



HAL
open science

Caractérisation génétique de l'esturgeon européen et assignation parentale : implications pour le Plan National d'Actions : chapitre VIII

Séverine Roques, Patrick Berrebi, Marie-Laure Acolas, Philippe Jatteau

► To cite this version:

Séverine Roques, Patrick Berrebi, Marie-Laure Acolas, Philippe Jatteau. Caractérisation génétique de l'esturgeon européen et assignation parentale : implications pour le Plan National d'Actions : chapitre VIII. Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* : bilan scientifique et technique 2014, 2015, pp.99-118. hal-02601452

HAL Id: hal-02601452

<https://hal.inrae.fr/hal-02601452>

Submitted on 16 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.

Chapitre VIII : Caractérisation génétique de l'esturgeon européen et assignation parentale : implications pour le Plan National d'Actions

Roques S.¹, Berrebi P.², Acolas M.L.¹

¹Irstea, unité EABX, Bordeaux

²ISEM, "Institut des Sciences de l'Evolution", Equipe "Evolution des Poissons", Montpellier

VIII.1 Introduction

L'esturgeon européen (*Acipenser sturio*) était une espèce commune dans toute l'Europe mais toutes ses populations sont maintenant éteintes sauf celle qui survit dans le bassin Gironde-Garonne-Dordogne en France. La population de Gironde est elle-même au bord de l'extinction. La population sauvage qui subsiste aujourd'hui repose donc sur les individus nés des deux dernières reproductions naturelles connues (très certainement 1988 et 1994) (Lochet et al. 2004) et des cohortes issues de reproductions artificielles réalisées à la station d'expérimentation Irstea de St Seurin sur l'Isle (en 1995, 2007-2009 et 2011-2013). Au sein du stock captif, en 2007, l'effectif de géniteurs s'élevait à 79 esturgeons, dont 41 issus de reproductions en fleuve et 38 issus de la reproduction artificielle de 1995. Actuellement le stock de géniteurs (*i.e.* individus en âge de se reproduire), s'élève à 37 individus dont 7 individus issus des reproductions artificielles de 1995.

Dans le cadre du programme de restauration de l'espèce, un grand nombre de larves et de juvéniles issus de ces reproductions artificielles ont été lâchés en milieu naturel dans la Garonne et la Dordogne. Dans le but d'estimer les taux de survie de ces individus, ces plans de repeuplement ont été construits de façon à ce que, dans la majorité des cas, un stade ou un fleuve corresponde à un croisement unique. Afin d'évaluer l'efficacité des repeuplements et de comprendre le fonctionnement de cette population soutenue, un monitoring a été mis en place à partir de 2009 (Acolas et al. 2011, cf Chap. VII). Il s'agit d'échantillonner la fraction estuarienne de la population afin de recapter les individus lâchés et d'estimer notamment les taux de survie en fonction des cohortes, des stades et des sites de lâcher grâce aux estimations d'abondance et à la détermination des croisements dont ils sont issus (assignation parentale génétique). Le choix des marqueurs génétiques pour cette étude s'est porté sur les microsatellites pour leur polymorphisme élevé, leur relative facilité de mise en œuvre et l'hérédité biparentale (Liu and Cordes 2004). Le fait que tous les croisements de géniteurs réalisés en captivité soient connus avec précision devrait faciliter l'assignation parentale des jeunes esturgeons recapturés dans le milieu naturel.

Chez l'esturgeon européen, les travaux en génétique ont porté essentiellement sur la répartition géographique de l'espèce en Europe d'un point de vue historique (Chassaing et al. 2013; Chassaing et al. 2011; Ludwig et al. 2002; Pagès et al. 2008; Tiedemann et al. 2007). Une caractéristique importante du modèle *A. sturio* est que la diversité génétique de l'espèce est actuellement extrêmement faible (population relictuelle), aussi bien au niveau de l'ADN mitochondrial que nucléaire. Ludwig et al. (2004) suggèrent que la dernière cohorte en milieu naturel (1994) proviendrait d'un seul couple de géniteurs. Les estimations de Chassaing et al. (2013), indiquent par ailleurs que la population de Gironde aurait actuellement, un coefficient de consanguinité proche de 10%. Il est très probable que la

majeure partie des esturgeons reproducteurs captifs à St Seurin soient des frères et sœurs. Un travail préliminaire (Berrebi and Cherbonnel 2011) portant sur 74 géniteurs et 10 juvéniles a montré qu'avec seulement 14 locus microsatellites, chaque individu avait un génotype unique. Pourtant, les marqueurs développés dans le cadre de cette étude n'étaient pas suffisamment informatifs pour réaliser une assignation parentale fiable de la descendance, certainement comme conséquence de cette diversité génétique réduite.

Pour pouvoir orienter au mieux les programmes d'élevage et de repeuplement de l'espèce, cette étude a pour but (i) de mettre au point une méthodologie d'assignation fiable pour estimer la survie des juvéniles déversés en fonction de leurs parents, (ii) de caractériser la variabilité génétique du stock captif pour suivre et contrôler les effets génétiques associés aux faibles effectifs (Par ex. consanguinité, perte de diversité) et pouvoir orienter les décisions des croisements génétiquement les plus efficaces.

Les objectifs de l'étude sont les suivants :

1. Chez *A. sturio*, tester, sélectionner et optimiser un set de marqueurs génétiques (*microsatellites*) parmi ceux disponibles chez d'autres espèces d'esturgeons (puisque il n'existe à ce jour aucun marqueur spécifique)
2. Caractériser génétiquement l'ensemble des géniteurs du stock captif et estimer les indices de diversité. Dans le but de maintenir autant que possible la diversité génétique du stock, le coefficient de parenté entre les géniteurs sera évalué pour orienter les croisements futurs et évaluer la qualité des croisements antérieurs
3. D'après les caractéristiques des marqueurs et la diversité de l'espèce, sélectionner un set de *microsatellites* ayant un pouvoir de résolution suffisant pour l'assignation de parenté.
4. Mettre au point et valider la méthodologie d'assignation en analysant des groupes familiaux (descendants et parents) pour lesquels les liens de parenté sont connus.
5. Faire une première évaluation de la méthode sur des individus issus du repeuplement et capturés dans la fraction estuarienne de la population. Ces résultats pourront nous indiquer également si certaines captures seraient issues de reproductions dans le milieu naturel.

VIII.2. Matériels et Méthodes

VIII.2.1 Sélection des marqueurs microsatellites, séquençage automatique et optimisation des réactions en Multiplex (MPLX)

Pour la première phase de test, un groupe de 28 individus a été sélectionné pour représenter à la fois des individus du milieu naturel et du stock captif. L'ADN a été extrait par la méthode CHELEX (Walsh et al. 1991) à partir d'un morceau de nageoire (1-2 mm²) conservée dans l'éthanol. Etant donné l'absence de marqueurs microsatellites spécifiques de l'esturgeon européen, nous avons testé une série de 118 marqueurs d'espèces proches (**Annexe 1**). Les conditions pour les amplifications PCR (Réaction en Chaîne de la Polymérase) (118 X 28= 3304 réactions) ont été standardisées pour l'ensemble des marqueurs (**Encart 1**).

Encart 1 : Conditions d'amplification PCR

PCR : 25 µl de réaction contenant 12.5 pmol d'amorçes, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM chaque dNTP (nucléotide), et 0.5 unités de Taq DNA polymérase. **Profil thermique** : 95°C durant 5 min, suivi de 34 cycles de dénaturation à 95°C pendant 40 s, d'hybridation à 54°C pendant 40 s, et une étape d'élongation à 72°C pendant 40s, pour terminer par une élongation finale à 72°C pendant 10 min.

dNTP: mélange des quatre désoxyribonucléotides ;Taq DNA polymérase: *Thermus aquaticus*, enzyme utilisée pour la duplication de l'ADN dans la réaction de PCR

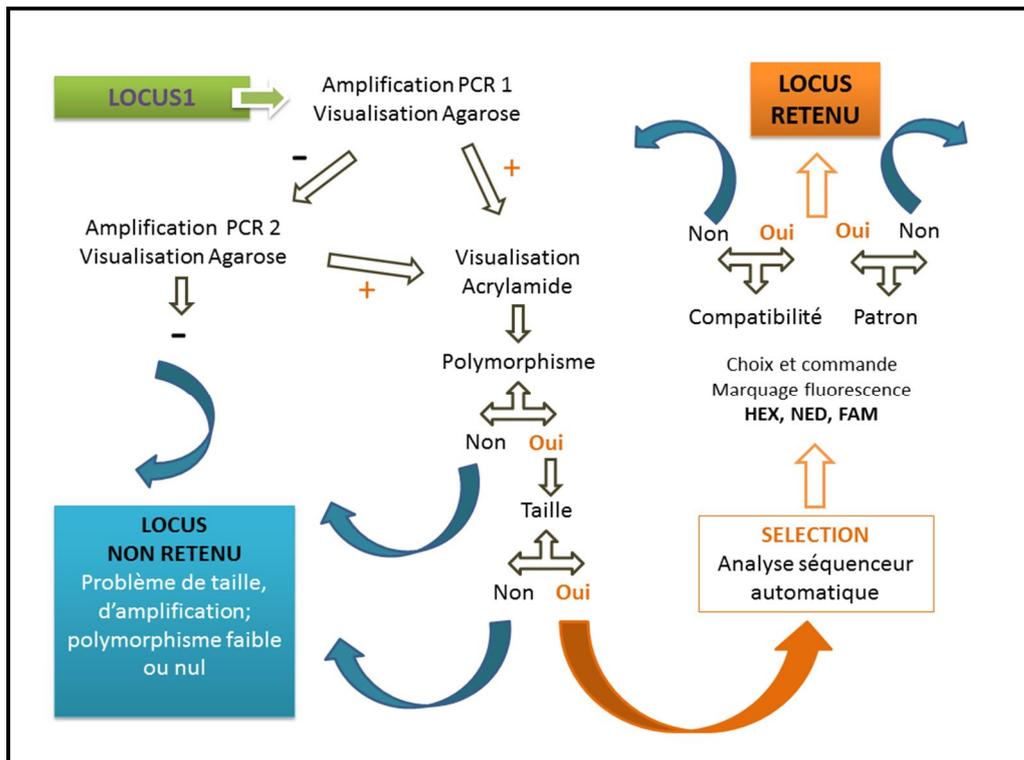
Chaque marqueur microsatellite a été testé selon la stratégie résumée dans l'**Encart 2**. En résumé, les amplifications ont été vérifiées sur gel d'agarose. Pour celles qui étaient positives, elles ont également été visualisées sur gel d'acrylamide, ces derniers permettant d'évaluer des caractéristiques additionnelles et importantes des marqueurs (Ex. polymorphisme et taille approximative). A la suite de ces deux premiers tests, une première sélection nous a permis de conserver un set de 34 marqueurs: AG10, AG47, AG38, AOXD161, AFU68, AOXD64, AOX32, AOXD165, AN20, AG14, AOXC55, AOX45, AOXD44, AOXD188, AG20, SPL106, Afug184, AG39, AOXD297, SPL101, AOX27, AFU19, AFU54, AG16, AOX23, AOXD54, AOX34, AG28, ACIG198, AS002, AOXD241, AFUG113, AOXD234, AG28.

Les réactions d'amplification par PCR des 34 marqueurs (34 x 40 individus= 1360 réactions) ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, mais les produits d'amplification ont été analysés sur un Séquenceur automatique. Cette méthode, fondée sur le marquage des produits PCR à la fluorescence avec 3 couleurs différentes nommées HEX (vert), FAM (bleu), et NED (noir) nous permet une analyse plus fine du polymorphisme en déterminant le nombre précis d'allèles (ou variants) et leur taille exacte pour chacun des marqueurs (logiciel GeneMapper v. 4.0; Applied Biosystems). Chaque marqueur ayant une couleur et une taille différente, les réactions PCR peuvent être réalisées en Multiplex (MLPX) ce qui permet l'amplification de plusieurs marqueurs simultanément, ce qui diminue le nombre de réactions et donc le coût et la durée des analyses. Pour cela, nous avons utilisé le kit "Type-it microsatellite kit" de QIAGEN.

Pour la sélection du set final de 18 marqueurs, nous avons tenu compte de leur variabilité, du succès d'amplification (Ex. proportion d'amplifications positives, répétabilité, rendement), de leur compatibilité dans les réactions en Multiplex (MLPX) et du patron de

lecture (Ex. fiable ou complexe). Nous avons éliminé par exemple 5 marqueurs pour leur variabilité trop basse dans la population (AOX23, AOXD54, ACIG198, ASOO2) et 4 pour leur appartenance à un locus probablement dupliqué (avec plus de deux allèles par individu: AOXB34, AG28, AOXD241, AFUG113).

Encart 2 : Méthodologie de mise au point des marqueurs microsatellites



VIII.2.2 Mise au point de la méthodologie d'assignation parentale

L'assignation parentale consiste à identifier les parents d'un individu à partir de son génotype (c.a.d le profil génétique individuel obtenu par la caractérisation d'un set de marqueurs). Elle requiert le choix d'un set de marqueurs d'une grande fiabilité, et le choix du logiciel le plus adapté à notre modèle.

Pour le choix des marqueurs les plus performants, les indices de variabilité génétique (le nombre d'allèles moyen par locus, l'hétérozygotie attendue (H_{exp}) et observée (H_{obs}) : (logiciel GENETIX, Belkhir et al. 2004) et leur pouvoir de résolution ont été calculé pour chacun d'eux. Pour estimer le pouvoir de résolution, nous avons utilisée deux mesures différentes. Tout d'abord, le pouvoir de discrimination (PIC) qui exprime la probabilité que deux individus pris au hasard puissent être « discriminés » parce qu'ils possèdent une combinaison d'allèles différente pour ce(s) marqueur(s) génétique(s). Plus ce pouvoir est proche de 100%, plus le marqueur sera informatif. La probabilité d'identité (PID) par ailleurs, est la probabilité que deux individus pris au hasard dans la population possèdent le même génotype (à deux allèles) pour le marqueur génétique analysé. Elle dépend aussi de la rareté du génotype trouvé. Le nombre de marqueurs nécessaires pour obtenir une PID faible sera d'autant plus élevé que les génotypes à analyser seront proches. Le PIC et la PID ont été calculées grâce aux programmes CERVUS (Kalinowski et al. 2007) et GIMLET v. 1.3.3 (Valière et al. 2007). Le programme GIMLET nous permet également d'estimer la PID de notre set de

marqueurs, par des simulations de descendance dans la situation où ils sont tous non apparentés (*PID biased*) ou au contraire, dans laquelle la probabilité de consanguinité est élevée (*PID sibs*) et qui représente le scénario plus probable pour notre espèce.

Une fois choisi, le set de 18 marqueurs a été amplifié en trois réactions Multiplex (**Encart 3**) sur 73 échantillons, comprenant des larves et des juvéniles captifs de la station de St Seurin dont les parents étaient connus. Cela nous permettait d'une part de valider la méthodologie d'assignation, puisque l'identité des parents est connue, et d'autre part d'estimer le taux d'erreurs qui lui est associé.

Encart 3 : Réactions Multiplex. Marquage à la fluorescence (FLUO), NOM et TAILLE des produits d'amplifications

	MPLX1						
FLUO	FAM	FAM	HEX	HEX	HEX	NED	NED
NOM	AOXD165	AG10	AOXD44	AG47	AOXD234	AG47	AOXD32
TAILLE	174-190	227-287	144-160	110-122	197-217	110-122	156-204
	MPLX2	MPLX2	MPLX2	MPLX2	MPLX2		
FLUO	FAM	FAM	HEX	HEX	NED		
NOM	AG14	AOXD188	AOXD161	AOXD64	AOXC55		
TAILLE	188-204	244-252	157-173	198-222	117-141		
	MPLX3	MPLX3	MPLX3	MPLX3	MPLX3	MPLX3	
FLUO	FAM	FAM	HEX	HEX	HEX	NED	
NOM	AG38	SPL106	AG39	AFU68	AN20	AG28	
TAILLE	190-202	227-235	121-125	142-168	186-214	152-172	

Pour les assignations, nous avons testé trois programmes différents, CERVUS (Kalinowski et al. 2007), PAPA (Duchesne et al. 2002) et PASOS (Duchesne et al. 2005), qui sont les plus largement utilisés pour ce genre d'analyses, et dont nous décrivons ci-dessous les caractéristiques principales (**Encart 4**). Les résultats seront comparés pour déterminer quel est le plus performant et le plus approprié pour notre modèle biologique. La méthodologie a été également évaluée chez 195 esturgeons capturés dans la fraction estuarienne de la population et pour lesquels nous voulions tester la paternité.

Encart 4 : Logiciels d'assignation CERVUS, PAPA et PASOS

CERVUS : Avant de réaliser l'assignation directe des individus (OBS), le programme CERVUS estime le pouvoir d'assignation des marqueurs sur 10000 individus virtuels issus de simulations (EXP). L'avantage des simulations est qu'elles permettent d'évaluer la faisabilité des analyses pour un nombre donné de marqueurs. Egalement, elle permet de définir un critère de confiance, lorsque les assignations d'individus réels sont réalisées. Elle est fondée sur la fréquence allélique et sur le nombre de parents potentiels à tester pour chaque descendant. Pour la simulation, nous avons établi certains critères qui caractérisent notre modèle « esturgeon »: le nombre de parents potentiels (nous avons indiqué 20 mâles et de 20 femelles, qui se rapprochent du sexe-ratio réel des géniteurs du stock captif), la proportion de géniteurs échantillonnée (99%), la proportion de locus génotypée (95%), la proportion de locus sans résultat interprétable (1%), le taux d'erreur dans les calculs de maximum de vraisemblance (1%), et enfin le nombre minimum de locus génotypés (N=14). Comme nous savons que la population d'esturgeon présente une forte consanguinité, nous avons également établi un coefficient de de 0.075 entre les géniteurs, qui correspond à la moyenne du coefficient de parenté R (Queller and Goodnight 1989 ; logiciel GENALEX) entre les géniteurs captifs issus du milieu naturel). Le programme permet de tester un ensemble de parents potentiels pour un grand nombre de descendants. Les parents les plus probables de chaque descendant lui sont alors assignés selon un critère strict (95% fiabilité) ou plus flexible (80%). Le programme donne également le pourcentage d'individus qui ne peut être assigné selon ces deux critères, qui correspond à de possibles erreurs ou au fait que les parents ne figurent pas parmi la liste de géniteurs analysés (et donc potentiellement du milieu naturel).

PASOS (Parental Allocation of Single in Open Systems) et PAPA (Package for the Analysis of Parental Allocation): Ces deux programmes permettent d'identifier les parents potentiels d'un descendant fondé sur son génotype, en calculant la probabilité de chaque paire de parents potentiels. Le descendant est assigné à la paire de parents ayant la plus grande probabilité. La procédure d'assignation tient également compte des erreurs de transmission (dues à des erreurs de génotypage ou des mutations) et propose plusieurs modèles d'erreur. Nous avons exploré les résultats avec le modèle « sans erreur » et le modèle à « 1 offset » (c.à.d. 98% de lecture correcte et 1% d'erreur vers les allèles les plus proches d'un pas de mutation). Alors que PAPA nécessite que l'ensemble des parents soient génotypés, PASOS permet qu'une certaine proportion de « parents potentiels » soit inconnue.

VIII.2.3 Caractérisation de la diversité génétique de l'esturgeon européen, démographie et coefficients de parenté

Dans le but de caractériser la variabilité génétique de l'esturgeon européen, nous avons analysé l'ensemble des géniteurs du stock captif issus du milieu naturel (n=41 ; *St SEUR*

milieu naturel), ainsi que 34 individus de la cohorte de 1995 issus de la première reproduction assistée (*St SEUR captivité*) (**Annexe 2**). Les analyses statistiques visant à déterminer l'ampleur et la structure de cette variabilité ont été réalisées selon deux méthodologies :

1) L'analyse en composante principale (ACP) (Logiciel GENALEX, Peakall and Smouse 2012), est une approche à la fois géométrique (elle représente l'ensemble des individus en fonction de la distance génétique qui les sépare) et statistique (selon plusieurs axes qui expliquent au mieux la variabilité). Selon les différents axes, on peut apprécier visuellement la répartition (information sur la structure) et la proximité (information sur la parenté génétique) des individus.

2) L'analyse de structure (logiciel STRUCTURE), détermine le meilleur découpage en sous-groupes génétiques (k) d'un groupe d'individus donné. Les sous-groupes sont formés de telle manière qu'ils représentent le mieux une population en équilibre (c.à.d. homogène génétiquement, ainsi qu'avec un minimum de déséquilibre de liaison entre les loci). Nous avons utilisé les paramètres *50 000 burnin*, *100 000 iterations* et *pas d'admixture* pour les calculs. Pour plus de fiabilité et comme conseillé pour ce type de statistiques (Evanno et al. 2005), nous avons répété l'analyse 20 fois et déterminé le nombre de sous-groupes (K) le plus probable grâce au programme STRUCTURE HARVESTER (Earl and VonHoldt 2011). Pour chaque individu, les résultats correspondent à sa probabilité (Q en fréquence) d'appartenir à tel ou tel groupe défini par le programme.

Le « goulot d'étranglement » dans une population (aussi appelé « goulot d'étranglement génétique ») est un phénomène fréquent chez les espèces ayant subi un fort déclin démographique et correspond au fait qu'une proportion substantielle de la population d'une espèce disparaît. L'une des conséquences est une diminution notable de la diversité génétique. Nous avons calculé les indices de diversité génétique (hétérozygotie observée et attendue, le nombre d'allèles moyen par locus, la richesse allélique) et exploré la possible « empreinte génétique » laissée par le passé démographique de l'espèce. Durant un « goulot d'étranglement », la diversité génétique observée est supérieure (un excès d'hétérozygotie) à celle attendue sous l'équilibre de mutation/dérive. Pour tester cette hypothèse chez l'esturgeon européen, nous avons réalisé un test de significativité (Test de Wilcoxon) en utilisant le logiciel BOTTLENECK (Piry et al. 1999) sur les données d'esturgeons captifs issus du milieu naturel. Comme ce goulot d'étranglement entraîne aussi en général une forte consanguinité dans la population en réduisant le nombre possible de partenaires et en augmentant les croisements entre individus apparentés, nous avons calculé le paramètre Fis de Wright, dénommé aussi indice de fixation et appelé auparavant coefficient de consanguinité (Wright 1969) calculé par le logiciel GENETIX, ainsi que le degré de parenté entre l'ensemble des géniteurs du stock captif estimé par le coefficient R de Queller and Goodnight (Queller and Goodnight 1989 ; logiciel GENALEX). Le coefficient de parenté R correspond à la similarité génotypique des marqueurs microsatellites entre une paire d'individus, en comparaison à une valeur attendue entre deux individus pris au hasard dans la population (Queller and Goodnight 1989). Des valeurs négatives indiquent que le degré de parenté entre les deux individus testés est moindre que celui de la moyenne de la population, et est en général un indicateur d'exogamie (individus appartenant à des groupes éloignés).

VIII.3 Résultats

VIII.3.1 Sélection du set de marqueurs et pouvoir de résolution

Il a été observé chez les esturgeons que le "crosspriming", c'est à dire la possibilité d'utiliser un marqueur mis au point sur une espèce autre, était en général très élevé. L'amplification de 118 marqueurs microsatellites non spécifiques démontre effectivement un taux d'amplification élevé (76.5 %) chez *A. sturio*. Plus d'un quart des marqueurs étaient polymorphes (28 %) (**Figure 58**). Par ailleurs, le taux de succès le plus important est observé en utilisant les amorces d'*Acipenser oxyrinchus* qui est le plus proche parent de l'esturgeon européen, mais nous avons également observé que les amorces d'espèces plus éloignées (Par ex. *A. gueldenstaedtii*) ont donné de bons résultats.

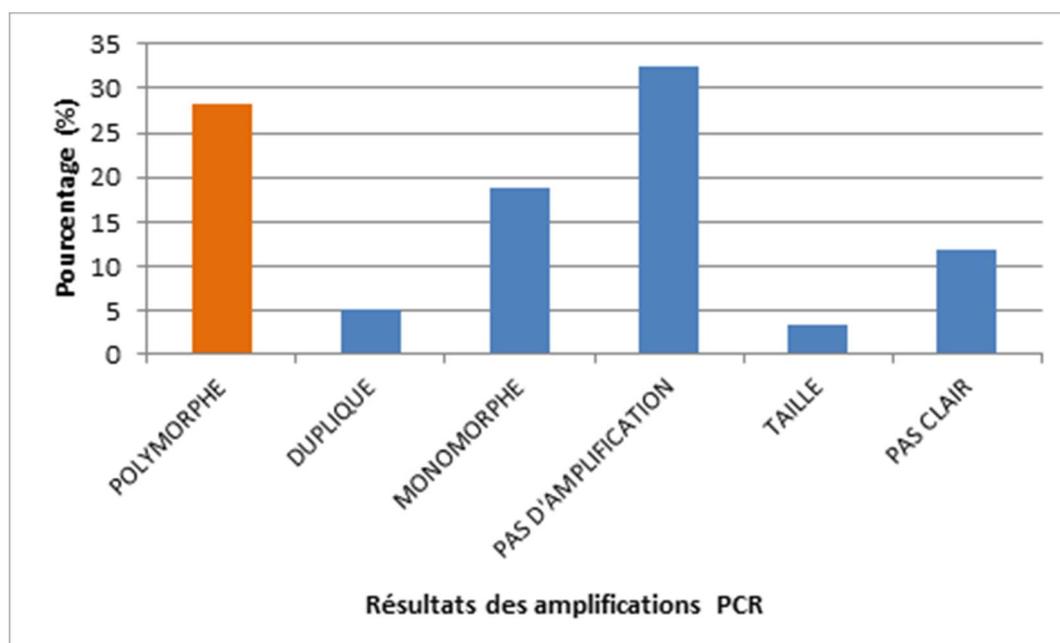


Figure 58: Résultats (en pourcentage) des tests d'amplifications sur 118 microsatellites testés (voir Encart 2). En orange, les marqueurs polymorphes (*variables*) qui ont été conservés. En bleu, ceux qui ont été éliminés de la sélection (Dupliqué : deux copies du même locus c'est-à-dire plus de deux allèles observés/marqueur/par individu ; Monomorphe : un seul variant observé sur l'ensemble de la population; Pas d'amplification: absence de produit PCR et ce même après plusieurs tests réalisés avec des conditions différentes ; Taille : Taille du produit d'amplification trop petite (< 100) ou trop grande (>450) pour notre méthode de détection; Pas clair : produits non spécifiques, pics parasites (« stutters »).

Nous avons finalement sélectionné un set de 18 marqueurs pour les analyses (**Tableau 36**). Les résultats nous indiquent un pouvoir de résolution très élevé de notre set de marqueurs, avec une *PID unrel* et *PID sib* de 5.03×10^{-12} et 1.02×10^{-5} respectivement. Le fait d'obtenir des valeurs de PID selon l'ordre croissant des marqueurs (dans ce cas, du plus informatif au moins informatif, **Tableau 36**) nous permet de pouvoir choisir le nombre minimum de marqueurs nécessaires pour répondre à un objectif donné. Par exemple, étant donné qu'une valeur *PID* de 1×10^{-3} est estimé optimum pour pouvoir différencier deux individus, on

s'aperçoit que seulement 3-4 marqueurs seraient suffisants pour identifier deux individus non apparentés (PID unrel) alors que 8 ou 9 marqueurs seraient nécessaires pour différencier deux individus beaucoup plus proches (frères-sœurs).

Les résultats confirment également que le pouvoir d'identification d'un marqueur est proportionnel à son degré de polymorphisme. Nous observons que les marqueurs possédant le plus d'allèles et la plus grande hétérozygotie sont ceux qui se classent dans le haut du Tableau (**Tableau 36**), et donc avec le plus fort potentiel d'identification. La probabilité de discrimination pour le premier marqueur AG10 est très élevée (77%), si on la compare à ceux en bas de la liste, dont le pouvoir se situe autour de 40%. Par ailleurs, la variabilité génétique estimée avec ces 18 marqueurs reste faible, avec une hétérozygotie observée moyenne (Hobs=0.56), et avec un nombre moyen d'allèles par locus très bas (Nall=4) pour les 53 individus analysés.

Tableau 36. Set des 18 marqueurs microsatellites sélectionnés, classés par ordre décroissant (du plus au moins performant, selon le logiciel GIMLET). Le seuil de PID de 1×10^{-3} , suffisamment fiable pour différencier deux individus non apparentés est atteint avec les 3-4 premiers marqueurs (PID unrel, 1,62E-03, 3,31E-04) et pour 8-9 marqueurs dans le cas opposé où ils seraient frères ou sœurs (PID sibs, 1,52E-03-7,47E-04).

Name	Hobs	Hexp	Nall	PIC	PID unrel	PID sibs
AG10	0,74	0,83	7	0,772	1,01E-01	4,05E-01
AG14	0,71	0,86	5	0,633	1,26E-02	1,73E-01
AOXD165	0,71	0,81	4	0,689	1,62E-03	7,43E-02
AOXD32	0,69	0,74	4	0,631	2,31E-04	3,26E-02
AOXD161	0,70	0,83	5	0,671	3,31E-05	1,44E-02
AOXC55	0,67	0,79	4	0,597	5,71E-06	6,62E-03
AOX45	0,65	0,65	4	0,535	1,05E-06	3,14E-03
AOXD44	0,64	0,72	3	0,525	2,12E-07	1,52E-03
AOXD188	0,62	0,62	3	0,464	4,55E-08	7,47E-04
AOXD234	0,58	0,60	4	0,519	1,20E-08	3,95E-04
AG38	0,53	0,63	5	0,483	1,04E-09	2,22E-04
AG47	0,49	0,62	6	0,530	3,43E-09	1,28E-04
SPL106	0,47	0,53	3	0,391	3,84E-10	7,81E-05
AG39	0,45	0,60	2	0,366	5,95E-11	4,89E-05
AFU68	0,41	0,45	4	0,480	1,49E-10	3,15E-05
AG28	0,36	0,36	5	0,467	2,46E-11	2,13E-05
AN20	0,37	0,44	5	0,400	1,09E-11	1,45E-05
AOXD64	0,33	0,38	4	0,425	5,03E-12	1,02E-05
Overall	0,56	0,64	4	0,532	5,03E-12	1,02E-05

VIII.3.2 Assignment de parenté : évaluation préliminaire

Nous constatons que les assignments des 73 échantillons de parents connus ont été réalisées avec grand succès en utilisant les programmes PASOS et CERVUS, le programme PAPA étant le moins performant (**Figure 59**). Le pourcentage le plus élevé est obtenu avec 17 des 18 marqueurs sélectionnés (94.4 % d'assignment). La proportion d'individus non

assignée est donc relativement basse (5.6 %), si l'on considère les inévitables erreurs (échantillonnage, génotypage, étiquetage...etc.) associées à ce type d'analyse. Par ailleurs, les résultats pour les individus capturés dans l'estuaire sont également élevés, et plus élevés avec le programme CERVUS (93.5%) qu'avec PASOS (88.2%). Ce fort taux d'assignations indique que l'ensemble des parents des juvéniles recapturés est issu du stock captif. De plus, la majorité des résultats coïncide pour ces trois programmes d'assignation, ce qui confirme la fiabilité de nos résultats, puisque ils utilisent des algorithmes nettement différents.

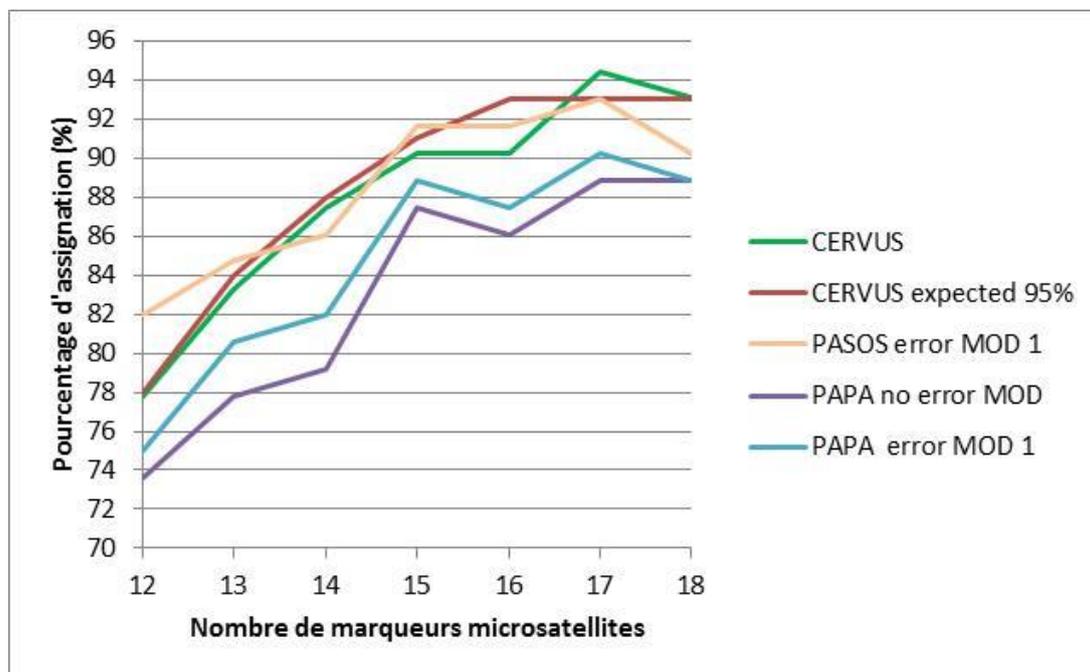


Figure 59: Résultats d'assignation (en pourcentage) de n=73 esturgeons de parents connus

VIII.3.3 Diversité génétique de l'esturgeon européen, démographie et liens de parenté

Sur la **Figure 60A**, l'analyse de la structuration de la variabilité génétique du stock captif nous indique l'existence de deux groupes, correspondant aux esturgeons issus du milieu naturel (stock captif sauvage en *beige*) et ceux appartenant à la cohorte de 1995 (née en captivité, en *rouge*). Le taux d'assignation à ces deux groupes est pratiquement de 100%. Dans le but d'examiner plus en détail la diversité dans chacun de ces deux groupes, nous avons réitéré les analyses séparément pour chacun d'entre eux. Nous avons obtenu à nouveau un unique groupe pour la cohorte de 1995 (en *rouge*) alors que le groupe *beige* est structuré en trois groupes distincts (*vert*, *violet* et *bleu*) (**Figure 60B**). Ces résultats illustrent clairement l'homogénéité génétique de la cohorte de 1995 (tous frères et sœurs, puisque ils sont issus d'un même couple de géniteurs) et mettent en évidence la subdivision de la variabilité génétique du stock captif sauvage en trois groupes. On observe également sur la Figure 3B, un individu (Emeline) assigné à deux groupes différents, indiquant qu'il est issu de parents ayant appartenus à 2 familles génétiques différentes.

L'analyse en composante principale (ACP) obtenue à partir des distances génétiques entre les géniteurs du stock captif coïncide avec les résultats précédents. Nous observons sur la

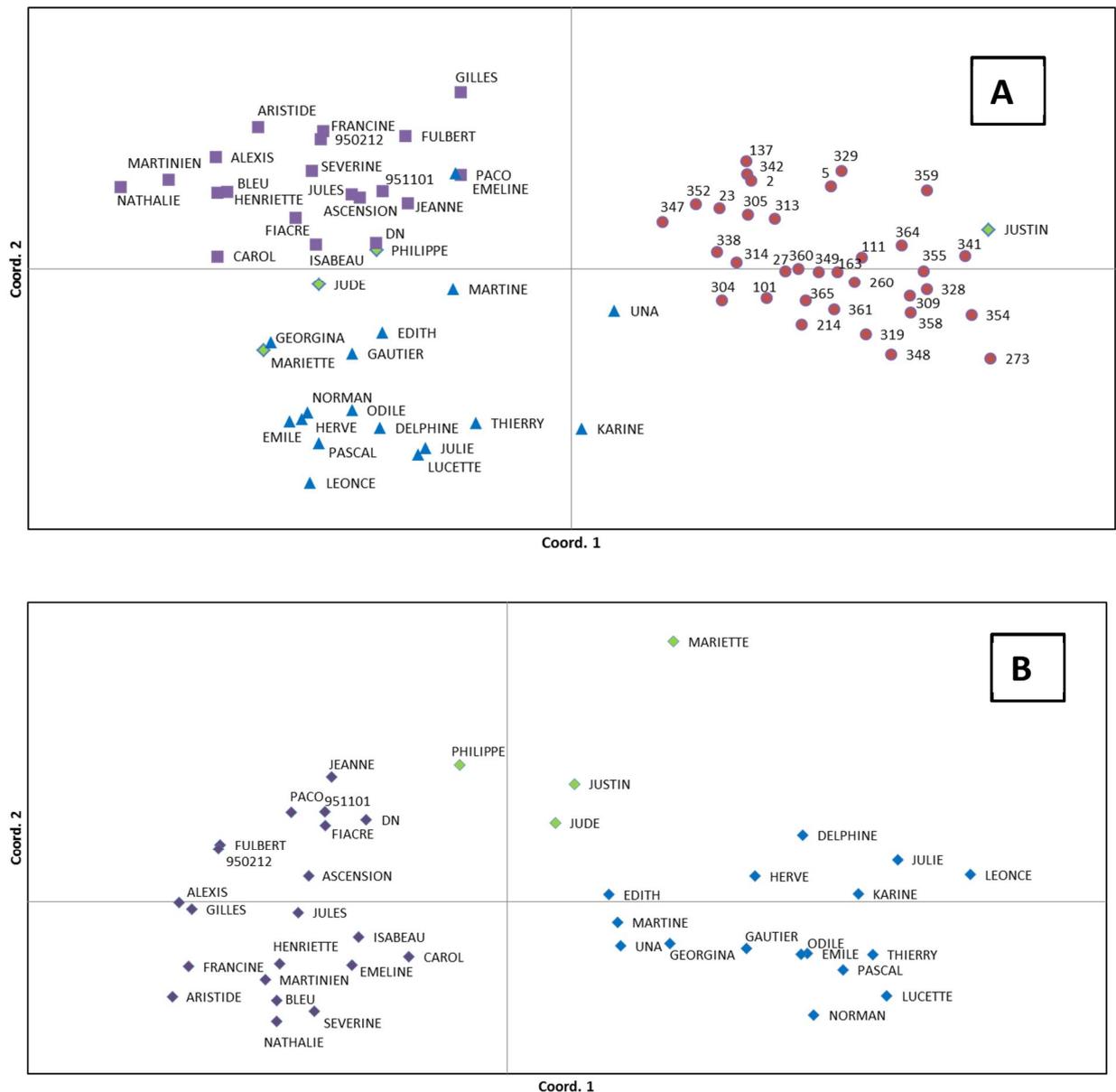


Figure 61. Analyse de la structure génétique (Analyse en Composantes Principales)

Si l'on observe maintenant le niveau de diversité génétique dans chacun de ces différents groupes (**Tableau 37**), on s'aperçoit que la variabilité la plus élevée selon l'ensemble des indices (Hexp, Hobs et Nall/loc) est celle du groupe de St Seurin issu du milieu naturel, et particulièrement le groupe *vert*. Au contraire, la variabilité la plus faible caractérise la cohorte de 1995, un résultat attendu puisque elle est issue d'un seul couple de géniteurs, et donc tous les individus sont apparentés. Par ailleurs, il est intéressant de voir que les valeurs de l'ensemble des individus capturés dans la frange estuarienne (*Capturés milieu naturel*) et issus des croisements en captivité (1994 ; 2007-2013) sont proches des valeurs de la cohorte des géniteurs du milieu naturel (*St Seur milieu naturel*).

Lorsqu'une population subit une forte réduction de la taille de ses effectifs, il s'en suit une diminution progressive du nombre d'allèles et du nombre d'individus d'hétérozygotes. Pourtant, le nombre d'allèles va diminuer beaucoup plus rapidement que l'hétérozygotie, ce qui se traduit par un excès d'hétérozygotes par rapport aux valeurs qui seraient obtenues

par simulations dans une population en équilibre (Denniston 1978; Nei et al. 1975). Cet excès persiste un certain nombre de générations jusqu'à ce que l'équilibre soit à nouveau atteint. Chez une espèce comme l'esturgeon dont le temps de génération est extrêmement long (environ 15 ans) et pour lequel la population n'a cessé de diminuer, il n'est donc pas surprenant d'obtenir des valeurs de Fis négatives (excès d'hétérozygotes) pour la plupart des groupes (**Tableau 37**). De plus, le test de Wilcoxon fondé sur cet excès d'hétérozygotie (logiciel BOTTLENECK) s'est avéré significatif ($P < 0.01$) et corrobore la signature génétique du déclin prononcé et prolongé chez *A. sturio*.

Tableau 37 : Diversité parmi les différents groupes génétiques. Nombre d'individus analysés N, Hétérozygotie attendue (H exp) et observée (Hobs), nombre d'allèles moyen par locus N all/locus, richesse allélique AR et indice de consanguinité Fis

Origine	N	H exp	Hobs	N all/locus	AR (n=20)	Fis
St Seur milieu naturel	41	0.614	0.737	4.28	3.57	-0.03938
Vert	4	0.720	0.708	3.50	3.50	0.01923
Violet	16	0.576	0.753	2.67	2.66	-0.32329
Bleu	15	0.560	0.733	2.83	2.75	-0.32316
St Seurin 1995	36	0.422	0.526	2.28	2.34	-0.21320
Capturés milieu naturel	195	0.599	0.622	4.28	3.43	-0.03938

Les valeurs moyennes du coefficient de parenté pour ces groupes (**Figure 62**) indiquent que celui de la cohorte de 1995 est effectivement de 0.5 (valeur pour des liens de parenté frères-sœurs), alors que pour les autres groupes, les valeurs sont plus basses. Pourtant, bien que pour le groupe *vert* et les individus capturés, ces valeurs sont négatives (c. à.d individus moins apparentés que la moyenne de la population), pour les deux autres groupes de géniteurs captifs (*bleu et rouge*), ces valeurs de l'ordre de 0,1-0,2, indiquant que ces individus sont de proches parents (Ex. cousins, grand parents, neveux).

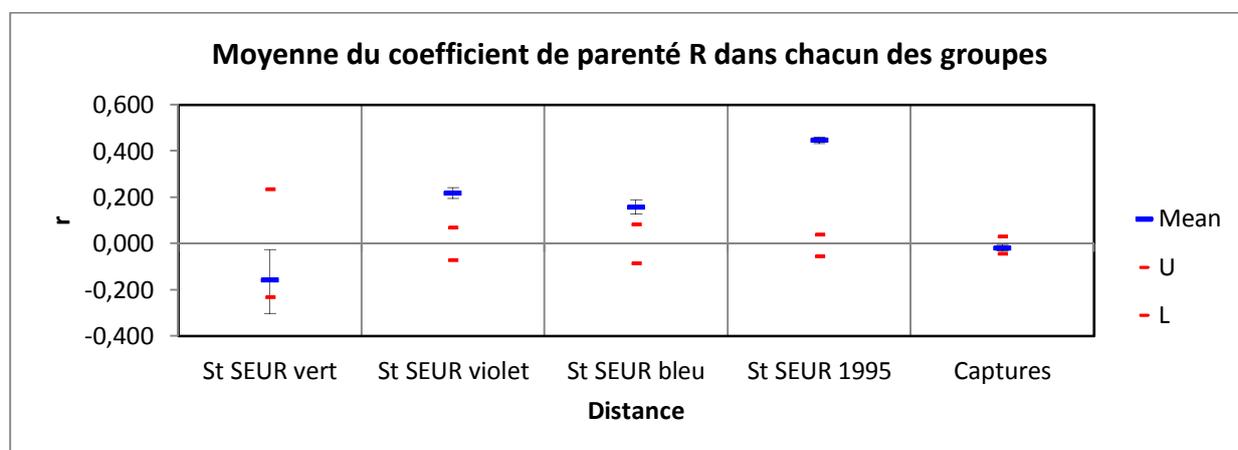


Figure 62 : Les valeurs moyennes de R sont indiquées en bleu. U (upper bound) et L (lower bound) indiquent l'intervalle de confiance au seuil de 95% autour de ces données.

VIII.4 Conclusions

L'élevage en captivité joue un rôle important dans la conservation des espèces menacées et l'intégration de l'information génétique est essentielle à plusieurs niveaux, dans le but d'optimiser la variabilité génétique et de garantir la survie à long terme de l'espèce. Outre la conservation du patrimoine génétique, le principal espoir de restauration de la population sauvage réside dans la conservation d'un stock d'individus en captivité comme support génétique d'une future restauration de la population par repeuplement.

Cette étude a permis d'estimer de manière détaillée le degré de variabilité génétique de cette population relictuelle, mais aussi de faire une première évaluation génétique du groupe d'esturgeons issus du programme de repeuplement de ces 20 dernières années. Le pouvoir d'identification élevé de notre set de marqueurs nous a permis d'assigner les descendances à leur parents d'origine avec une très grande fiabilité (presque 95%). Malgré la faible diversité de l'espèce, nous avons observé que chaque individu se caractérisait par un génotype unique, ce qui montre le potentiel de nos marqueurs et leur utilité pour les analyses postérieures. Elle fournit ainsi une information nécessaire et une méthodologie fiable, autant pour les gestionnaires que pour les chercheurs qui maintiennent actuellement le programme de conservation en captivité.

VIII.4.1 Une espèce à la diversité très réduite qui dépend aujourd'hui de la conservation ex-situ

Etant donné que le stock captif contient une fraction déjà très restreinte de la variabilité génétique de la population naturelle, il était indispensable de caractériser cette diversité restante pour les cohortes à venir.

Dans cette étude, les résultats positifs du test relatif au *goulot d'étranglement génétique* confirment une diversité réduite pour l'esturgeon dû aux événements passés, et met surtout en garde sur la capacité de cette unique population à s'adapter à de nouvelles contraintes de l'environnement. Si une population est trop petite, la probabilité qu'il existe un allèle (ou *variant génétique*) adapté au nouveau facteur de l'environnement est faible, et le risque d'extinction de l'espèce sera donc plus important (Frankham et al. 1999). D'ailleurs, bien que les valeurs d'hétérozygotie restent modérées, nous observons que le nombre d'allèles à ces marqueurs est très bas, et largement plus faible que celui observé chez d'autres espèces d'esturgeons également en déclin (**Tableau 38**).

Un phénomène fréquent chez les espèces des faibles effectifs est la consanguinité, c'est-à-dire la conséquence de croisements entre individus apparentés. Effectivement, plus la population est limitée, plus deux individus de la génération N risquent d'être apparentés. De plus, tous les individus ne se reproduisent pas soit parce qu'ils ne vivent pas assez longtemps, soit parce qu'ils ne sont pas assez fertiles, ce qui diminue encore le nombre d'ancêtres possibles. Les gènes disparaissent donc à cause de la dérive génétique, mais aussi à cause de l'extinction d'une partie des branches généalogiques. Un degré de consanguinité élevé implique en général l'expression de variants récessifs chez certains individus, entraînant une augmentation de la mortalité, ou par exemple, des malformations ou une résistance limitée aux pathogènes, qui limitent le potentiel de survie de l'espèce (Hedrick et Kalinowski, 2000). Nos résultats ont montré que, alors que les deux groupes bleu et violet étaient composés de proches parents, quatre individus appartenant au groupe vert étaient plus nettement différenciés du reste des individus et sont donc très importants pour le

maintien de la diversité génétique du stock captif. Par contre, ces individus (Philippe, Justin, Jude et Mariette) sont aussi parmi les plus âgés du stock captif (nés respectivement en 1984, 1984, 1970 et 1988) (**ANNEXE 2**). Philippe et Jude sont morts récemment et la probabilité de survie des deux individus restants pour les prochaines années est hélas relativement faible. Ces individus étant des mâles, la conservation de leur sperme par des méthodes de cryoconservation, maîtrisées sur la station d'expérimentation, est primordial pour la suite du programme (Horwath et al., 2011). Il en est de même pour les géniteurs sauvages nés en 1994 et donc âgés aujourd'hui de plus de 20 ans. Cela indique que bien que le programme de conservation s'appuyait jusqu'à maintenant sur des géniteurs sauvages, dans le futur, si aucun apport de captures extérieures vient renforcer le stock, il faudra uniquement compter sur les individus issus des cohortes produites en captivité. La prochaine génération de géniteurs doit être pensée pour perpétuer la diversité actuelle des géniteurs issus de la nature.

Tableau 38 : Diversité génétique (marqueurs microsatellites) chez plusieurs espèces d'esturgeons Remarque : Ces valeurs sont indicatives et donc pas directement comparables puisque elles sont fondées sur un nombre différent de microsatellites, et surtout certains des locus utilisés peuvent être différents.

Espèce	Nom commun	Pops	Statut	N analysés	N marqueurs	N all/loc	H obs	H exp	Bibliographie
<i>Acipenser sturio</i>	Esturgeon européen		En danger critique d'extinction						
		1		41	18	4	0,614	0,737	Cette étude
		2		36	18	2	0,415	0,502	Cette étude
		3		195	18	4	0,599	0,622	Cette étude
<i>Acipenser persicus</i>	Esturgeon perse		En danger critique d'extinction						
		1		13	11	7	0,564	0,773	Moghim et al.2013
		2		41	11	10	0,646	0,783	Moghim et al.2013
		3		26	11	8	0,676	0,760	Moghim et al.2013
		4		75	11	10	0,634	0,777	Moghim et al.2013
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	Esturgeon russe		En danger critique d'extinction						
		1		85	4	12	0,891	0,980	Timoshkinaa et al. 2009
		2		378	4	18	0,941	0,990	Timoshkinaa et al. 2009
		3		83	4	15	0,880	0,968	Timoshkinaa et al. 2009
<i>Acipenser stellatus</i>	Esturgeon étoilé		En danger critique d'extinction	7	7	11	na	na	Holostenco 2011
<i>Acipenser naccarii</i>	Esturgeon adriatique		En danger critique d'extinction	30	5	7	na	na	Georgescu et al. 2013

De plus, une observation très intéressante issue des tests d'assignation est que les parents des individus capturés dans la fraction estuarienne de la population ont tous ou presque été identifiés parmi les géniteurs du stock captif. En effet, sur 195 individus testés, les parents n'ont pas pu être attribués pour 13 individus (6.6%) seulement, une faible proportion qui est très proche du taux d'erreurs obtenu dans les assignations de descendants pour lesquelles l'ensemble des parents était connu (5.5 %). Si l'on tient compte de ce taux d'erreurs, on se rend compte ici que l'on a un système pratiquement « clos », c'est à dire probablement sans apport du milieu naturel. Ce résultat vient donc confirmer l'absence de reproduction (ou sinon très rare) en milieu naturel, comme suggéré précédemment et concentre donc tout l'espoir sur le programme de repeuplement.

Un résultat positif par ailleurs, est que le coefficient de parenté moyen entre les individus relâchés et recapturés dans le milieu naturel est proche de zéro (individus peu apparentés). Il indique que la stratégie de croisement conduite jusqu'à aujourd'hui dans le cadre du plan national de restauration de l'espèce (Dreal 2011) et fondée sur des croisements entre couples les plus différenciés possibles, c'est-à-dire des mâles et femelles appartenant à des groupes éloignés, selon Berrebi et Cherbonnell (2011) a permis de minimiser la consanguinité et de conserver un degré de diversité presque identique à celui de la diversité du stock captif issu du milieu naturel (**Tableau 37**). Durant les prochaines années, il est donc important de continuer les efforts et d'orienter au mieux les stratégies d'élevage du stock captif, car une perte de diversité additionnelle chez une espèce à la variabilité génétique déjà réduite entrainerait très certainement un vortex d'extinction. Dans la mesure du possible, la priorité sera d'éviter le plus possible les reproductions entre frères et sœurs, et entre géniteurs et descendants et de transmettre ainsi la plus grande fraction de la diversité génétique aux futures cohortes. La **Figure 63** est un exemple d'une matrice entre géniteurs fondée sur le coefficient de parenté, réalisée dans le but d'orienter les croisements en captivité. L'idée est d'optimiser les croisements entre les individus appartenant aux groupes les plus différents génétiquement (*rouge, vert et bleu*), puisque ces croisements « choisis » entre les individus les plus éloignés (« dissortative mating » en anglais) tendent à diminuer le degré de consanguinité beaucoup plus rapidement que par le hasard, pour le bénéfice des descendances. Pourtant, si l'on tient compte des mortalités dans le stock captif et des contraintes logistiques (tous les individus ne sont pas sexuellement matures au moment des reproductions assistées), il est très probable que les plans, de croisements fondés sur l'information génétique, soient modifiés. Une solution pour palier à ces pertes serait d'envisager par exemple la cryoconservation du sperme des mâles, en particulier ceux du groupe *vert*. Il serait aussi très bénéfique par ailleurs, que des captures accidentelles en fleuve, en estuaire ou à l'embouchure de l'estuaire puissent contribuer ponctuellement à fournir des géniteurs mâtures (en particulier des femelles) pour renouveler la diversité génétique.

VIII.4.2 Orientations futures pour le programme de conservation de l'esturgeon européen

Il faut souligner que cette étude est fondée sur des marqueurs génétiques neutres et que le niveau de diversité observée n'est donc pas nécessairement synonyme de *fitness* ou adaptabilité de l'espèce, même si elle peut y être corrélée. En effet, la variabilité génétique n'est pas toujours neutre, pouvant présenter un avantage sélectif pour les individus porteurs du « bon » allèle d'un gène crucial pour la survie ou la reproduction. Ainsi, si les microsatellites constituent surtout des outils de suivi des individus chez l'esturgeon, d'autres gènes « fonctionnels » seraient plus indiqués dans le futur pour l'étude de l'adaptabilité d'une espèce pratiquement éteinte dans le milieu naturel, qu'ils soient associés à sa capacité de reproduction en captivité ou à sa survie dans le milieu naturel. Le séquençage du génome a été maintenant réalisé chez de nombreuses espèces au bord de l'extinction et a permis de récolter un maximum d'informations utiles pour leur conservation. Chez l'esturgeon européen, le séquençage du génome est en cours, et pourra permettre prochainement d'obtenir et d'utiliser une multitude d'information sur la diversité génomique de l'espèce.

Les applications génomiques peuvent avoir des conséquences intéressantes sur plusieurs aspects importants, en particulier dans le contexte des espèces menacées :

1) Tout d'abord, le séquençage massif de quelques individus peut permettre l'identification de milliers de polymorphisme distribués dans tout le génome et qui peuvent être situés sur des régions connues et avec des fonctions connues. Ces marqueurs peuvent permettre l'accès à des composantes fonctionnelles des variations génétiques et peuvent permettre une analyse plus détaillée des processus démographiques et évolutifs qui ont agi dans le passé sur l'espèce.

2) Dans le contexte d'espèces avec de très faibles effectifs, le phénomène de consanguinité est très fréquent. Il conduit souvent à une diminution de la valeur sélective des descendants et entraîne l'apparition de toutes sortes de défauts : diminution de la taille, baisse de fertilité, faible résistance aux maladies, malformations, etc. Chez l'esturgeon européen, l'étude de ces gènes est particulièrement intéressante puisque sa survie dépendra en grande partie, comme nous l'avons mentionné plus haut, de l'élevage en captivité où les risques associés aux maladies et aux parasites sont importants. Cette information permettra la mise en place de stratégies de gestion pour conserver les adaptations locales, maximiser le potentiel adaptatif de l'espèce et minimiser les risques.

ANNEXE 1 : Résultats des tests d'amplifications pour 117 amorces chez *A. sturio*.
(POLYM=Polymorphe: plusieurs variants observés/marqueur pour l'ensemble des échantillons analysés ;
MONOM=Monomorphe : un seul variant observé/marqueur pour l'ensemble des individus; DUPLIQUE : deux
copies du même locus, soit plus de deux allèles observés par marqueur par individu ; NO AMP=Pas
d'amplification : absence de produit PCR, et ce même après plusieurs tests réalisés avec des conditions
différentes ; TAILLE=Taille du produit d'amplification PCR trop petite (< 100) ou trop grande (>450) pour notre
méthode de détection ; PAS CLAIR : produits non spécifiques, pics parasites (« stutters »).

AMORCE	RESULTAT	ESPECE	REFERENCE
AcG 198F	POLYM	<i>A. transmontanus/A. medirostris</i>	Börk et al. 2008
Afu19	POLYM	<i>A. fulvescens</i>	Weisch et al. 2003
Ag28F	POLYM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Afu39	POLYM	<i>A. fulvescens</i>	Weisch et al. 2003
Afu54	POLYM	<i>A. fulvescens</i>	Weisch et al. 2003
Afu68	POLYM	<i>A. fulvescens</i>	Weisch et al. 2003
AfuG 184F	POLYM	<i>A. fulvescens</i>	Weisch et al. 2003
Ag10F	POLYM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag14F	POLYM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag16F	POLYM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag20F	POLYM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag31F	POLYM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag38F	POLYM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag39F	POLYM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag47F	POLYM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
An20F	POLYM	<i>A. naccarii</i>	Zane et al. 2002
Aox23	POLYM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
Aox27F	POLYM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
Aox45	POLYM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxC27	POLYM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxC55	POLYM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxD165F	POLYM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxD172	POLYM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxD188F	POLYM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxD297	POLYM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxD32	POLYM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxD44	POLYM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxD54	POLYM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxD64	POLYM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxD234	POLYM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AS002F	POLYM	<i>A. sirensis</i>	Zhu et al. 2005
Spl-101F	POLYM	<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>	McQuown et al. 2005
Spl-106F	POLYM	<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>	McQuown et al. 2005
Spl-113F	POLYM	<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>	McQuown et al. 2005
AfuG41F	POLYM	<i>A. fulvescens</i>	Weisch et al. 2003
AcG-22F	MONOM	<i>A. transmontanus/A. medirostris</i>	Börk et al. 2008
AfuG 198F	MONOM	<i>A. fulvescens</i>	Weisch et al. 2003
AfuG51F	MONOM	<i>A. fulvescens</i>	Weisch et al. 2003
Ag231F	MONOM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag08F	MONOM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag09F	MONOM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag19F	MONOM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag21F	MONOM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag22F	MONOM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag24F	MONOM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag25F	MONOM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag26F	MONOM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag35F	MONOM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag40F	MONOM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag45F	MONOM	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
AoxD234F	MONOM	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AS004F	MONOM	<i>A. sirensis</i>	Zhu et al. 2005
AS021F	MONOM	<i>A. sirensis</i>	Zhu et al. 2005
AS043F	MONOM	<i>A. sirensis</i>	Zhu et al. 2005
Psp-26F	MONOM	<i>Polyodon spathula</i>	Heist et al. 2002
Psp-29F	MONOM	<i>Polyodon spathula</i>	Heist et al. 2002
Spl-163F	MONOM	<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>	McQuown et al. 2005
AfuG 113F	DUPLIQUE	<i>A. fulvescens</i>	Weisch et al. 2003
Ag15F	DUPLIQUE	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag034F	DUPLIQUE	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxD241F	DUPLIQUE	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
Ag01F	DUPLIQUE	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag12F	DUPLIQUE	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag11F	TAILLE	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag23F	TAILLE	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag34F	TAILLE	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
An77F	TAILLE	<i>A. naccarii</i>	Zane et al. 2002
AfuG123F	PAS CLAIR	<i>A. fulvescens</i>	Weisch et al. 2003
Ag05F	PAS CLAIR	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag13F	PAS CLAIR	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag36F	PAS CLAIR	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag41F	PAS CLAIR	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag48F	PAS CLAIR	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag49F	PAS CLAIR	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
AnacC11F	PAS CLAIR	<i>A. naccarii</i>	Forlani et al. 2008
AnacD3F	PAS CLAIR	<i>A. naccarii</i>	Forlani et al. 2008
Aox12F	PAS CLAIR	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxD161R	PAS CLAIR	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxD242F	PAS CLAIR	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AfuG72F	PAS CLAIR	<i>A. fulvescens</i>	Weisch et al. 2003
AcG 56F	NO AMP	<i>A. transmontanus/A. medirostris</i>	Börk et al. 2008
AcG 93F	NO AMP	<i>A. transmontanus/A. medirostris</i>	Börk et al. 2008
AcG110F	NO AMP	<i>A. transmontanus/A. medirostris</i>	Börk et al. 2008
AcG142F	NO AMP	<i>A. transmontanus/A. medirostris</i>	Börk et al. 2008
AcG48F	NO AMP	<i>A. transmontanus/A. medirostris</i>	Börk et al. 2008
AcG4F	NO AMP	<i>A. transmontanus/A. medirostris</i>	Börk et al. 2008
AcG76F	NO AMP	<i>A. transmontanus/A. medirostris</i>	Börk et al. 2008
AfuG 115F	NO AMP	<i>A. fulvescens</i>	Weisch et al. 2003
Ag03F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag04F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag06F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag07F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag17F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag18F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag27F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag29F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag30F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag32F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag33F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag37F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag42F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag43F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag44F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag46F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
Ag50F	NO AMP	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Rajkov et al. 2014
An16F	NO AMP	<i>A. naccarii</i>	Zane et al. 2002
AnacE4F	NO AMP	<i>A. naccarii</i>	Forlani et al. 2008
AoxB28F	NO AMP	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
AoxD170F	NO AMP	<i>A. oxyrinchus</i>	Henderson-Arzapalo and King 2002
LS34F	NO AMP	<i>A. fulvescens</i>	May et al. 1997
Psp-12F	NO AMP	<i>Polyodon spathula</i>	Heist et al. 2002
Psp-20F	NO AMP	<i>Polyodon spathula</i>	Heist et al. 2002
Psp-21F	NO AMP	<i>Polyodon spathula</i>	Heist et al. 2002
Spl-100F	NO AMP	<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>	McQuown et al. 2005
Spl-104F	NO AMP	<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>	McQuown et al. 2005
Spl123F	NO AMP	<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>	McQuown et al. 2005
Spl-168F	NO AMP	<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>	McQuown et al. 2005
Spl170aF	NO AMP	<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>	McQuown et al. 2005

ANNEXE 2 : Echantillons du stock captif d'*A. sturio* analysés dans cette étude (n=75)

NOMS	CODE GENET	MATRICULE	SEXE	COHORTE	GROUPE GENET
Jude	ASTU-05	30301	M	1970	vert
Justin	ASTU-03	950901	M	1984	vert
Philippe	ASTU-17	970101	M	1984	vert
Mariette	ASTU-07	951103	M	1988	vert
Emeline	ASTU-10	940301	M	1988	vert/violet
Ascension	ASTU-14	950801	M	1988	violet
Bleu	ASTU-36	930201	M	1988	violet
DN	ASTU-01	930102	F	1988	violet
Aristide	ASTU-35	10103	F	1994	violet
Carol	ASTU-22	950210	M	1994	violet
Francine	ASTU-70	951001	F	1994	violet
Fulbert	ASTU-34	30202	M	1994	violet
Isabeau	ASTU-67	951301	M	1994	violet
Jeanne	ASTU-78	951401	F	1994	violet
Jules	ASTU-38	30102	F	1994	violet
Séverine	ASTU-16	10202	F	1994	violet
Gilles	ASTU-18	Gilles	M	1994	violet
Martinien	ASTU-24	20202	M	1994	violet
Fiacre	ASTU-09	10102	F	1994	violet
Nathalie	ASTU-08	101	M	1994	violet
Henriette	ASTU-73	951202	F	1994	violet
950212	ASTU-62	950212	F	1994	violet
951101	ASTU-66	951101	F	1994	violet
Alexis	ASTU-15	70101	F	IND	violet
PACO	ASTU-21	70201	M	IND	violet
Delphine	ASTU-06	10201	M	1994	bleu
Edith	ASTU-33	20301	F	1994	bleu
Emile	ASTU-20	950504	M	1994	bleu
Georgina	ASTU-72	951102	F	1994	bleu
Karine	ASTU-75	951402	F	1994	bleu
Léonce	ASTU-26	30401	F	1994	bleu
Lucette	ASTU-79	951501	F	1994	bleu
Martine	ASTU-27	951502	F	1994	bleu
Norman	ASTU-76	951503	M	1994	bleu
Odile	ASTU-77	951504	F	1994	bleu
Pascal	ASTU-74	951601	M	1994	bleu
Hervé	ASTU-37	20101	M	1994	bleu
Julie	ASTU-04	30101	F	1994	bleu
Thierry	ASTU-32	20201	F	1994	bleu
Gautier	ASTU-13	30201	M	IND	bleu
2	ASTU-65	95002	F	1995	rouge
5	ASTU-54	95005	F	1995	rouge
23	ASTU-51	95023	F	1995	rouge
27	ASTU-59	95027	F	1995	rouge
101	ASTU-46	95101	M	1995	rouge
111	ASTU-71	95111	F	1995	rouge
137	ASTU-41	95137	M	1995	rouge
163	ASTU-57	95163	M	1995	rouge
214	ASTU-42	95214	M	1995	rouge
260	ASTU-61	95260	F	1995	rouge
273	ASTU-58	95273	F	1995	rouge
304	ASTU-69	95304	F	1995	rouge
305	ASTU-60	95305	M	1995	rouge
309	ASTU-63	95309	F	1995	rouge
313	ASTU-28	95313	F	1995	rouge
314	ASTU-64	95314	M	1995	rouge
316	ASTU-52	95316	F	1995	rouge
319	ASTU-56	95319	M	1995	rouge
328	ASTU-47	95328	M	1995	rouge
329	ASTU-40	95329	F	1995	rouge
338	ASTU-02	95338	M	1995	rouge
341	ASTU-53	95341	F	1995	rouge
342	ASTU-11	95342	M	1995	rouge
347	ASTU-12	95347	F	1995	rouge
348	ASTU-29	95348	M	1995	rouge
349	ASTU-44	95349	F	1995	rouge
352	ASTU-49	95352	M	1995	rouge
354	ASTU-31	95354	F	1995	rouge
355	ASTU-43	95355	F	1995	rouge
358	ASTU-48	95358	M	1995	rouge
359	ASTU-19	95359	F	1995	rouge
360	ASTU-30	95360	F	1995	rouge
361	ASTU-45	95361	F	1995	rouge
364	ASTU-50	95364	M	1995	rouge
365	ASTU-25	95365	M	1995	rouge