : 300ppm-8h	27% + 13% (40%)	15
<i>A.baerii</i>	30j / 0,6g	TC : 600ppm-8h	66% + 27 % (93%)	15

« TC »= tétracycline, « j »=jours, « g »=grammes

Le marquage à 300ppm pendant 8h donne des résultats peu satisfaisants puisque seulement 40 % des individus présentent une marque, dont l'intensité peut être relativement faible. Le marquage à 600 ppm pendant 8h est beaucoup plus satisfaisant puisque 93 % des poissons sont marqués (Tab. 2). En outre, aucune mortalité n'a été recensée suite au marquage. Enfin, même si la solution de tétracycline à 600ppm était relativement opaque (Fig. 2a), nous avons pu constater que les individus présentaient un comportement de nage normal.

a.

b.



Fig. 2 : Bains de tétracycline à 600ppm (a.) et d'alizarine à 400ppm (b.). (Photos P. Jatteau)



Fig. 3 : Sections de rayons de nageoires pectorales observées sous lumière UV. (a.) rayon non marqué, (b.) rayon présentant une marque de tétracycline continue (ligne jaune-vert fluorescente), (c.) rayon présentant une marque de tétracycline discontinue (ilots de fluorescence jaune-vert). (Photos A. Lochet)

Ces pourcentages de réussite au marquage doivent cependant être relativisés. En effet, une marque peut être continue (ligne de fluorescence) ou discontinue (constituée d'ilots de fluorescence) (Fig. 3). Nous ne considérons pas la forme discontinue comme satisfaisante pour une détection fiable du marquage sur le long terme. En effet, il est très probable que la détection d'une marque discontinue soit plus difficile à mesure que les individus grandissent. Avec l'âge, le rayon de la nageoire grandit et les ilots de fluorescence pourront plus facilement se confondre avec l'auto-fluorescence naturelle de la nageoire pectorale. En outre, l'intensité d'une marque tend à diminuer avec le temps (Lorson and Mudrak, 1987; Frenkel et al., 2002), ce qui complique d'autant plus la détection d'une marque discontinue. En conséquence, la réussite « réelle » au marquage est de 27 et 66 % pour les traitements 300ppm-8h et 600ppm-8h respectivement.

66 % (en efficacité « réelle ») des jeunes esturgeons sibériens marqués à un mois (poids < 1g) présentaient une marque avec le protocole de marquage à la tétracycline à 600ppm pendant 8h. Il s'agit d'une proportion plus importante comparée à celle issue du protocole de marquage utilisé jusqu'à lors. En outre, aucune mortalité n'était à déplorer. Ce nouveau protocole a donc été testé sur les esturgeons européens.

1.3.2. Recherche d'une autre molécule de marquage

La recherche d'autres molécules de marquage est motivée par deux raisons. D'une part, la tétracycline a des propriétés antibiotiques et son utilisation en grande quantité risque d'être prohibée à plus ou moins long terme. D'autre part, marquer des individus alevinés avec différentes molécules de marquage permet d'affiner l'évaluation de l'efficacité des alevinages de soutien. En effet, avec plusieurs molécules de marquage, on peut imaginer marquer différemment des groupes d'individus alevinés, par exemple, des groupes d'individus déversés à différents moments au cours de la saison de lâcher ou déversés en différents sites. Cela nous permettrait donc d'identifier les pratiques d'alevinage les plus optimales.

Différentes molécules chimiques peuvent être utilisées pour du marquage chimique de masse. Nous avons choisi de tester l'alizarine red S, dont le coût d'achat était abordable (160 euros pour 100g). Nous avons donc soumis à différents protocoles de marquage des esturgeons sibériens âgés d'un mois (Tab. 3). Les conditions de balnéation étaient identiques à celles déterminées pour la tétracycline. Les protocoles ont été arbitrairement choisis puisque nous n'avons aucune expérience sur ce type de marqueur. Un mois après marquage, une section du premier rayon de nageoire pectorale a été prélevée sur chaque individu pour évaluer la qualité du marquage.

Tab. 3 : Efficacité des différents protocoles de marquage à l'alizarine red S sur de jeunes esturgeons sibériens (vérification du marquage un mois après balnéation)

Espèce	Age/Poids au marquage	Protocole	% marque continue + % marque discontinue (% total d'individus marqués)	Nb
<i>A.baerii</i>	30j / 0,6g	ARS : 100ppm-12h	0% + 7% (7%)	15
<i>A.baerii</i>	30j / 0,6g	ARS : 100ppm-24h	73% + 6% (80%)	15
<i>A.baerii</i>	30j / 0,6g	ARS : 200ppm-12h	47% + 13% (60%)	15
<i>A.baerii</i>	30j / 0,6g	ARS : 200ppm-24h	67% + 20% (87%)	15
<i>A.baerii</i>	30j / 0,6g	ARS : 400ppm-12h	60% + 27% (87%)	15
<i>A.baerii</i>	30j / 0,6g	ARS : 400ppm-24h	60% + 33% (93%)	15

Les traitements 100ppm-24h, 200ppm-24h, 400ppm-12 et 400ppm-24h produisent 80% ou plus d'individus marqués. Pour le traitement 100ppm-24h, les marques peuvent être de faible intensité même si elles restent visibles. Nous n'avons donc pas considéré ce traitement comme suffisamment fiable. Les traitements sur 12h nous paraissaient plus faciles à mettre en œuvre que les traitements sur 24h. Ainsi, nous avons choisi de privilégier le traitement 400ppm-12h pour l'alizarine red S. En outre, la mortalité associée au marquage était faible pour le traitement 400ppm-12h (inférieure à 4%) alors qu'elle était plus forte pour le traitement 400ppm-24h (mortalité de 20% à la fin du marquage et 36% 10h après marquage). Les autres traitements n'ont pas engendré de mortalité.

Lors du marquage à l'alizarine, il a été difficile de contrôler le comportement des poissons à cause de l'opacité de la solution (Fig. 2b). Toutefois, au début du marquage, lors de l'incorporation de l'alizarine, les poissons fuyaient le « nuage » coloré et nageaient frénétiquement.

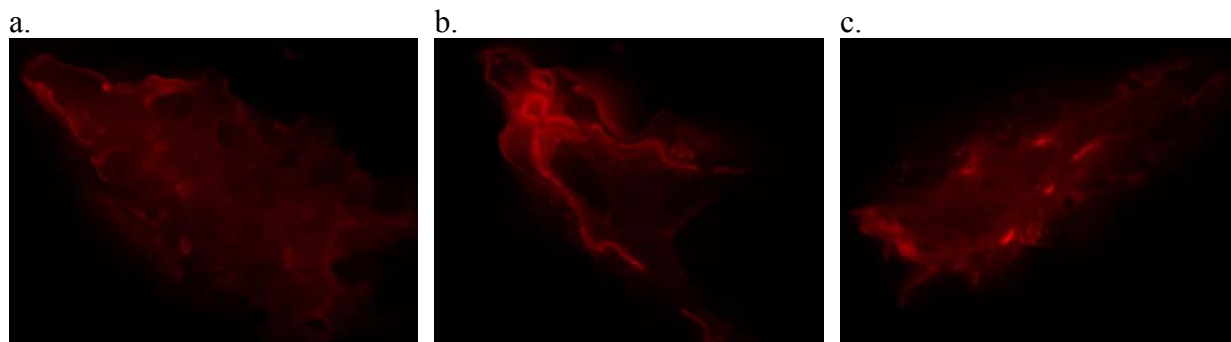


Fig. 4 : Sections de rayons de nageoires pectorales observées sous lumière UV. (a.) rayon non marqué, (b.) rayon présentant une marque continue (ligne jaune-vert fluorescente), (c.) rayon présentant une marque discontinue (îlots de fluorescence jaune-vert). (Photos A. Lochet)

Une fois encore, il convient de relativiser ces pourcentages de réussite au marquage. Les marques peuvent être continues ou discontinues (Fig. 4). En considérant uniquement les marques continues, la réussite « réelle » au marquage est moindre. Elle n'excède pas 67% pour les traitements les plus efficaces (ex. 200ppm – 24h) (Tab. 3).

Les tests réalisés sur de jeunes esturgeons sibériens marqués à un mois (poids < 1g) permettent de considérer l'alizarine red S comme un autre marqueur chimique pour les esturgeons européens. Ce protocole, appliqué à des esturgeons européens en bonne

condition et d'un âge plus avancé (2mois soit 1,5g par exemple), laisse présager une bonne survie des individus post-marquage. Cependant, nos tests révèlent aussi que la réussite « réelle » au marquage n'excède pas 67%.

1.4. Difficultés associées à nos méthodes de marquage

Malgré nos efforts pour optimiser le protocole de marquage des individus, la réussite « réelle » au marquage n'excède pas 70%, que ce soit avec la tétracycline ou l'alizarine. Bien que non négligeable, ce résultat n'est pas satisfaisant. Il ne faut pas oublier que cette efficacité « réelle » du marquage a été estimée à partir de rayons de nageoire pectorale prélevés seulement UN mois après marquage. Avec la croissance des individus et la diminution d'intensité des marques chimiques avec le temps, on peut s'attendre à ce que notre capacité à identifier des individus marqués soit beaucoup moins forte plusieurs mois voire plusieurs années après marquage. Cela pourrait expliquer pourquoi la réussite au marquage estimée SIX mois après marquage sur des esturgeons européens (cohortes 2007 et 2008) était de l'ordre de 50%.

La réussite au marquage est grandement affectée par la discontinuité de la marque observée sur plusieurs individus. Nous nous sommes alors interrogés sur la pertinence d'utiliser la nageoire pectorale comme structure de détection du marquage chimique. La nageoire pectorale est traditionnellement utilisée pour estimer l'âge sur des esturgeons (quelle que soit l'espèce) (Brennan and Cailliet, 1991; Rochard and Jatteau, 1991). Son prélèvement n'est pas létal et n'affecte pas le comportement de nage des poissons (Collins and Smith, 1996; Parsons et al., 2003). Cependant, aucune étude n'a démontré la fiabilité de cette structure pour rendre compte du marquage des individus.

Nous avons donc travaillé à partir des jeunes esturgeons sibériens présentés dans les sections précédentes. Nous avons comparé la qualité du marquage entre trois pièces calcifiées : les rayons de nageoires pectorales (les structures osseuses à tester), les otolithes (les pièces calcifiées de référence. Sachant que les otolithes sont métaboliquement inertes, un marqueur chimique doit être incorporé de façon permanente dans les otolithes) et les écussons dorsaux (pièces osseuses alternatives, souvent mentionnées dans les études d'estimation d'âge chez les esturgeons). Nous nous sommes focalisés sur cinq groupes d'individus : le groupe des témoins, les deux groupes marqués à la tétracycline (300ppm-8h et 600ppm-8h) et deux groupes marqués à l'alizarine (100ppm-12h et 200ppm-12h) (Tab. 4).

Tab. 4 : Efficacité de différents protocoles de marquage sur trois structures (les rayons de nageoires pectorales, les otolithes, les écussons dorsaux) chez de jeunes esturgeons sibériens. Les résultats présentés sont des % d'individus avec une marque continue. Entre parenthèses figure le pourcentage total d'individus marqués, quelle que soit la qualité de la marque.

Marqueur	Protocole	Rayons de nageoires pectorales	Otolithes	Écussons dorsaux
Témoin		0%	0%	0%
ARS	100ppm-12h	0% (7%)	100% (100%)	93% (93%)
ARS	200ppm-12h	47% (60%)	100% (100%)	100% (100%)
TC	300ppm-8h	27% (40%)	0% (0%)	94% (94%)
TC	600ppm-8h	66% (93%)	0% (0%)	100% (100%)

Avec l'alizarine, le pourcentage de nageoire pectorale présentant une marque continue est faible et très variable (de 0 à 47%). Au contraire, ce pourcentage est très fort pour les otolithes et les écussons dorsaux. Avec la tétracycline, le pourcentage de nageoire pectorale présentant une marque continue est également faible et variable (27 et 66%). Ce pourcentage est en revanche très fort (supérieur à 90%) pour les écussons dorsaux alors qu'il est égal à 0 pour les otolithes.

La présence de marques clairement visibles sur les otolithes et les écussons dorsaux montre que les individus ont bien incorporé les marqueurs chimiques et donc, que nos protocoles de marquage ont été efficaces. Le pourcentage faible et variable de marques continues sur les nageoires pectorales montre que la détection des marques sur les nageoires pectorales est difficile. Cette difficulté peut être liée à la forte auto-fluorescence des nageoires pectorales, qui rend moins beaucoup moins visible les marques chimiques.

L'absence de marquage à la tétracycline sur les otolithes d'esturgeons était un résultat surprenant. Cette absence de marquage n'est pas liée à un échec du protocole de baignation puisque les écussons et, dans une moindre mesure, les nageoires pectorales présentaient une marque. En revanche, cette absence de marquage peut s'expliquer par la structure particulière des otolithes d'esturgeons. Ils sont majoritairement composés de carbonate de calcium sous sa forme la moins stable (la « vaterite ») (Carlström, 1963) alors que, chez les Téléostéens, la forme majoritaire est l'« aragonite ». Il est donc fort possible que l'arrangement atypique du carbonate de calcium au sein des otolithes d'esturgeon ne soit pas favorable à la fixation des molécules de tétracycline.

De plus, la présence de marques discontinues n'a été observée que pour les nageoires pectorales. La présence de marques continues ou discontinues pourrait être le résultat de deux

situations ostéogéniques différentes. Les nageoires pectorales de jeunes individus en cours de croissance présentent des nombreuses « cavités » ou « canaux vasculaires » (Fig. 5), qui correspondent à des vides osseux et dont le rôle est d'apporter les métabolites nécessaires à la formation des tissus (Meunier 2002). Le marquage continu peut s'être formé alors que les processus d'ostéogénèse s'effectuaient sans discontinuité à la périphérie du rayon. En revanche, en cas de présence de canaux vasculaires à la périphérie du rayon, seules les surfaces en cours d'ostéogénèse ont pu incorporer le marqueur chimique conduisant ainsi à la formation de marques discontinues (F. Meunier, com.pers.).

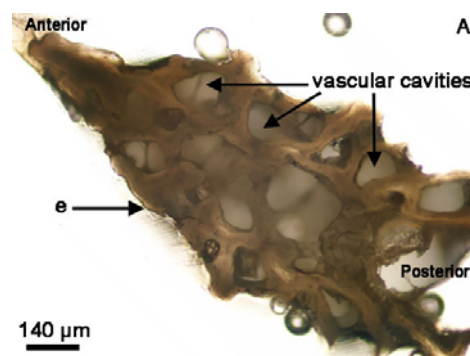


Fig. 5 : Morphologie d'un rayon de nageoire pectorale d'un esturgeon sibérien âgé de deux mois. Cette section présente de nombreuses cavités vasculaires, correspond à des vides osseux.

Toutefois, il reste à déterminer si ces discontinuités sont en lien ou non avec le fait que les individus étaient conservés en captivité.

Les protocoles de marquage testés sur les jeunes esturgeons sibériens ont été efficaces. Cependant, la détection de marques sur les nageoires pectorales n'est pas fiable. L'auto-fluorescence des nageoires et, très probablement, leur ontogénie rendent difficile la détection du marquage sur cette pièce osseuse.

2. Marquages de masse des esturgeons européens pratiqués en 2009.

2.1. Marquages tests des esturgeons européens avec de nouveaux marqueurs et de nouveaux protocoles.

Suite aux travaux de marquage menés sur l'esturgeon sibérien, nous avons testé un marquage à l'alizarine red S à 400ppm pendant 12h et un marquage à la tétracycline à 600ppm pendant 8h sur l'esturgeon européen.

Deux lots de 300 poissons âgés de 60 jours (poids moyen : 2,17g) ont été placés dans deux auges (Fig. 6). Les auges ont une surface de 0,77 m² (151 x 51). La hauteur d'eau avant marquage est montée à 15 cm afin d'avoir un volume suffisant pour maintenir une qualité d'eau correcte durant la baignade. Une pompe (Hydor Pico 400 II – 430 l/h) est placée derrière la grille d'évacuation, avec sortie en tête de bac, afin d'assurer le brassage de l'eau. Un apport d'oxygène pur est assuré par bullage quand la concentration est inférieure à 7 mg/l.



Fig. 6 : Auges pendant le marquage : Tétracycline 600ppm à gauche, Alizarine 400 ppm à droite

Le comportement de nage des jeunes esturgeons européens a varié en fonction du marqueur. A l'incorporation de l'alizarine, les poissons sont devenus très agités et nageaient en surface. Le phénomène s'atténuait mais recommençait à chaque nouvelle incorporation de solution mère. En revanche, pour la tétracycline, les poissons étaient plus actifs et sur le fond.

Au cours de la baignade, la coloration rouge foncée de la solution d'alizarine a rendu l'eau totalement opaque, empêchant d'observer le comportement des poissons. Des coups d'épuisette ont donc été réalisés à intervalles réguliers, de façon à vérifier si les poissons étaient toujours vivants et actifs. A la fin du marquage, 17% des individus étaient morts. La quasi-totalité des poissons survivants était sur le fond, nageant sur le côté ou ayant une nage

anormale. Seulement une vingtaine d'individus présentait un comportement de nage normal. Le lendemain du marquage, tous les poissons étaient morts.

Le marquage à la tétracycline s'est beaucoup mieux déroulé. La tétracycline ayant une coloration relativement claire par rapport à l'alizarine, le comportement des individus a pu être observé pendant toute la durée du marquage. A la fin de la balnéation, tous les individus présentaient un comportement de nage normal. Aucune mortalité post-marquage n'était à déplorer.

Contre toute attente, le marquage des jeunes esturgeons européens à l'alizarine red S (400ppm-12h) est un échec en termes de survie des individus. Le protocole de balnéation est à revoir. De plus, l'opacité de l'alizarine implique d'adapter la structure de marquage afin d'observer le comportement des poissons durant la balnéation (fond de verre, observation par-dessous...).

Au contraire, le marquage de jeunes esturgeons européens à la tétracycline (600ppm-8h) n'a entraîné aucune mortalité et aucune modification notable du comportement de nage. Ce protocole a donc été mis en œuvre pour les marquages de masse en 2009.

2.2. Marquage des esturgeons européens alevinés en 2009

En 2009, les jeunes esturgeons européens ont été marqués à la tétracycline à une concentration de 600ppm pendant 8 heures.

Les marquages de poissons issus de la reproduction réalisée en 2009 se sont déroulés du 10 septembre au 5 novembre de la même année. Au total, plus de 33 100 poissons ont été marqués au cours de 9 opérations (Tab. 5). La mortalité totale a été de 6 poissons. Durant les balnéations, le comportement des poissons n'a pas été altéré (comportement benthique, nage lente). Par contre, il semble que les poissons se soient moins alimentés durant les 2 ou 3 jours suivant le marquage. Par précaution, nous avons repoussé les lâchers de quelques jours pour certains lots, le temps pour ces poissons de reprendre une alimentation normale.

Tab. 5 : Récapitulatif des opérations de marquage 2009

Dates	Age	Nombre de poissons	poids moyen	densité ind/m ²	morts	Remarques
-------	-----	--------------------	-------------	----------------------------	-------	-----------

27-août	60	300	2,17	390	0	Test - OTC 600 ppm
	60	300	2,17	390	300	Test - Aliz 400 ppm
10-sept	74	1358	3,17	362	0	
11-sept	75	2621	5,13	699	0	
	75	2311	4,27	616	0	
15-sept	79	1801	3,74	480	0	
	79	2064	6,01	550	0	
	79	2339	3,65	624	0	
18-sept	82	1936	4,53	516		
		2135	4,47	569	1	
		2205	4,27	588		
22-sept	86	1330	3,08	355		
		1128	3,06	301	2	
		1227	3,2	327	1	
25-sept	89	1427	3,47	381	1	
		1587	4,09	423	1	
29-sept	93	1378	6,85	439		
		1508	5,83	402		
		1659	3,71	528		
		1075	3,86	287		
02-oct	96	340	11,04	91		
		340	10,09	91		
		623	5,02	166		
		94	6,44	54		
		74	10,46	42		
05-nov	130	50	14,17	29		double marquage - âge 60 et 130 jours

Perspectives pour les marquages de masse à venir

- La mise au point d'une méthode marquage à l'alizarine red S nécessite une saison de mise au point des meilleurs paramètres de balnéation pour l'esturgeon européen. Le pourcentage de poissons marqués et la qualité de la marque devront être estimés.
- Les expérimentations menées en 2009 ont montré que la nageoire pectorale n'est pas une structure fiable pour détecter les marques chimiques sur des individus marqués très jeunes (à 1 mois). Cela limite considérablement notre capacité à identifier les individus issus d'alevinage. Nous pourrions envisager d'utiliser une autre pièce osseuse mais, le problème du choix d'une telle pièce reste entier. La détection de la marque est fiable sur les écussons dorsaux mais son utilisation est

délicate. A l'heure actuelle, nous ignorons si le prélèvement d'un écusson (ou d'un fragment d'écusson) affecte la survie des individus.

- A la lumière de ces résultats, une solution radicalement différente est envisagée : l'outil génétique. La mise au point d'une méthode permettant la réattribution de parenté à partir des caractéristiques de certains marqueurs chez les parents, sera réalisée en 2010.

Références

- Brennan, J.S.; Cailliet, G.M., 1991. Age determination and validation studies of white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, in California. In: Actes du premier colloque international sur l'esturgeon. P. Williot (Ed), Cemagref, Bordeaux, pp. 209-234.
- Carlström, D., 1963: A crystallographic study of vertebrate otoliths. Biol. Bull. **125**(3): 441-463.
- Caudron, A.; Champigneulle, A., 2009: Multiple marking of otoliths of brown trout, *Salmo trutta* L., with alizarin redS to compare efficiency of stocking of three early life stages. Fisheries Manag. Ecol. **16**: 219-224.
- Champigneulle, A.; Cachera, S., 2003: Evaluation of large-scale stocking of early stages of brown trout, *Salmo trutta*, to angler catches in the French-Swiss part of the River Doubs. Fisheries Manag. Ecol. **10**: 79-85.
- Collins, M.R.; Smith, T.I.J., 1996: Sturgeon fin ray removal is nondeleterious. N. Am. J. Fish. Man. **16**(4): 939-941.
- Frenkel, V.; Kindschi, G.; Zohar, Y., 2002: Noninvasive, mass marking of fish by immersion in calcein: evaluation of fish size and ultrasound exposure on mark endurance. Aquaculture **214**: 169-183.
- Lochet, A.; Jatteau, P.; Gessner, J., Soumis: Detection of chemical marks for stocking purposes in sturgeon species. J. appl. Ichthyol.
- Lochet, A.; Lambert, P.; Lepage, M.; Rochard, E., 2004: Croissance de juvéniles d'esturgeons européens *Acipenser sturio* (Acipenseridae) sauvages et issus d'alevinage, durant leur séjour dans l'estuaire de la Gironde (France). Cybium **28 suppl.**(1): 91-98.
- Lorson, R.D.; Mudrak, V.A., 1987: Use of tetracycline to mark otoliths of American shad fry. N. Am. J. Fish. Man. **7**: 453-455.
- Olney, J.E.; Hopler, D.A.; Gunter, T.P.; Maki, K.L.; Hoenig, J.M., 2003: Signs of recovery of American Shad in the James River, Virginia. Am. Fish. Soc. Symp. **35**: 323-329.
- Parsons, G.R.; Hoover, J.J.; Killgore, K.J., 2003: Effect of pectoral fin ray removal on station-holding ability of shovelnose sturgeon. N. Am. J. Fish. Man. **23**: 742-747.
- Rochard, E.; Jatteau, P., 1991. Amélioration de la méthode de détermination de l'âge de l'esturgeon commun *Acipenser sturio* et premières applications. In: Actes du premier colloque international sur l'esturgeon. P. Williot (Ed), Cemagref, Bordeaux, pp. 193-208.
- Secor, H.; White, M.G.; Dean, J.M., 1991: Immersion marking of larval and juvenile hatchery produced striped-bass with oxytetracycline. Trans. Am. Fish. Soc. **120**: 261-266.

[Le bas de la 4 de couverture pour les documents papier, dernière page pour les documents électroniques]

Onema
Hall C – Le Nadar
5 square Félix Nadar
94300 Vincennes
01 45 14 36 00
www.onema.fr

Cemagref
Parc de Tourvoie
BP 44,
92163 Antony cedex
01 40 96 61 21
www.cemagref.fr