



HAL
open science

Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio*: Bilan scientifique et technique 2017

Philippe Jatteau, Philippe Jatteau

► To cite this version:

Philippe Jatteau, Philippe Jatteau. Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio*: Bilan scientifique et technique 2017. [Rapport de recherche] irstea. 2018, pp.89. hal-02607691

HAL Id: hal-02607691

<https://hal.inrae.fr/hal-02607691>

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.

Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio*

BILAN SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE 2017



© Ph Jatteau - IRSTEA

30 Juin 2018

Philippe JATTEAU (coordination)

IRSTEA GROUPEMENT DE BORDEAUX

ETUDE N°200

UR ECOSYSTEMES AQUATIQUES ET CHANGEMENTS GLOBAUX

50 avenue de Verdun

33612 Cestas Cedex



Ce projet a été cofinancé par l'agence de l'Eau Adour Garonne et le Conseil Général de la Gironde, avec le soutien de la DREAL Aquitaine. Il s'inscrit dans le cadre du Plan National d'Actions en faveur de l'esturgeon européen.

Référence à mentionner :

Pour l'ensemble du document :

Jatteau Ph. Coord., 2018. Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* - Bilan scientifique et technique 2016. Irstea Bordeaux, Etude N° 200, 89p.

Pour les citations partielles :

Jatteau Ph., 2018. Faits marquants de l'année 2017, p.11-13. In Jatteau Ph. Coord. Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* - Bilan scientifique et technique 2017. Irstea Bordeaux, Etude N° 200.

Chèvre P., Horokhovatskyi Y., Bons S., 2018. Estimation de la qualité des semences congelées d'esturgeon européen (*Acipenser sturio*) – première approche, p.15-25. In Jatteau Ph. Coord. Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* - Bilan scientifique et technique 2017. Irstea Bordeaux, Etude N° 200.

Bons S., Chèvre P., 2018. Qualité des semences en 2017, p.27-44. In Jatteau Ph. Coord. Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* - Bilan scientifique et technique 2017. Irstea Bordeaux, Etude N° 200.

Roques S., Chancerel E., Acolas M.L., 2018. Intégration des approches génétiques au programme de conservation d'une espèce menacée, l'esturgeon Européen (*Acipenser sturio*): passé, présent et futur, p.45-63. In Jatteau Ph. Coord. Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* - Bilan scientifique et technique 2017. Irstea Bordeaux, Etude N° 200.

Acolas M.L., Le Barh R., Mas L., Souben J., Roques S., Gazeau C., Jatteau P., Bigot J.F., 2018. Suivi de la population d'esturgeons européens en milieu naturel – Focus sur les échantillonnages 2017, p.65-77. In Jatteau Ph. Coord. Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* - Bilan scientifique et technique 2017. Irstea Bordeaux, Etude N° 200.

Jatteau Ph., Lambert G., 2018. Action de communication en 2017 dans le cadre du Plan National d'Actions pour l'esturgeon européen *Acipenser sturio*, p.79-82. In Jatteau Ph. Coord. Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* - Bilan scientifique et technique 2017. Irstea Bordeaux, Etude N° 200.

Résumé

Ce rapport présente le bilan scientifique et technique des actions de recherche et de conservation menées par Irstea dans le cadre du Plan National d'Actions en faveur de l'esturgeon européen. Ces travaux ont été financés par l'Agence de l'Eau Adour Garonne et le Conseil Général de la Gironde avec le soutien de la DREAL Aquitaine. Ce document présente les résultats des premières estimations de la qualité des spermés congelés ; une synthèse sur la qualité des gamètes mâles ; les perspectives d'application des avancées en génétique au programme de conservation, le suivi de la population en milieu naturel via les campagnes d'échantillonnage « Sturat » en estuaire ; une synthèse des actions de communication.

La saison a débuté le 3 mai avec les pré-sélections des géniteurs. Aucune femelle n'a été jugée apte pour les reproductions. Néanmoins du sperme a été congelé. Les derniers résultats en génétique montrent les applications pratiques de ces connaissances et outils pour le programme de restauration de l'espèce, notamment en matière de croisement, détection d'hybridation potentielle avec l'esturgeon Atlantique. Les travaux effectués sur la population en milieu naturel ont montré une augmentation des captures par rapport à 2016. Ils ont également permis de confirmer l'arrivée près des côtes françaises, d'individus de grande taille, laissant présager l'arrivée à maturation de futurs géniteurs.

Abstract

This report presents the assessment of scientific and technical research and conservation actions by Irstea in the framework of the National Action Plan for the European sturgeon. These works were funded by the Adour Garonne Water Agency and the General Council of the Gironde with the support of Dreal Aquitaine. This document presents the results of the first assessment of quality of cryopreserved sperms; a synthesis on the quality of the male gametes; the set up and first developments of a genetic tool for parental assignment, the monitoring of the population in the wild via «Sturat» sampling campaigns in the estuary; a summary of the communication actions.

The season started on May 3rd with the pre-selections of the broodstock. No females were found suitable for breeding. Nevertheless semen was frozen. The latest genetic results show the practical applications of this knowledge and tools for the species restoration program, particularly in terms of crossbreeding, detection of potential hybridization with Atlantic sturgeon. Work carried out on the population in the natural environment showed an increase in catches compared to 2016. They have also confirmed the arrival near the French coast of large individuals, suggesting the maturation of future spawners.

Sommaire

| | |
|---|----|
| Résumé | 5 |
| Abstract..... | 5 |
| Introduction | 9 |
| Chapitre I : Faits marquants de l'année 2017 | 11 |
| I.1 Bilan des reproductions | 11 |
| I.2 Aménagements - Equipements | 11 |
| Chapitre II : Estimation de la qualité des semences d'esturgeon européen (<i>Acipenser sturio</i>) congelées – première approche..... | 15 |
| II.1 Introduction..... | 15 |
| II.2 Matériel et Méthodes..... | 15 |
| II.2.1 Echantillons analysés | 16 |
| II.2.2 Décongélation et mesures standard sur les spermatozoïdes | 17 |
| II.2.3 Production de gamètes pour tests de pouvoir fécondant..... | 18 |
| II.2.4 fécondation avec du sperme congelé et taux de fécondation..... | 18 |
| II.2.5 Analyses cytométriques | 19 |
| II.3 Résultats..... | 19 |
| II.3.1 Densité, motilité, durée d'activation | 19 |
| II.3.2 Analyse du pouvoir fécondant..... | 21 |
| II.3.3 Analyses en cytométrie | 23 |
| II.4 Conclusion : | 23 |
| Chapitre III : Qualité des semences en 2017 (Action 23) | 27 |
| III.1 Introduction..... | 27 |
| III.2 Matériels et méthodes..... | 27 |
| III.3 Résultats et Discussion..... | 30 |
| III.3.1 Prélèvement du 13 juin 2017 | 31 |
| III.3.2 Prélèvement du 20 juin 2017 | 35 |
| III.3.3 Prélèvement du 29 juin 2017 | 37 |
| III.4 Conclusions..... | 39 |
| III.5 Congélation de semences | 41 |
| Chapitre IV : Intégration des approches génétiques au programme de conservation d'une espèce menacée, l'esturgeon Européen (<i>Acipenser sturio</i>) : passé, présent et futur..... | 45 |
| IV.1 Introduction : Programme de conservation ex-situ | 45 |
| IV.2. Matériels et Méthodes | 50 |
| IV.2.1 Gestion génétique et optimisation du stock captif | 50 |
| IV.2.2 Gestion génétique de la population soutenue..... | 51 |
| IV.3. Résultats..... | 52 |
| IV.3.1 Génétique studbook | 52 |
| IV.3.2 Gestion de la population captive..... | 54 |
| IV.3.3 Gestion population soutenue..... | 57 |
| IV.4. Conclusions et perspectives..... | 58 |
| IV.4.1. Programme d'élevage | 58 |
| IV.4.2. Programme de repeuplement et population soutenue | 60 |
| IV.4.3. Vers d'autres outils génomiques | 60 |
| Chapitre V : Suivi de la population d'esturgeons européens en milieu naturel - focus sur les échantillonnages 2017..... | 65 |

| | |
|---|----|
| V.1 Introduction | 65 |
| V.2 Matériels et Méthodes | 66 |
| V.2.1 Campagnes d'échantillonnage « Sturat » dans l'estuaire de la Gironde..... | 66 |
| V.2.2 Recensement des déclarations de captures accidentelles d'esturgeons, gestion de la base de données | 67 |
| V.3 Résultats-Discussion | 67 |
| V.3.1 Campagne d'échantillonnage « Sturat » dans l'estuaire de la Gironde | 67 |
| V.3.2 Recensement des déclarations de captures accidentelles d'esturgeons..... | 72 |
| V.4 Conclusions-Perspectives..... | 75 |
| V.4.1 Campagnes d'échantillonnage « Sturat » dans l'estuaire de la Gironde..... | 75 |
| V.4.2 Recensement des déclarations de captures accidentelles d'esturgeons..... | 75 |
| Chapitre VI: Actions de communication en 2017 dans le cadre du Plan National d'Actions... | 79 |
| VI.1 Actions de communication grand public – présence dans les médias..... | 79 |
| VI.1.1 Presse format papier | 79 |
| VI.1.2 Actualités WEB | 80 |
| Actualités Irstea – 4 septembre 2017..... | 80 |
| L'esturgeon européen, capable de s'adapter à la pollution et aux changements climatiques http://www.irstea.fr/toutes-les-actualites/departement-eaux/esturgeon-europeen-pollution-climat-sturtop | 80 |
| VI.1.3 Actualités télévision..... | 80 |
| VI.4 Actions de communications scientifiques | 80 |
| VI.4.1 Colloque | 80 |
| VI.4.2 Publications | 82 |
| Références bibliographiques | 83 |

Introduction

L'esturgeon européen, espèce emblématique de grands bassins européens comme la Gironde, l'Elbe ou le Guadalquivir, est classé en danger critique d'extinction selon les critères de l'IUCN, et un plan d'actions pour la protection et la restauration de l'espèce a été rédigé sous l'égide de la Convention de Berne (Rosenthal *et al.*, 2007). Les principales directives ont été reprises et déclinées dans 2 plan nationaux d'actions, en France (Dreal, 2011) et en Allemagne (Gessner *et al.*, 2010). La dernière population est issue du bassin de la Gironde et la dernière reproduction naturelle date de 1994. Depuis cette date un stock ex situ a été constitué afin de préserver des spécimens dans l'optique de soutenir la population naturelle (Williot *et al.*, 1997). Grâce aux reproductions assistées réalisées à partir du stock de géniteurs captifs des alevinages réguliers ont été réalisés depuis 2007. (Rouault *et al.*, 2008; Rochard, 2009; 2011; Acolas, 2012; 2013; Jatteau, 2014; 2015; 2016). Au total plus de 1 790 000 individus, larves ou juvéniles, ont été relâchés entre 1995 et 2014 dans le bassin de la Gironde pour soutenir la population.

Depuis 2012, l'association Migado (Migrateurs Garonne Dordogne) a en charge la gestion du stock captif et les opérations de lâcher. En 2017, le transfert de compétence à Migado, concernant les reproductions s'est poursuivi, avec la formation aux échographies et à la stabulation des géniteurs.

Les actions présentées dans ce rapport sont pour partie numérotées selon les actions proposées pour contribuer au plan international de restauration de l'esturgeon européen par Rochard et Williot (2006). Ce rapport présente (1) une synthèse des faits marquants de l'année 2017, (2) les résultats des premières estimations de la qualité des spermes congelés, (3) la sélection et la congélation des semences, (4) les derniers développements de l'outil génétique pour les analyses de consanguinité, de parenté, d'assignation, le sexage et la détection d'hybrides, (5) le suivi de la population en milieu naturel via les campagnes d'échantillonnage « Sturat » et l'analyse des déclarations de captures accidentelles, et (6) une synthèse des actions de communication.

Chapitre I : Faits marquants de l'année 2017

Jatteau Ph.

I.1 Bilan des reproductions

La saison 2017 n'a pas permis de réaliser des reproductions contrôlées, le stock de géniteurs « anciens » étant extrêmement réduit. Une première évaluation de la maturité a été réalisée sur le stock de sub-adultes, cohortes 2007 et suivantes.

Au 3 mai 2017, le stock s'élevait à 20 géniteurs, 14 mâles et 6 femelles. Au final, seulement 2 mâles « anciens » ont été présélectionnés en 2017, car aucune femelle ne présentait un niveau de maturation suffisant.

Parmi les mâles présentant un niveau de maturation correct, seuls les mâles présentant un taux de croissance supérieur à 0 ont été sélectionnés. Parmi ceux-ci, 2 ont été écartés car leur semences avaient déjà été congelées en quantité.

De plus 57 juvéniles ou sub-adultes ont été également été échographiés. Treize mâles ont été sélectionnés, mais aucune femelle n'a été retenue.

Au final, 15 mâles ont été transférés dans Sturio 1 pour évaluer la qualité de la maturation des sub-adultes et réaliser des congélations.

I.2 Aménagements - Equipements

Le bâtiment Sturio 1 est opérationnel depuis 2016. Quelques aménagements mineurs ont été opérés sur la partie « reproduction » (mise en place de néons qualité lumière du jour, avec ombrière pour atténuer l'intensité lumineuse).

Les supports de luminaire ont été modifiés sur la partie « juvéniles » du bâtiment Sturio 1, ainsi que pour tous les bassins du bâtiment Sturio 2. Ce nouveau système permet de changer facilement la source lumineuse (néon ou ampoule), sans intervenir dans le bassin, grâce à un rail, qui permet d'amener le luminaire sur le bord du bac (**Figure 1**).



Figure 1 : Système de rail pour le déplacement du luminaire (Sturio 1) (© Ph Jatteau - Irstea)

Les autres investissements majeurs réalisés en 2017 sont au nombre de 3. Une table froide a été achetée pour les manipulations des spermés avant congélation (**Figure 2**).



Figure 2 : Table froide pour les congélations de spermés (© Ph Jatteau - Irstea)

L'acquisition d'un second échographe permettra de réaliser des estimations de la maturité des gonades et de déterminer le sexe des poissons capturés lors des campagnes Sturat (**Figure 3**).



Figure 3 : Echographe destiné aux campagnes Sturat (© Ph Jatteau - Irstea)

Pour terminer, 10 marques DST-CTD ont été achetées. Ces marques à mémoire permettent d'enregistrer des données de profondeur, salinité et température. Elles renseignent donc sur le milieu fréquenté par le poisson marqué et permettent d'acquérir des informations sur ses déplacements (**Figure 4**).



Figure 4 : Une marque DST en place sur un poisson lors d'une campagne Sturat (© Ph Jatteau - Irstea)

Chapitre II : Estimation de la qualité des semences congelées d'esturgeon européen (*Acipenser sturio*) – première approche

Chèvre P., Horokhovatskyi Y., Bons S.

II.1 Introduction

La congélation des semences permet la conservation à long terme de la génétique des mâles. Elle revêt un intérêt tout particulier pour les espèces menacées, dont les effectifs conservés sont faibles. La production de semences de qualité ne peut être garantie annuellement pour chacun des mâles pas plus que leur survie en captivité. C'est un outil important pour la gestion génétique des stocks, en offrant des possibilités plus larges et adaptées de croisements.

Elle permet un contrôle sanitaire et une diffusion plus facile des semences qu'à partir du transport des animaux vivants. Le frein principal à une utilisation « plus large échelle » des semences congelées est liée à la nécessaire adaptation des méthodologies (congélation et fécondation) à des plus grands volumes. Un travail reste également à faire pour optimiser les taux de fécondation, dans le cas d'éjaculats de mauvaise qualité.

Dès 2008 des tests préliminaires de congélation ont été réalisés avec des semences issues d'esturgeon sibérien (*Acipenser baeri*), avec deux types de cryoprotecteurs (DMSO et méthanol). Compte tenu des résultats positifs obtenus (survie après décongélation), les deux cryoprotecteurs ont été utilisés en parallèle sur des spermies d'esturgeon européen (*Acipenser sturio*) récoltés lors de la première saison de congélation en 2008.

En raison du risque d'altération du pouvoir fécondant avec utilisation du DMSO (Horvath *et al.*, 2005) et pour simplifier la procédure de congélation, seul le méthanol a ensuite été utilisé. De 2008 à 2016, 53 éjaculats ont été congelés issus de 21 mâles différents. Le stock est aujourd'hui constitué d'environ 5 500 paillettes.

Environ 70 % du stock de géniteurs a été perdu dans la période 2014 à 2016 (dont les mâles les plus intéressants appartenant aux cohortes anciennes). Dans le même temps, la qualité globale des semences collectée en frais s'est largement détériorée. Il était donc important de vérifier la qualité des semences présentes dans la cryobanque. Des contrôles (survie après décongélation) n'avaient jusqu'alors été réalisés que de façon très partielles (faute de temps et matériel adapté).

II.2 Matériel et Méthodes

Compte tenu de la grande valeur des semences, il a été décidé de limiter le nombre d'échantillons utilisés (particulièrement pour les poissons des plus anciennes cohortes) et d'étudier un maximum d'indicateurs de viabilité.

3 types d'analyses ont été réalisés :

- Des analyses standards (concentrations, motilité) réalisées à partir d'un système d'analyse automatique, permettant de s'affranchir de la variabilité des mesures effectuées visuellement par observateur

- La mesure du pouvoir fécondant (capacité à féconder les ovocytes et à assurer le développement normal des embryons)

- Analyses en cytométrie et biochimie pour mesurer le niveau d'intégrité des cellules après décongélation (survie, contenu en ATP).

Les 2 premiers types d'analyses ont été réalisés à la station Irstea de Saint Seurin sur l'Isle et les aspects cellulaires traités au laboratoire de Physiologie des poissons de l'INRA de Rennes.

Ce travail a été réalisé par Yevhen Horokhovatskyi , doctorant à l'Université de Bohème du Sud en République Tchèque, dans le cadre d'un projet Erasmus. Il a été accueilli en mars et avril 2017 à la fois à la station Irstea de Saint Seurin et à l'INRA de Rennes (Co encadrement C. Labbé et P. Chèvre).

II.2.1 Echantillons analysés

Les 21 mâles prélevés de 2008 à 2017, ont été étudiés.

Quarante-huit prélèvements différents ont été analysés (**Tableau 1**) couvrant environ 80 % des dates de congélations. Parmi ces prélèvements, 8 d'entre eux, issus de 4 males (Bleu, Norman, Emeline et Emile) ont été congelés avec les deux types de cryoprotecteurs (méthanol et DMSO).

Un maximum de 3 paillettes par prélèvement a été utilisé (une pour chaque type d'analyses) à l'exception des semences issues de Philippe et Jude. Pour ces deux poissons qui ont un très grand intérêt génétique, et dont le stock de paillettes est réduit, les analyses standards et le test de pouvoir fécondant ont été réalisés le même jour, à partir d'une seule paillette.

Les différents échantillons à analyser ont été prélevés dans la cryobanque le 8 mars, identifiés et stockés de façon spécifique, pour être facilement accessibles.

| Nom | Cohorte | Nº analyse | date congélation | Cryoprotecteur |
|----------------|---------|------------|------------------|----------------|
| Philipe | 1984 | 47 | 30.05.2008 | Methanol |
| Jude | 1970 | 48 | 30.05.2008 | Methanol |
| Bleu | 1988 | 1 | 30.05.2008 | Methanol |
| | | 2 | 30.05.2008 | DMSO |
| | | 3 | 10.06.2011 | Methanol |
| | | 25 | 10.06.2011 | Methanol |
| Norman | 1994 | 4 | 30.05.2008 | Methanol |
| | | 5 | 30.05.2008 | DMSO |
| | | 26 | 30.06.2011 | Methanol |
| Isabeau | 1994 | 6 | 18.06.2008 | Methanol |
| Emeline | 1994 | 7 | 19.06.2008 | DMSO |
| | | 8 | 19.06.2008 | Methanol |

| | | | | |
|------------------|------|----|------------|----------|
| | | 27 | 16.06.2011 | Methanol |
| | | 35 | 04.07.2013 | Methanol |
| | | 42 | 05.07.2016 | Methanol |
| | | 45 | 23.07.2015 | Methanol |
| Emile | 1994 | 9 | 19.06.2008 | Methanol |
| | | 10 | 19.06.2008 | DMSO |
| | | 19 | 03.06.2009 | Methanol |
| | | 20 | 17.06.2010 | Methanol |
| 364 | 1995 | 11 | 03.06.2009 | Methanol |
| 338 | 1995 | 12 | 16.06.2009 | Methanol |
| Martinien | 1995 | 14 | 16.06.2009 | Methanol |
| | | 40 | 04.06.2014 | Methanol |
| Herve | 1995 | 13 | 16.06.2009 | Methanol |
| | | 28 | 29.06.2011 | Methanol |
| | | 46 | 05.07.2016 | Methanol |
| Mariette | 1988 | 16 | 09.07.2009 | Methanol |
| | | 17 | 18.07.2009 | Methanol |
| | | 18 | 05.08.2009 | Methanol |
| | | 21 | 15.07.2010 | Methanol |
| | | 32 | 12.07.2012 | Methanol |
| Carol | 1994 | 15 | 10.07.2009 | Methanol |
| | | 22 | 01.07.2010 | Methanol |
| | | 29 | 31.05.2011 | Methanol |
| | | 33 | 08.06.2012 | Methanol |
| Justin | 1984 | 23 | 01.07.2010 | Methanol |
| Gautier | 1994 | 24 | 29.06.2010 | Methanol |
| | | 41 | 05.06.2014 | Methanol |
| 328 | 1995 | 30 | 16.06.2011 | Methanol |
| | | 31 | 30.06.2011 | Methanol |
| | | 36 | 27.06.2013 | Methanol |
| | | 37 | 04.07.2013 | Methanol |
| Nathalie | 1994 | 34 | 08.06.2012 | Methanol |
| Delphine | 1994 | 38 | 27.06.2013 | Methanol |
| Paco | 1994 | 39 | 30.06.2013 | Methanol |
| Pascal | 1994 | 43 | 05.06.2014 | Methanol |
| 365 | 1995 | 44 | 12.06.2014 | Methanol |

Tableau 1 : Récapitulatif des éjaculats étudiés

II.2.2 Décongélation et mesures standard sur les spermatozoïdes

La préparation des échantillons, et les caractérisations standard ont été réalisées du 7 au 22 mars. La décongélation des paillettes a été effectuée par trempage dans un bain marie (6 sec

à 40°C). Une fois décongelées, les semences sont conservées en tubes Ependorf à une température de 4°C, sur lit de glace.

Une cellule de numération Burkner a été utilisée pour le calcul des concentrations. Les comptages ont été effectués sous microscope à contraste de phase (grossissement 200)

Les mesures de motilité (pourcentage de cellules motiles et durée d'activation) ont été réalisées avec un microscope à contraste de phase négatif et une caméra digitale.

Le pourcentage de motilité initiale a été mesuré juste après l'activation (T0). La durée d'activation correspond à la durée maximale observée. Des enregistrements vidéo ont été faits pour permettre une analyse ultérieure des autres paramètres de cinétique de motilité.

II.2.3 Production de gamètes pour tests de pouvoir fécondant

Pour tester le pouvoir fécondant des semences congelées, il est nécessaire de comparer les résultats à des fécondations réalisées avec des gamètes fraîchement récoltés, qui serviront de référence.

Compte tenu de l'absence de disponibilité d'ovocytes d'esturgeon européen, notre choix s'est porté vers une autre espèce pour la production de gamètes en frais. Les Acipenseriformes se caractérisent par une grande capacité à l'hybridation. Nous avons choisi le sterlet (*Acipenser ruthenus*), qui avec l'esturgeon européen appartient au même « groupe » : diploïdes, avec un nombre de chromosome proche de $2n=120$ (Havelka *et al.*, 2011). Des croisements similaires ont déjà été réalisés dans le passé (Horvath *et al.*, 2011) conduisant à la production d'hybrides.

Les 7 et 8 mars des géniteurs de sterlet (7 femelles et 3 mâles) ont été regroupés dans des bassins de ponte. Les femelles ont été biopsiées le 12 mars pour vérifier leur aptitude à la reproduction.

Trois femelles ont répondu favorablement au biotest de maturation *in vitro* des ovocytes (Goncharov *et al.*, 2009; Chèvre *et al.*, 2016). Elles ont été présélectionnées (femelles N°3419531/581, 3423006 et 3420449). Le résultat du biotest pour les 4 autres femelles ne permettait pas de les retenir. Afin d'avoir un nombre suffisant de femelles, 4 femelles ont été prélevées au hasard dans le cheptel pour tenter d'avoir quelques individus matures supplémentaires. Ces femelles (N° 3420287, 3420198, 3420469, 3919675) ont été utilisées sans vérification de leur état de maturité.

Les 7 femelles ainsi que les 4 mâles ont été stimulés à la LHRHa le 27 mars (Chèvre *et al.*, 2016).

Le contrôle de l'état des géniteurs et les collectes des gamètes ont démarré le 30 mars à partir de 8h.

Deux mâles sur 4 ont donné de la semence (N° 17445 et 18577), et les 7 femelles ont produit des ovocytes. Seules 2 femelles (N° 3420449 et 3420198) dont l'ovulation semblait la plus avancée car expulsant facilement leurs ovocytes par massage abdominal ont été prélevées. Ainsi 2 lots d'ovocytes de respectivement 257 et 307 g ont été récupérés et mélangés pour utilisation dans les tests de pouvoir fécondant.

II.2.4 fécondation avec du sperme congelé et taux de fécondation

Une sélection a été opérée sur les échantillons à analyser d'esturgeon européen.

Seuls les éjaculats présentant un taux de motilité initiale après décongélation au moins égal à 10 % (à l'exception de la semence de « Philippe », dont le taux n'était pas connu à l'avance) ont été retenus. Cela représentait 32 échantillons différents à tester.

Les fécondations ont été réalisées en tubes plastiques de diamètre 35 mm, et les incubations dans des boîtes de Petri placées dans un incubateur vertical thermorégulé. Chacun des 32 échantillons a été testé en duplicat le 29 mars. La procédure de fécondation a été la suivante :

- Un gramme d'ovocytes de sterlet (moyenne estimée de 75 ovocytes au g), a été placé dans un tube de fécondation ;
- Ajout d'un volume de semence d'esturgeon européen, calculé pour avoir 100 000 spermatozoïdes par ovocyte ; (indépendamment du taux observé de spermatozoïdes motiles)
- ajout de 4 ml d'eau.

Deux contrôles en duplicat ont été également réalisés, avec des ovocytes et semence fraîche de sterlet.

L'incubation des œufs fécondés a été réalisée en boîte de Petri à 15°C dans l'incubateur air vertical. L'eau de chacune des boîtes a été changée 2 fois par jour pendant toute la durée de l'incubation (du 29 mars au 8 avril).

Le taux de fécondation et développement des embryons a été suivi jusqu'à l'éclosion des larves.

3 personnes ont été nécessaires pour la réalisation de ce travail :

Deux affectées à la répartition des ovocytes dans les tubes, rinçage et transfert des lots en boîte de Petri ;

Une troisième chargée de la décongélation des paillettes et fécondations.

II.2.5 Analyses cytométriques

Les analyses ont été menées sur 32 échantillons.

Deux types d'analyses ont été réalisés. Le comptage des cellules vivantes et mortes a été effectué par cytométrie en flux ; permettant de calculer un taux de survie. La mesure du contenu en ATP a également été réalisée.

II.3 Résultats

II.3.1 Densité, motilité, durée d'activation

La moyenne des concentrations initiales des semences, proche de 2,1 milliards.ml⁻¹, avec un minimum à 0,1 et un maximum à 9. Cela semble proche des valeurs données par Ginsburg (1968). La moyenne des taux de motilité initiale est proche de 21 % pour les semences congelées avec du méthanol comme cryoprotecteur, et la durée de motilité après activation d'environ 1min 30 s (**Tableau 2**). On observe une variabilité importante des taux de motilité initiale (moyenne des écartypes : 17 ,6 %). Il semble y avoir une baisse des taux de motilité à

partir de 2014 (**Figure 5**), très probablement en relation avec le mauvais état de forme des géniteurs et la baisse de qualité des semences en frais. La faiblesse du nombre d'échantillons congelés ne permet toutefois pas de conclure définitivement.

| | concentration initiale (milliard/ml) | cellules vivantes (%) | Motilité initiale (%) | durée d'activation (sec) |
|----------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|
| min | 0,1 | 42 | 0 | 30 |
| max | 9 | 92,5 | 70 | 180 |
| Moyenne | 2,1 | 75,6 | 20,9 | 95,2 |
| Ecartype | 2,4 | 10,1 | 17,6 | 34,8 |

Tableau 2 : Caractéristiques moyennes des semences congelées avec le méthanol

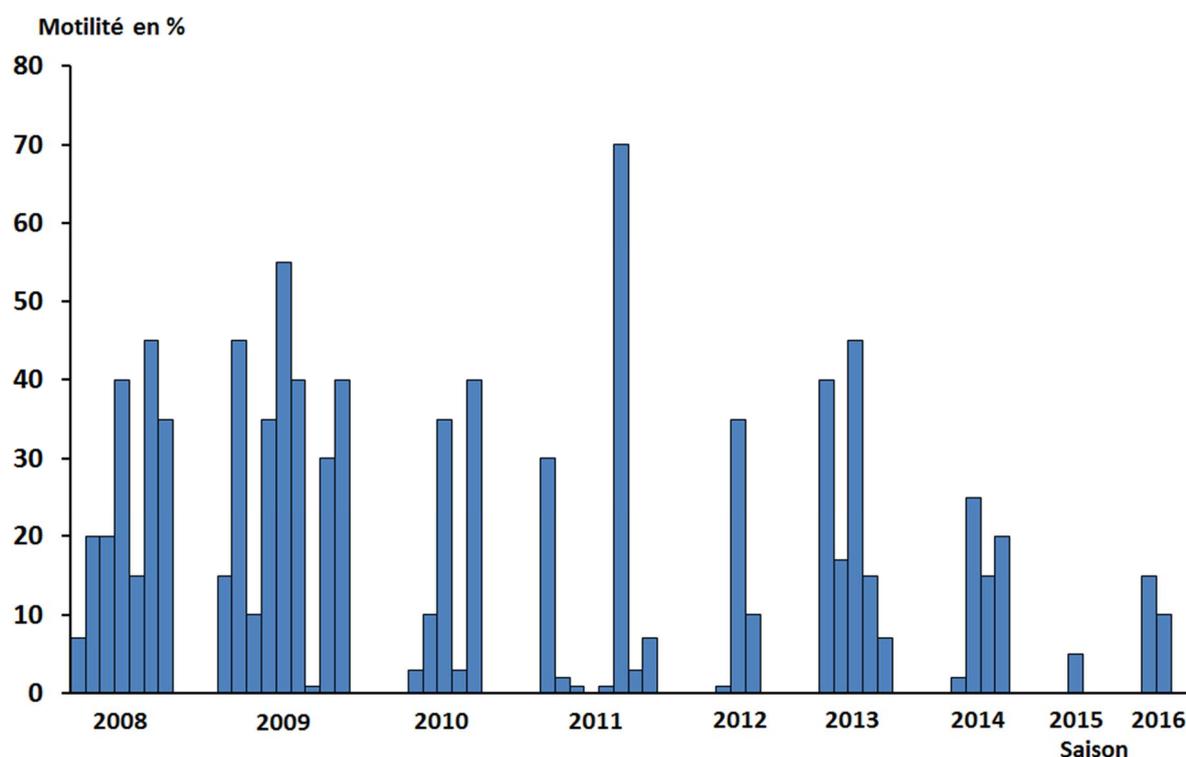


Figure 5 : Evolution des taux de motilité initiale observés par saison de congélation

Pour les 4 semences congelées avec du DMSO, le pourcentage de motilité initiale est très faible, compris entre 1 et 5 %, et la durée d'activation comprise entre 30 et 40 sec.

Pour les mêmes semences avec méthanol, le pourcentage de motilité est compris entre 20 et 45 % et la durée d'activation entre 90 et 150 sec. (**Figure 6**).

On a donc avec le méthanol un pourcentage de motilité fortement augmenté (facteur 17,5) de même que la durée d'activation (facteur 3,4) versus l'utilisation de DMSO.

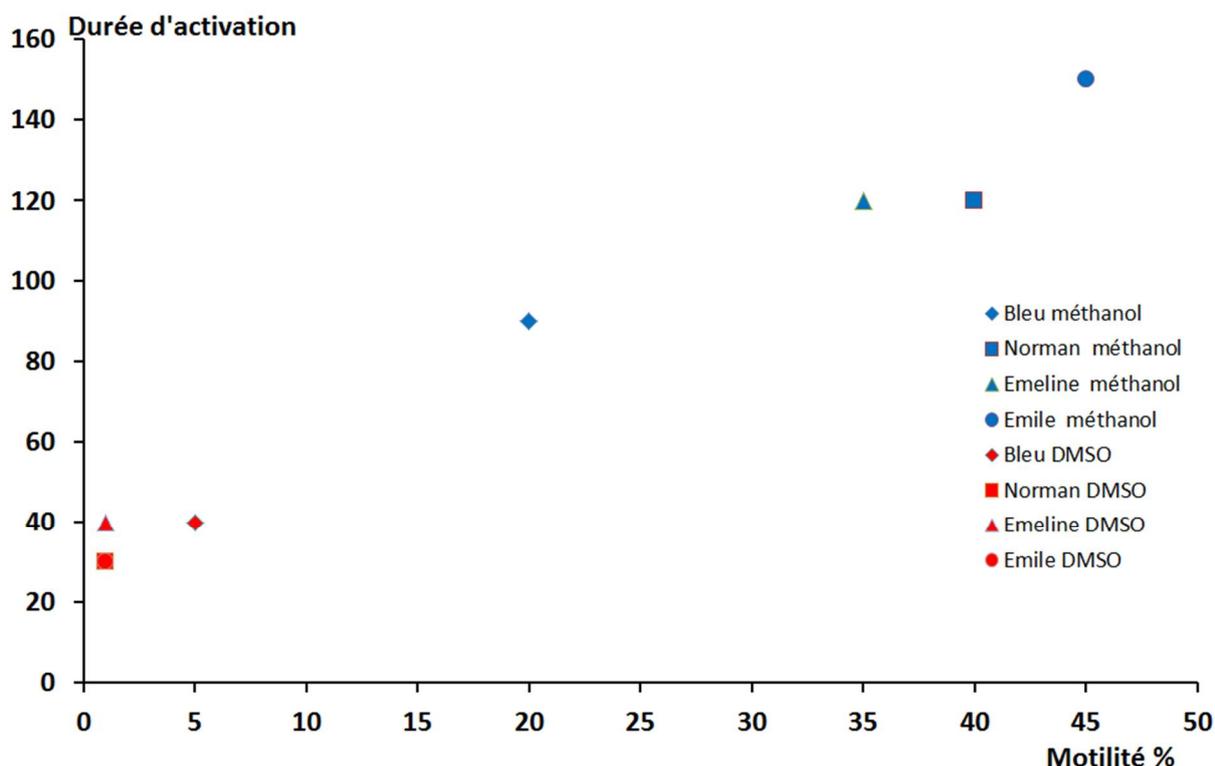


Figure 6 : Relation entre motilité initiale et durée d'activation en fonction du cryoprotecteur utilisé (saison 2008)

II.3.2 Analyse du pouvoir fécondant

Dans les faits, la moyenne du nombre d'ovocytes par échantillon s'est avérée être plus proche de 68. Chaque ovocyte a donc reçu en moyenne 110 300 spermatozoïdes.

Nous avons obtenus des larves sur 37,5% des lots fécondés, soit 12 lots, issus de 9 poissons, sur les 32 testés. (**Tableau 3**).

Les taux d'éclosion des témoins sont proches de 80 %, alors qu'ils varient entre 0 et 21,2 % pour les lots fécondés avec semences congelées. La moyenne des taux d'éclosion pour les lots ayant produit des larves est de 5,8 %.

On n'observe pas de corrélation entre le pourcentage de motilité des semences, lié en partie à la durée de nage, et le taux de production de larves (**Figure 7**). Des semences avec faibles taux de motilité initiale (proches ou inférieurs à 10 %) peuvent permettre la production de larves.

| Nom | cohorte | Cryoprotecteur | N° pois | Date congélation | Taux d'éclosion (%) |
|-----------|---------|----------------|---------|------------------|---------------------|
| Emile | 1994 | Methanol | EOOC | 19.06.2008 | 4,3 |
| Emile | 1994 | Methanol | EOOC | 03.06.2009 | 21,2 |
| Philippe | 1984 | Methanol | OD20 | 30.05.2008 | 4,1 |
| Martinien | 1995 | Methanol | 3FC6 | 16.06.2009 | 2,8 |
| Carol | 1994 | Methanol | E3C4 | 31.05.2011 | 1,4 |
| Carol | 1994 | Methanol | E3C4 | 08.06.2012 | 1,5 |
| Mariette | 1988 | Methanol | OD48 | 05.08.2009 | 2,6 |
| Mariette | 1988 | Methanol | OD48 | 15.07.2010 | 2,7 |
| 338 | 1995 | Methanol | 16B9 | 16.06.2009 | 4,2 |
| Gautier | 1995 | Methanol | 1F1A | 29.06.2010 | 5,5 |
| Herve | 1995 | Methanol | 5AA5 | 29.06.2011 | 7,8 |
| 365 | 1995 | Methanol | | 12.06.2014 | 12,1 |

Tableau 3 : Synthèse des échantillons ayant permis l'obtention de larves

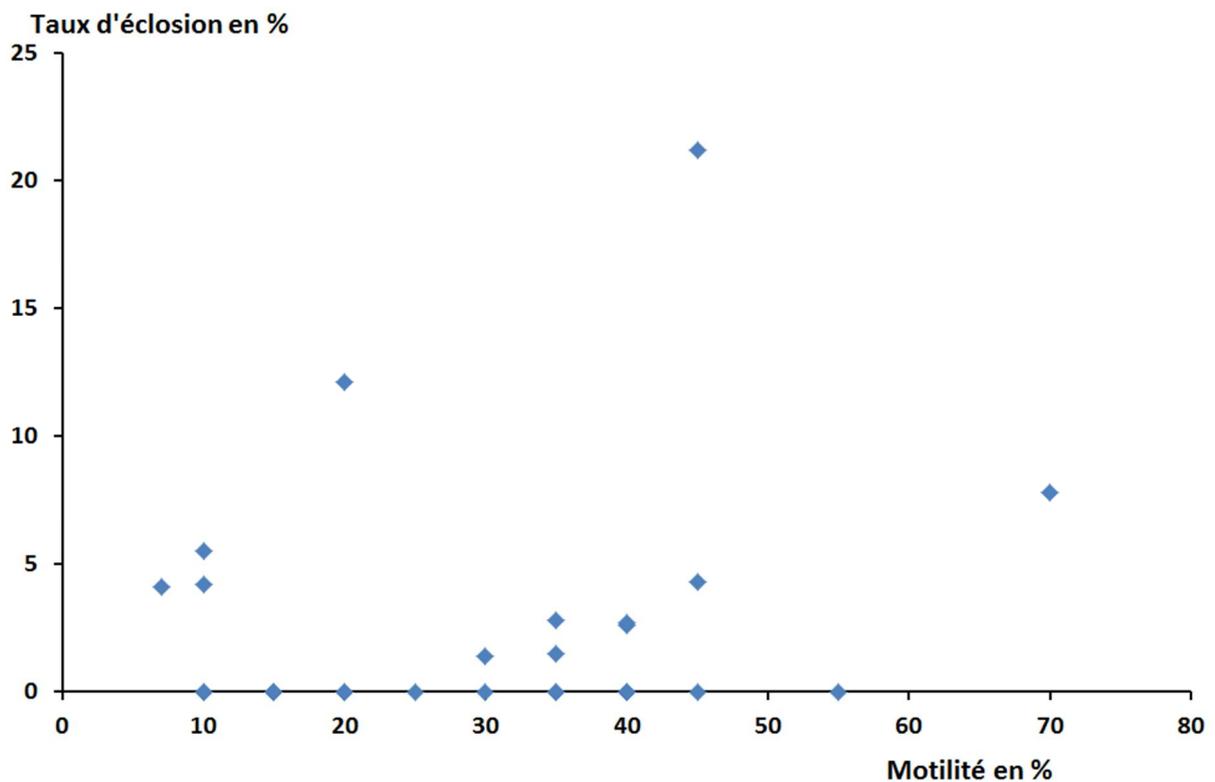


Figure 7 : Relation entre motilité et taux d'éclosion avec les spermés congelés utilisés

II.3.3 Analyses en cytométrie

La moyenne du nombre de cellules vivantes par éjaculat congelé avec du méthanol est de 75,6 %, alors que la moyenne des taux de motilité initiale est de 20,9 %. On a donc un écart très significatif entre cellules vivantes et motiles. Cela semble indiquer qu'environ la moitié des spermatozoïdes gardent intact leur membrane après congélation, mais perdent leur capacité à se déplacer.

La survie des spermatozoïdes congelés avec du DMSO est légèrement plus faible qu'avec du méthanol, environ 60 %.

La concentration en ATP des cellules a été mesurée sur 20 échantillons (**Figure 8**).

Elle varie de 15,9 à 228,4 nmol ATP/10⁹ spz, avec une moyenne à 49,6 (écartype 47,2).

Il n'a pas pu être mis en évidence de corrélation entre le nombre de cellules motiles, la durée d'activation et le contenu en ATP

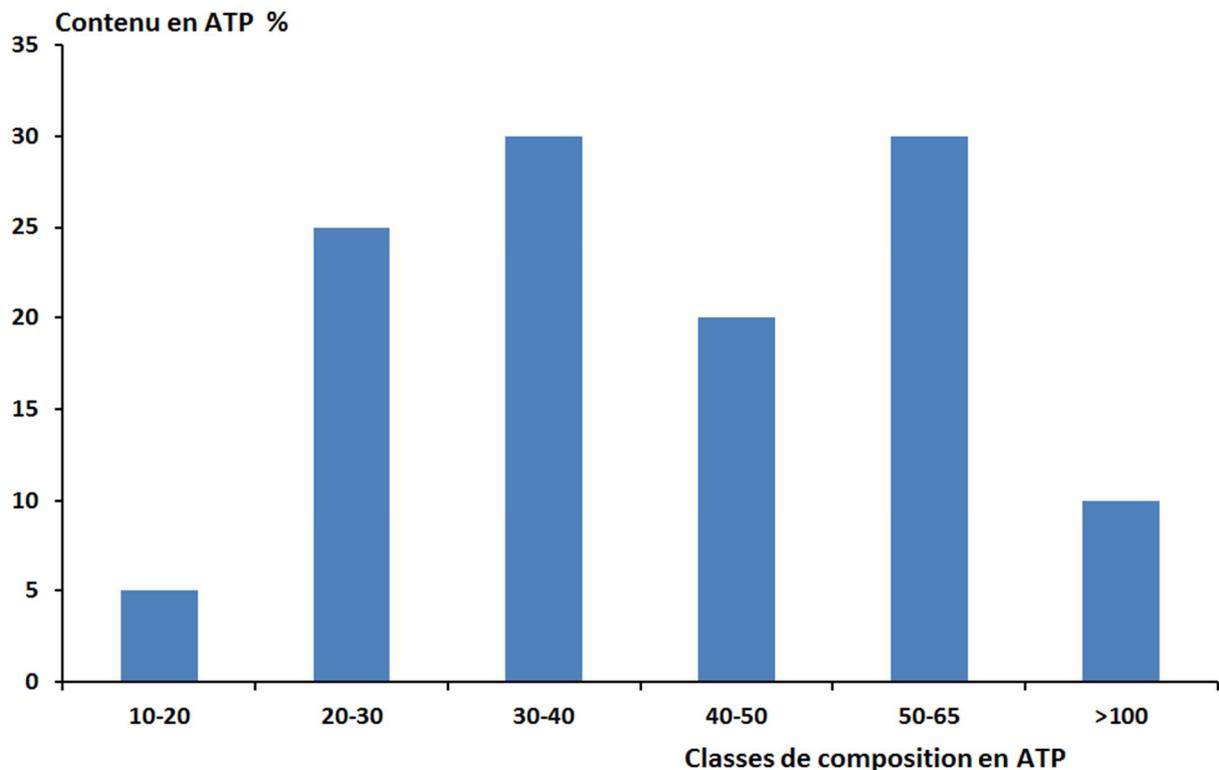


Figure 8 : Distribution des contenu en ATP (nmol/ 10⁹ spz)

II.4 Conclusion :

Ce travail a permis de réaliser un premier état de la qualité des semences congelées d'esturgeon européen présentes dans notre cryobanque. Il n'est pas pour l'instant complet. Il reste en effet 32 échantillons qui n'ont pas été testé (22 éjaculats congelés « anciens » et 10 congelés en 2017) De plus, sur une partie des échantillons utilisés en 2017, il reste à tester le pouvoir fécondant (taux de motilité initiale inférieurs à 10 %). Au total cela représente environ 40 échantillons, ce qui demandera un travail proche de celui déjà réalisé.

Pour l'ensemble des lots, les données issues de l'enregistrement des déplacements (mesures cinétiques) restent à traiter. Il serait également intéressant pour les nouveaux échantillons d'ajouter des analyses de morphologie et de fragmentation d'ADN (l'ensemble étant réalisable avec le système CASA).

Les concentrations de spermatozoïdes enregistrées sur les semences sont assez proches de celles que l'on peut observer sur d'autres espèces d'esturgeon. La moyenne s'établit à 2,1 milliards.ml⁻¹.

Pour 41,3 % des échantillons analysés de 2008 à 2013, la motilité initiale est supérieure ou égale à 30 %. La moyenne des taux de motilité est proche de 21 % pour l'ensemble des semences observées congelées avec du méthanol. On a un fort écartype (proche de 18 %) qui indique une grande variabilité des résultats. Cela semble lié principalement à la variabilité de la qualité des semences des différents mâles, plus qu'aux méthodologies employées pour les congélations. On peut en effet observer le même jour et pour la même congélation un bon résultat pour un mâle et un mauvais pour un autre.

Nous ne disposons que de très peu de séries chronologiques, mais certains mâles comme Carol, Mariette, Emile semblent conserver de bon « scores » (taux élevés de motilité au cours des saisons). On trouve à contrario des mâles qui ne montrent le plus souvent que des mauvais résultats. C'est le cas pour le mâle 328, dont la moyenne des taux de motilité mesurée sur 3 années n'est que de 9%. Cela peut expliquer en grande partie les moins bons résultats obtenus en 2011 (2 éjaculats issus de 328 analysés).

A partir de 2014 une tendance à la baisse de la qualité des semences congelées semble se dégager. Cette baisse de qualité pourrait être probablement une conséquence du mauvais état des géniteurs (réduction de la prise alimentaire et mortalités observées). Néanmoins, cette observation est biaisée par le faible nombre d'échantillons testés pour les saisons 2015 et 2016. De plus certains éjaculats de bonne qualité obtenus ces 2 années n'ont, soit pas été congelés, soit pas été retenus dans les éjaculats à tester.

Du DMSO a été utilisé en 2008 (première saison de congélation) pour des tests comparatifs limités chez l'esturgeon sibérien et l'esturgeon européen. Ce cryoprotecteur entraîne une augmentation de la pression osmotique du liquide séminal. Cela semble augmenter les chances de survie des cellules, mais diminuer les capacités de fertilisation par une action négative sur l'acrosome (Horvath *et al.*, 2006; Psenicka *et al.*, 2008).

Dans notre cas, le DMSO a eu un impact négatif pour les 4 échantillons observés. Les résultats de cytométrie montrent que la survie est partiellement affectée, mais on a par contre une baisse très significative du pourcentage de motilité (2 % contre 35 %) et du temps d'activation (facteur 4).

Seulement 12 des 32 semences congelées testées pour le pouvoir fécondant ont donné des résultats positifs (Soit 37,5 % des semences). Ce résultat est en parti lié à la procédure de fécondation utilisée, qui ne tient pas compte du pourcentage de motilité et réalisée avec volume constant d'eau (4 ml). Pour 29 % des échantillons ce vol d'eau a dépassé de 150 à 790 % le besoin théorique (200 fois le volume de semence utilisé). Aucune relation significative n'a été mise en évidence entre survie, pourcentage de motilité, énergie, durée d'activation et nombre de larves produites. Il convient de poursuivre l'analyse à partir d'un plus grand nombre d'échantillons et en intégrant les indicateurs cinétiques qui restent à étudier. A ce stade, il faut donc donner la priorité au test du pouvoir fécondant pour l'évaluation de la qualité de nos semences. Il ne doit pas se limiter aux semences ayant un taux de motilité initiale élevé. Cela est d'autant plus important que l'objectif recherché n'est

pas forcément la production d'un grand nombre d'animaux, mais de quelques individus pour la sauvegarde d'un patrimoine génétique rare.

La méthodologie utilisée pour l'analyse du pouvoir fécondant a été établie pour permettre des comparaisons entre éjaculats dans le cadre d'une étude. Elle doit être adaptée dans une optique de production de larves. Il est nécessaire de trouver le meilleur ratio volume d'eau, volume de semences et quantité d'ovocytes à utiliser. Les premiers résultats obtenus dans l'étude (survie, concentrations) permettent d'orienter les choix et de faire du cas par cas. Pour optimiser les résultats, différents dilueurs (pour nettoyage des ovocytes et activation des spermatozoïdes) sont également à tester. Cela va demander des tests préliminaires qu'il est préférable de réaliser à partir de semences issues de poissons de moindre valeur génétique.

La fiabilisation des procédures d'analyse des semences et de congélation sont déterminantes pour le succès des reproductions. Il peut y avoir une grande variabilité dans l'acquisition des données (pourcentage de motilité) lorsqu'elles sont obtenues par observations visuelles. L'achat en 2017 d'un système d'analyse automatique des semences (CASA) devrait permettre de progresser en matière d'acquisition et de traitement des données.

Pour la congélation des semences nous utilisons un congélateur non programmable (absence de contrôle de la gestion thermique). Ce type de matériel est le plus souvent employé en recherche, mais ne garantit pas toujours un bon niveau de reproductibilité des procédures. Notre modèle est toutefois particulier (cuve inox avec parois isolantes), différent des simples boîtes en polystyrène. Il a été mis au point et éprouvé par une société spécialisée (IMV). Il semble que les différences observées dans les résultats de notre étude (pourcentage de motilité) soient plus liées à la variabilité de la qualité des semences en frais qu'à des aléas méthodologiques. Nous avons toutefois prévu la construction en 2018 d'un local spécifique dédié aux semences, avec environnement contrôlé et matériel spécifique (table réfrigérée) qui devrait permettre de fiabiliser nos pratiques.

Chapitre III : Qualité des semences en 2017 (Action 23)

Bons S., Chèvre P.

III.1 Introduction

Objectifs

La vérification de la qualité des semences fraîches pour tous les mâles d'esturgeon européen a pour objectif de sélectionner les mâles qui participeront à la fécondation des femelles. Il s'agit également de déterminer les critères pour sélectionner une semence de bonne qualité dans le but de constituer une banque de sperme.

Intérêts

Il s'agit d'optimiser la survie des croisements en utilisant une bonne qualité de semences pour produire des œufs et des larves destinés au repeuplement et à la conservation d'un stock captif.

III.2 Matériels et méthodes

La pré-sélection des géniteurs a été réalisée le 03 et 04 mai 2017, environ un mois avant la période de reproduction, généralement de fin mai à juillet (Williot *et al.*, 1997). Le choix des mâles se fait par échographie. L'échographie permet de déterminer le stade de maturation. Les échographies ont permis de sélectionner 17 mâles, répartis de la manière suivante :

- 4 issus des cohortes 84 à 95
- 8 issus des juvéniles « 4 ans eau saumâtre »
- 4 issus des juvéniles « 6 mois eau saumâtre »
- 1 juvénile eau douce

Pour les vieux géniteurs, seuls les mâles jugés « bon » à l'échographie et dont le poids était supérieur ou égal à celui de mai 2016, ont été sélectionnés. Sur les 4 sélectionnés, 2 n'ont pas été retenus car nous disposons d'une grande quantité de leur sperme dans la banque de spermes cryoconservés.

Quinze mâles ont donc été présélectionnés. Ils ont été répartis le 18 mai dans le bâtiment Sturio 1, pour la préparation à la phase finale de maturation (montée en température, passage en eau douce).

La veille du prélèvement, les poissons reçoivent une injection d'hormone, la LHRH éthylamide acétate hydrate (Luteinising Hormone-Releasing Hormone), à une dose de 30 µg/kg, dans le but de déclencher la spermiation. L'injection est faite dorsalement juste en arrière de la tête dans les muscles pour que l'hormone agisse plus rapidement au niveau du cerveau. Cette hormone stimule l'activité de frai chez les poissons.

Vingt-quatre heures après l'injection, la semence est collectée à l'aide d'un tube en silicone (5 mm de diamètre) désinfecté et sec pour éviter d'activer la semence, que l'on a inséré dans l'orifice urogénital (**Figure 9**). La semence est récoltée par gravité ou par un léger massage abdominal dans un bécher gradué, sec et propre pour les mêmes raisons que précédemment.



Figure 9 : Prélèvement de sperme chez *A. sturio* (© Ph Jatteau - ML. Acolas, Irstea)

Une fois la semence prélevée, il faut juger de sa qualité selon deux critères : la motilité selon l'échelle de motilité de Sanchez-Rodriguez et Billard (1977) établie pour la truite arc-en-ciel (**Tableau 4**) et la survie en pourcentage pendant 3 minutes 30. Pour cela, la semence a été activée avec un activateur permettant d'optimiser la motilité en gardant une méthode simple, rapide et peu coûteuse et présentant un risque d'erreur la plus faible. C'est pour ces raisons que l'eau a été utilisée.

Tableau 4 : Echelle de motilité d'après Sanchez-Rodriguez & Billard (1977)

| | |
|-----------|---|
| 0 | Spermatozoïdes tous immobiles |
| 1 | Agitation sur place de nombreux spermatozoïdes |
| 1+ | Agitation sur place de nombreux spermatozoïdes. Quelques-uns se déplacent rapidement |
| 2 | Quelques-uns se déplacent rapidement (20%). La plupart présentent soit des mouvements progressifs lents soit une agitation sur place. |
| 2+ | Plus de 20% des spermatozoïdes se déplacent activement |
| 3 | Spermatozoïdes à mouvements progressifs rapides ou lents (50%) et des mouvements oscillatoires sans déplacement (50%) |
| 3+ | Spermatozoïdes à mouvements progressifs rapides ou lents supérieurs à 50% |
| 4 | Déplacements progressifs de la plupart des spermatozoïdes (80%). Certains restent visibles car déplacements lents |
| 4+ | Seuls quelques spermatozoïdes présentent des déplacements lents |
| 5 | Tous les spermatozoïdes se déplacent vigoureusement. Impossible de fixer la vue sur aucun d'entre eux |



Figure 10: observation de la qualité des semences chez *A. sturio* (© Ph Jatteau, Irstea)

Matériel nécessaire à l'observation de la semence fraîche :

- pipette 0-10 μ L + embouts
- pipette 20-200 μ L + embouts
- Lames
- Lamelles
- Microscope optique

Méthode d'observation (**Figure 10**) :

- Mélanger la semence et prélever 1 μ L. Déposer sur une lamelle et vérifier la motilité spontanée.
- Ajouter 50 μ L eau de forage (activateur) en déclenchant le chronomètre (homogénéiser avec l'embout de la pipette. Mettre une lamelle et observer à un grossissement X400.
- Relever la survie et la motilité toutes les 30 secondes et pendant 4 min.
- Ajuster s'il le faut les quantités et l'objectif pour observer environ 100 spermatozoïdes (si trop concentré utiliser 0,5 μ L de semence, si pas assez concentré regarder avec un objectif plus petit). Ne pas diminuer la quantité d'activateur pour ne pas sous-estimer la motilité.

Changer les embouts des pipettes entre chaque prélèvement

Le pH du sperme est également mesuré (**Figure 11**)

Les paramètres de motilité et de survie permettent de classer les semences fraîches en 4 catégories (**Tableau 5**).



Figure 11 : Mesure du pH du sperme chez *A. sturio* (© Ph Jatteau, Irstea)

Tableau 5 : Critères pour le classement des semences en 4 catégories

| Motilité initiale | Taux de Survie initial (%) | Motilité 60s | Taux de Survie 60s (%) | Temps survie 5% (s) | Qualité de la semence |
|-------------------|----------------------------|--------------|------------------------|---------------------|--------------------------|
| 5 | 95-100 | 5 | 80 | > 210 | Très Bonne |
| 5 | 90-100 | 3-4 | ≤80 | ≥ 150 | Bonne |
| 4-5 | 90-100 | 3-4 | 50-60 | 150-180 | Moyenne |
| ≤ 5 | ≤95-100 | ≤ 3 | ≤ 60 | ≤ 150 | Mauvaise à très Mauvaise |

III.3 Résultats et Discussion

Pour l'année 2017, aucune série de reproduction assistée n'a eu lieu sur la station d'expérimentation de Saint Seurin sur l'Isle en raison de l'absence de maturation des femelles.

Dès le 18 mai un groupe de 15 mâles a été placé en eau douce, en prévision de prélèvement de semences pour réaliser d'éventuelles cryoconservations.

Les 15 mâles ont été transférés dans Sturio 1 le 18 mai, et répartis en 4 lots (**Tableau 6**).

Deux lots sont composés d'un « vieux mâle » et de 4 juvéniles 2007 en eau saumâtre depuis 4 ans. Un 3^{ème} lot est composé de 2 juvéniles 2007 et 2 de 2008 en eau saumâtre depuis 6 mois.

Le dernier lot correspond au juvénile « eau douce » qui a été stabulé à part. Il a été traité le 29 juin, en même temps que le lot 3.

Les poissons ont été injectés le 5 juillet au matin, avec une montée en température de 14,5 à 17,6°C sur 36 heures.

Tableau 6 : Sélection des différents mâles en 2017

| Date | Nom des mâles |
|---------|---|
| 13 juin | Martinien, 3220207, 3220132, 3219601, 88087 |
| 20 juin | 32599890, 63917, 3255270, 3219650 |
| 29 juin | 3219872, 3220233, Bleu, 3207482, 3219689, 3220003 |

III.3.1 Prélèvement du 13 juin 2017

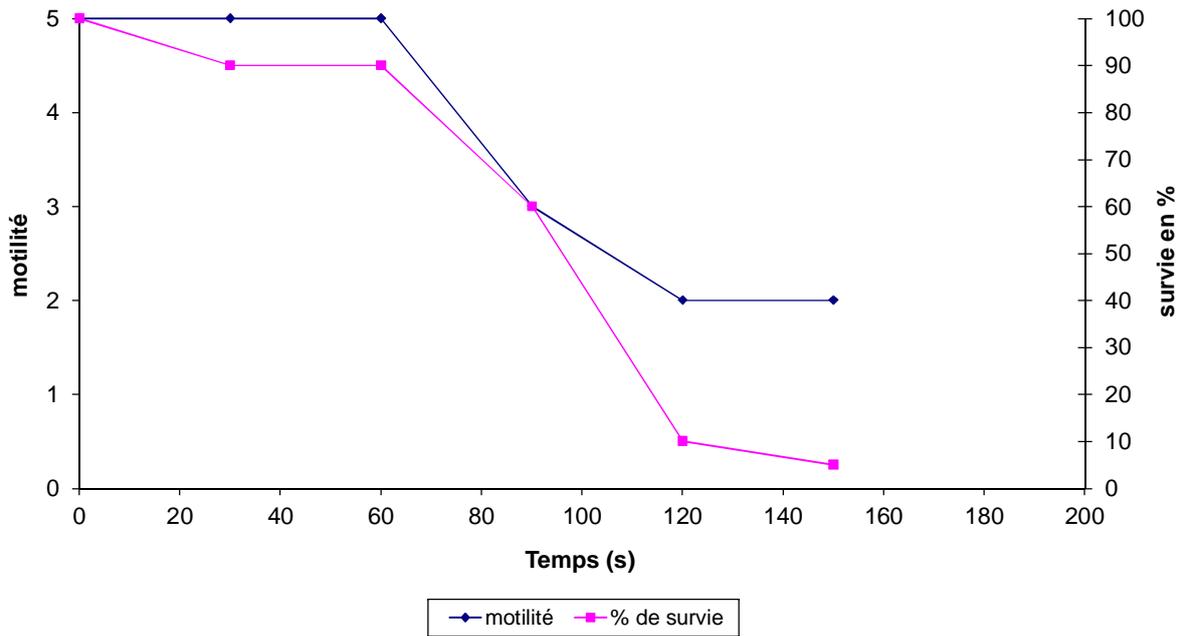
Cinq mâles (Martinien, 3220207, 3220132, 3219601, 88087) ont été injectés le 12 juin 2017 au matin. Au cours de la matinée du 13/06/17, ces 5 mâles ont été prélevés (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Données du sperme collecté pour chaque mâle le 12/06/17

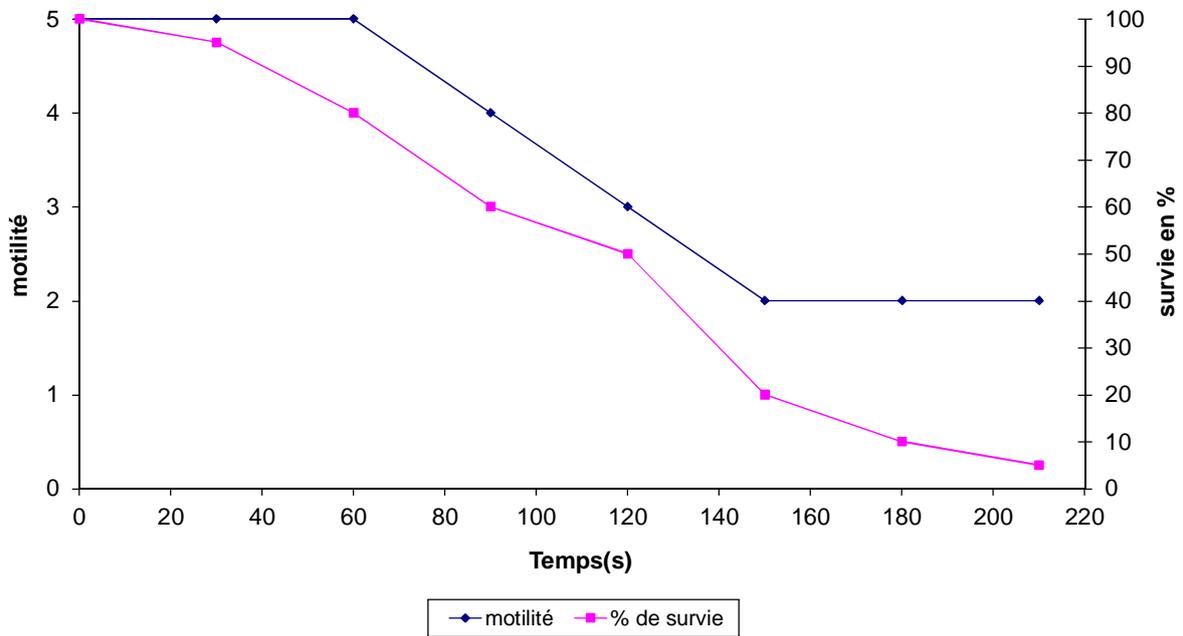
| Nom mâle | Volume de sperme collecté | Aspect | pH Sperme | Motilité spontanée |
|-----------|---------------------------|--------|-----------|--------------------|
| Martinien | 130 | normal | 7,68 | 0 |
| 3220207 | 100 | normal | 8,22 | 0 |
| 3220132 | 200 | normal | 7,95 | 0 |
| 3219601 | 150 | clair | 7,74 | 0 |
| 88087 | 120 | normal | 7,95 | 0 |

Les résultats des observations microscopiques sont les suivants (**Figure 12**)

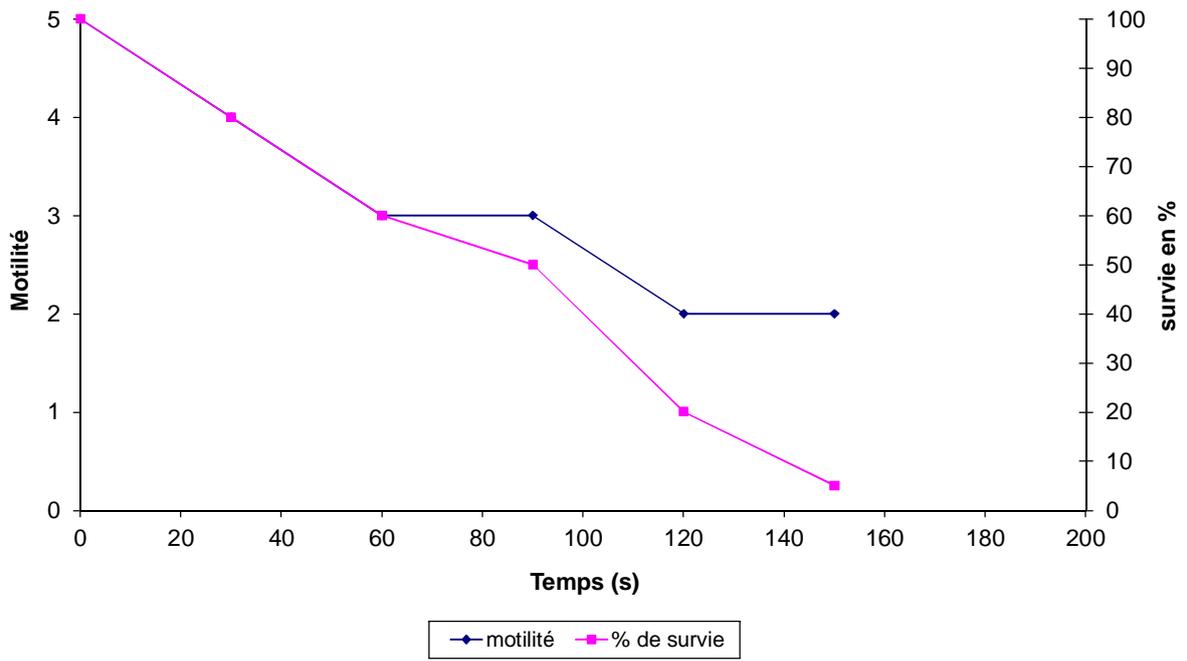
Martinien



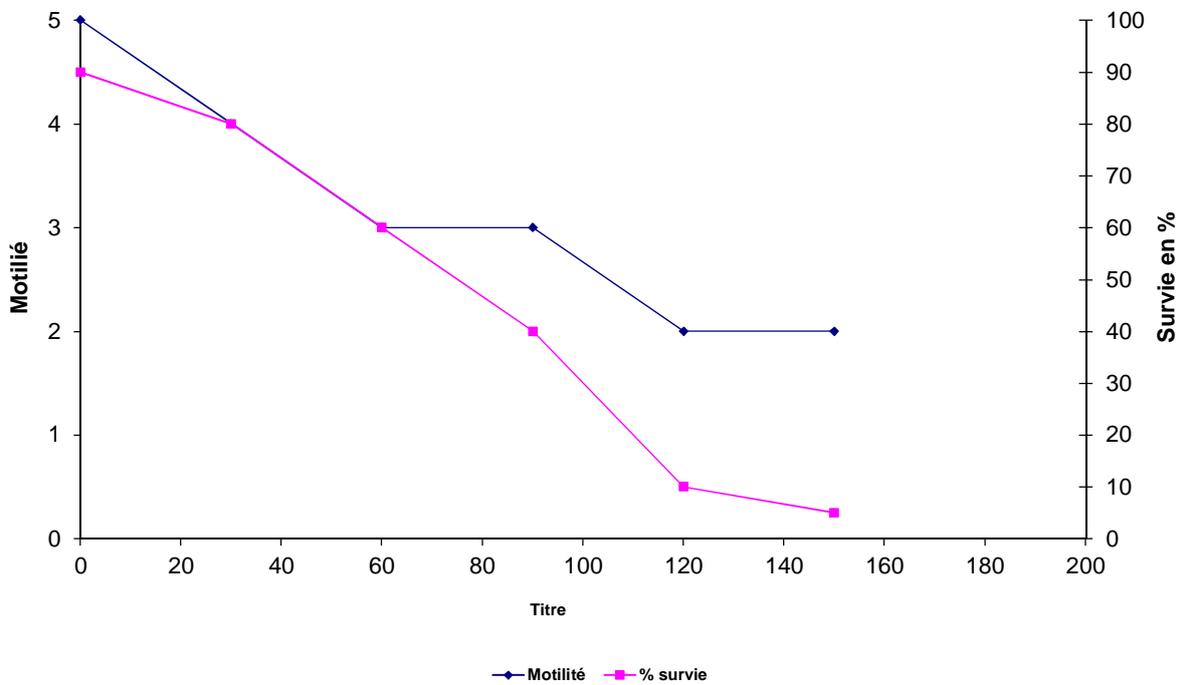
3220207



3220132



3219601



88087

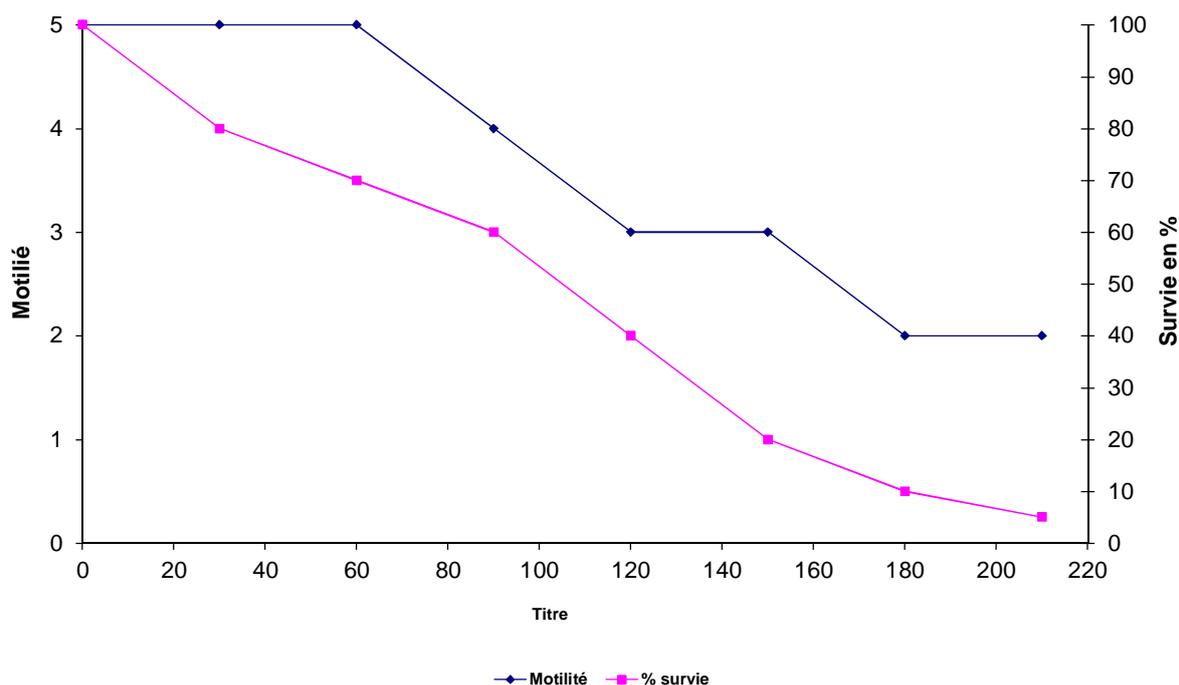


Figure 12 : Résultats des motilités et des taux de survie des spermatozoïdes des mâles Martinien, 3220207, 3220132, 3219601, 88087 le 13 juin 2017. La motilité est indiquée en bleu et la survie en rose.

Les résultats d'évaluation de la qualité des semences de ces 4 mâles sont synthétisés dans le (Tableau 8).

Tableau 8 : Evaluation de la qualité des semences du 13 juin 2017

| Nom | A T ₀ | | A 60 s | | Final | | | Qualité |
|-----------|------------------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|------------|
| | Motilité | Survie | Motilité | Survie | Motilité | Survie | Temp sec | |
| Martinien | 5 | 100 | 5 | 90 | 2 | 5 | 150 | Bonne |
| 3220207 | 5 | 100 | 5 | 80 | 2 | 5 | 210 | Très Bonne |
| 3220132 | 5 | 100 | 3 | 60 | 2 | 5 | 150 | Moyenne |
| 3219601 | 5 | 90 | 3 | 60 | 1 | 5 | 150 | Moyenne |
| 88087 | 5 | 100 | 5 | 70 | 2 | 5 | 210 | Bonne |

On peut donc en conclure que les meilleures semences pour ces 5 mâles sont 3220207, Martinien et 88087 avec des semences respectives de très bonne à bonne qualité.

On aurait donc pu sélectionner 3 mâles (Martinien, 3220207 et 88087) pour une reproduction et éventuellement les 2 autres mâles de qualité moyenne en cas de croisement génétique intéressant.

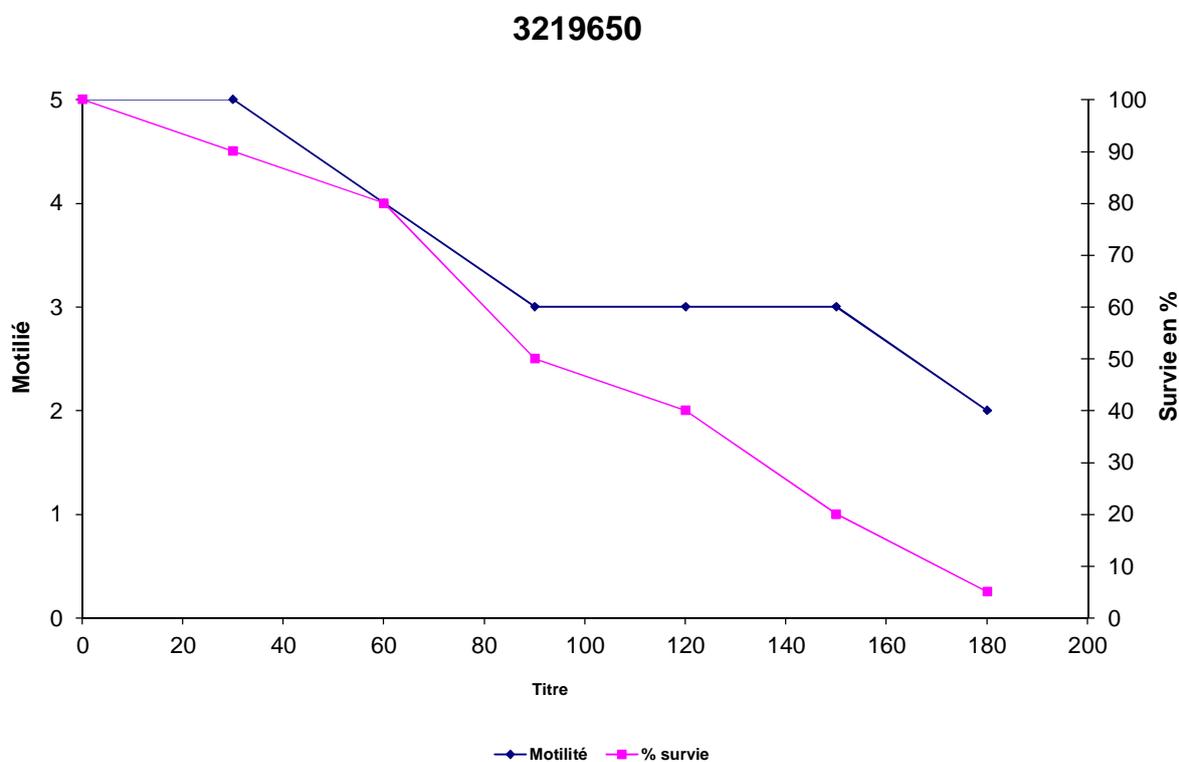
III.3.2 Prélèvement du 20 juin 2017

Quatre mâles (32599890, 63917, 3255270, 3219650) ont été injectés le 19 juin 2017 au matin. Au cours de la matinée du 20/06/17, ces 4 mâles ont été prélevés (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Données du sperme collecté pour chaque mâle le 20/06/17

| Nom mâle | Volume de sperme collecté | Aspect | pH Sperme | Motilité spontanée |
|----------|---------------------------|---------------------|-----------|--------------------|
| 32599890 | 50 | Très clair, limpide | 5,89 | 0 |
| 63917 | 50 | clair | 6,72 | 0 |
| 3255270 | 200 | normal | 7,31 | 0 |
| 3219650 | 150 | Très concentré | 7,35 | 0 |

Les résultats des observations microscopiques sont les suivants (**Figure 13**)



3255270

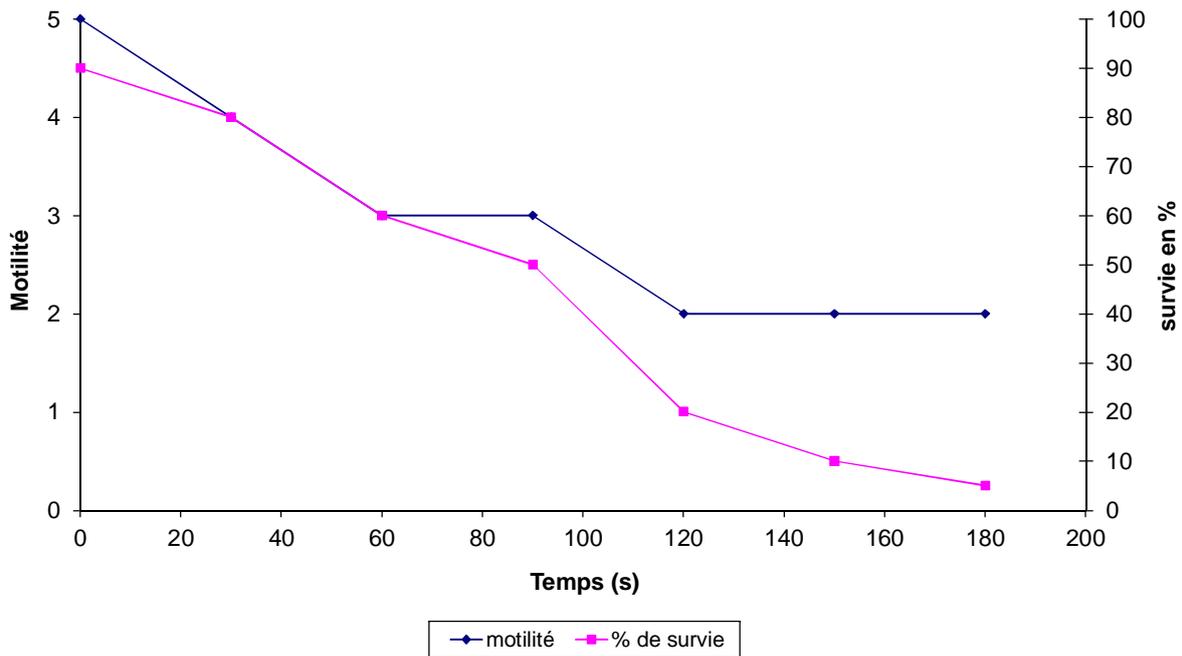


Figure 13 : Résultats des motilités et des taux de survie des spermatozoïdes des mâles 3255270 et 32119650 le 20 juin 2017. La motilité est indiquée en bleu et la survie en rose.

Les résultats d'évaluation de la qualité des semences de ces 4 mâles sont synthétisés dans le (Tableau 10).

Tableau 10 : Evaluation de la qualité des semences du 20 juin 2017

| Nom | A T ₀ | | A 60 s | | Final | | | Qualité |
|----------|------------------|--------|----------|--------|----------|--------|--------|---------|
| | Motilité | Survie | Motilité | Survie | Motilité | Survie | Temp s | |
| 32599890 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 63917 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 3255270 | 5 | 90 | 3 | 60 | 2 | 5 | 180 | Moyenne |
| 3219650 | 5 | 100 | 4 | 80 | 1 | 5 | 180 | Bonne |

On peut donc en conclure que pour ces 4 mâles nous avons seulement une semence de bonne qualité (3219650) et une semence qualité moyenne (3255270).

Pour les autres mâles (32599890 et 63917) nous avons une semence qui était inactive dès le début.

On aurait donc pu sélectionner le mâle 3219650 pour une reproduction et éventuellement le mâle 3255270 de qualité moyenne en cas de croisement génétique intéressant.

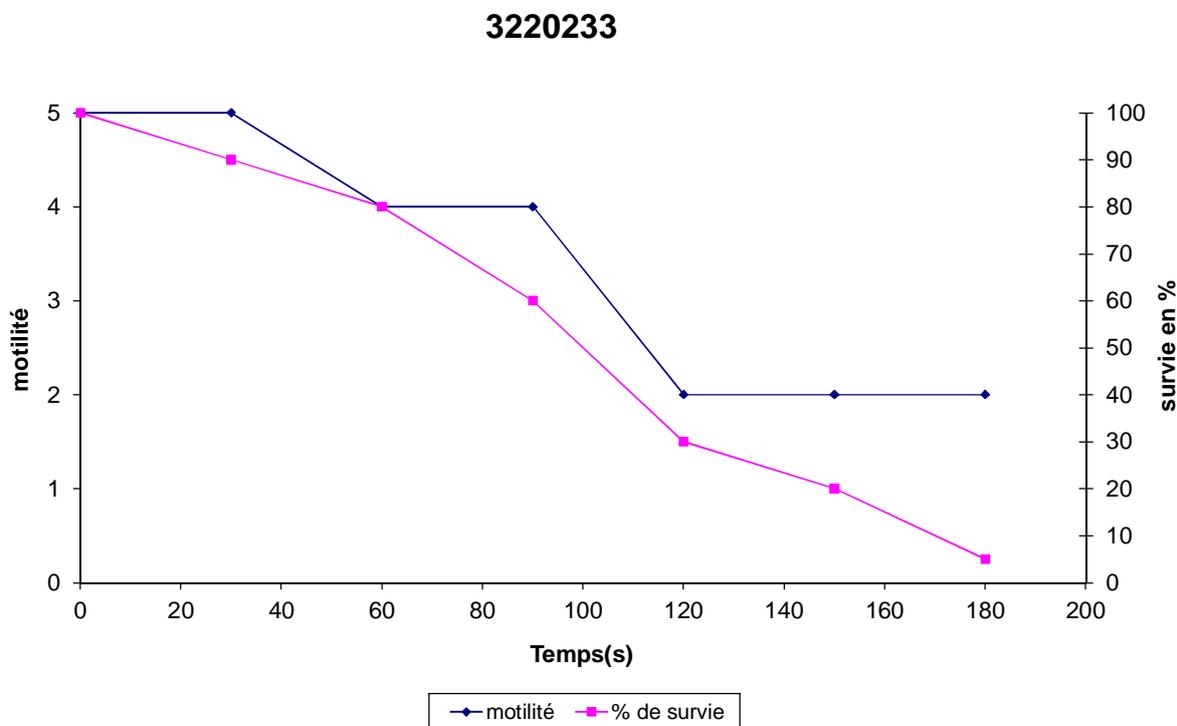
III.3.3 Prélèvement du 29 juin 2017

Six mâles (3219872, 3220233, Bleu, 3207482, 3219689, 3220003) ont été injectés le 28 juin 2017 au matin. Au cours de la matinée du 29/06/17, ces 6 mâles ont été prélevés (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Données du sperme collecté pour chaque mâle le 29/06/17

| Nom mâle | Volume de sperme collecté | Aspect | pH Sperme | Motilité spontanée |
|----------|---------------------------|-----------------|-----------|--------------------|
| 3219872 | 30 | limpide | 6,86 | 0 |
| 3220233 | 200 | concentré | 7,87 | 0 |
| Bleu | 300 | normal jaunâtre | 7,84 | 0 |
| 3207482 | 20 | limpide | 5,72 | 0 |
| 3219689 | 200 | normal | 8,25 | 0 |
| 3220003 | 5 | limpide | 7,58 | 0 |

Les résultats des observations microscopiques sont les suivants (**Figure 14**)



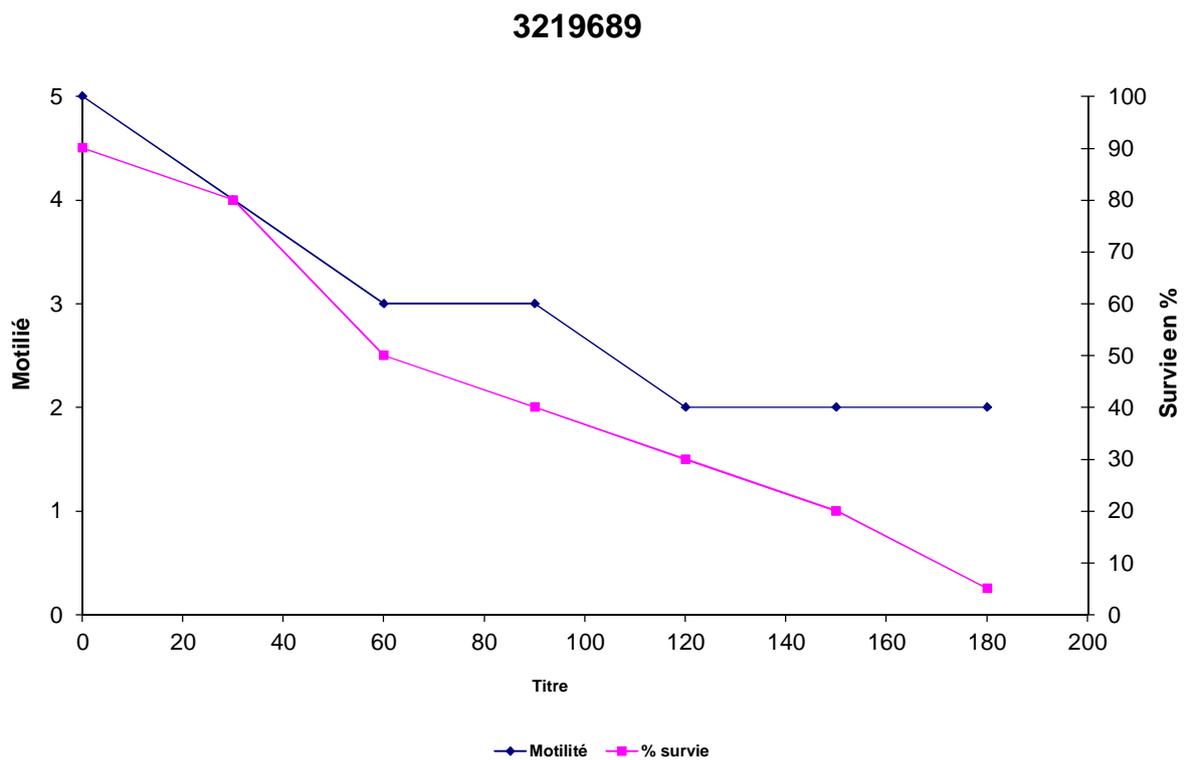
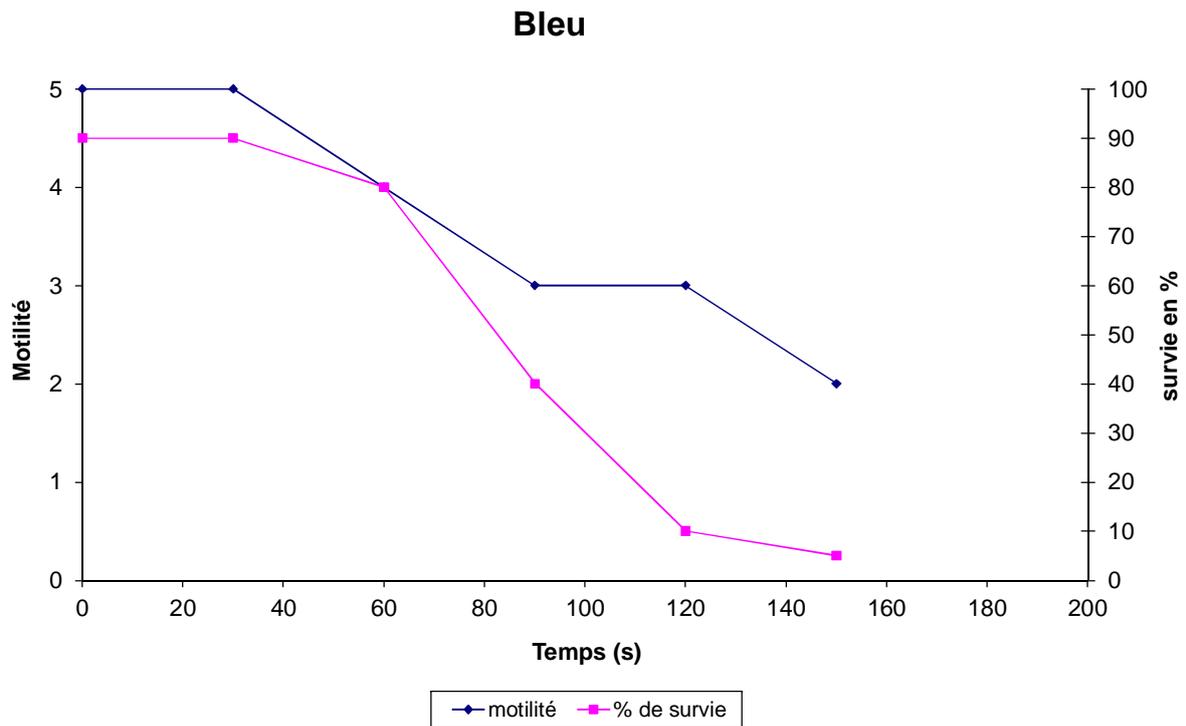


Figure 14 : Résultats des motilités et des taux de survie des spermatozoïdes des mâles 3220233, Bleu et 3219689 le 29 juin 2017. La motilité est indiquée en bleu et la survie en rose.

Les résultats d'évaluation de la qualité des semences de ces 4 mâles sont synthétisés dans le (Tableau 12).

Tableau 12 : Evaluation de la qualité des semences du 29 juin 2017

| Nom | A T ₀ | | A 60 s | | Final | | | Qualité |
|---------|------------------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|---------|
| | Motilité | Survie | Motilité | Survie | Motilité | Survie | Temp sec | |
| 3219872 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 3220233 | 5 | 100 | 4 | 80 | 2 | 5 | 180 | Bonne |
| Bleu | 5 | 90 | 4 | 80 | 2 | 5 | 150 | Bonne |
| 3207482 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 3219689 | 5 | 90 | 3 | 50 | 2 | 5 | 180 | Moyenne |
| 3220003 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

On peut donc en conclure que pour ces 6 mâles nous avons seulement deux semences de bonne qualité (3220233 et Bleu) et une semence qualité moyenne (3219689).

Pour les autres mâles (3219872, 3207482 et 3220003) nous avons une semence qui était inactive dès le début. Le mâle 322003 était conservé en eau douce, contrairement aux autres qui étaient stabulés en eau saumâtre.

On aurait donc pu sélectionner les mâles 3220233 et Bleu pour une reproduction et éventuellement le mâle 3219689 de qualité moyenne en cas de croisement génétique intéressant.

III.4 Conclusions

Le récapitulatif de la qualité des semences de la saison 2017 est synthétisé dans le tableau (**Tableau 13**).

Contrairement à 2015 voire 2016 (année non significative étant donné le faible nombre de mâles prélevés) où une seule semence de bonne qualité avait été observée sur 13 prélèvements réalisés (7,7% de semence de bonne qualité), nous avons eu en 2017 1 semence de très bonne qualité (3220207) et 5 semences de bonne qualité (Martinien, 88087, 3219650, 3220233 et Bleu) sur 15 semences prélevées, ce qui correspond à 40% de semence de bonne qualité (très bonne semence comprise).

Nous avons eu 26,7 % de semences de moyenne qualité (soit 4 semences) potentiellement utilisable en vue d'une reproduction.

Et contrairement aux années précédentes nous n'avons pas eu de semences de « mauvaise qualité » en tant que telle. En effet nous avons récolté 5 semences qui étaient inactives dès le début (33,3%) donc des semences sans jugement.

La méthode maturation des mâles en eau douce a été conservée à l'identique depuis 2013.

En 2017, on aurait donc pu utiliser 6 semences de bonne qualité pour la fécondation des ovocytes des femelles voire même les 4 semences de qualité moyenne mais l'absence d'ovocytes n'a pas permis de réaliser de tentative de reproduction

artificielle. Avec le grand nombre de mâles prélevés et de semences de bonne qualité ainsi que moyenne, le choix dans les croisements pour garantir la diversité génétique aurait été potentiellement très important.

On peut noter aussi que le mâle ayant une semence de très bonne qualité (3220207) fait partie des 2 mâles ayant le pH du sperme le plus élevé (pH=8,22). Cependant un mâle de moyenne qualité (3219689) a également un sperme avec une valeur de pH élevée (8,25).

Tous les mâles ayant une semence de bonne qualité ont un pH compris entre 7,35 et 7,95.

Tous les mâles ayant une semence de qualité moyenne ont un pH compris entre 7,31 et 8,25.

Tous les mâles ayant une semence inactive dès le début ont un pH compris entre 5,89 et 7,58.

Il paraît difficile d'établir une corrélation entre pH du sperme et qualité de la semence. Cependant on peut dégager une légère tendance (mais qui reste à vérifier), à savoir qu'un pH de sperme se rapprochant de pH=8 donnera une semence majoritairement de bonne qualité.

Fin 2017, nous avons fait l'acquisition d'un logiciel (CASA) permettant de caractériser une semence d'un point de vue motilité et concentration. Il est prévu pour 2018 de tester ce nouveau matériel en parallèle des mesures réalisées au microscope actuellement.

En résumé on peut donc dire que nous avons eu 6 bonnes semences (très bonne comprise) sur 15 prélèvements soit 40% de bonnes semences ce qui est supérieur à 2014 et 2015 avec respectivement 41 et 7,7% de bonnes semences et inférieur à 2013 avec 61% de bonnes semences.

Tableau 13 : Tableau récapitulatif du classement des semences au cours de la saison 2017 et valeurs de pH correspondant.

| | 13 juin | 20 juin | 29 juin |
|---------------------------|---|--|---|
| Très Bonne Semence | 3220207 (pH=8,22) | | |
| Bonne semence | Martinien (pH=7,68), 88087 (pH=7,95) | 3219650 (pH=7,35) | 3220233 (pH=7,87), Bleu (pH=7,84) |
| Semence Moyenne | 3220132 (pH=7,95), 3219601 (pH=7,74) | 3255270 (pH=7,31) | 3219689 (pH=8,25) |
| Semence Inactive | | 32599890 (pH=5,89), 63917 (pH=6,72) | 3219872 (pH=6,86), 3207482 (pH=5,72), 3220003 (pH=7,58) |

III.5 Congélation de semences

La cryoconservation permet la sauvegarde du patrimoine génétique des mâles à long terme. Elle facilite également la diffusion de la génétique et l'optimisation des plans de fécondation. A partir de 2008, une banque de semences a été constituée. Les protocoles utilisés sont ceux élaborés pour l'esturgeon (Horvath *et al.*, 2005; Horvath *et al.*, 2011) et adaptés au plan opérationnel.

Cette année 11 congélations de sperme ont été réalisées les 13, 20 et 29 juin 2017, il s'agit de la semence de 88087, 3219601, Martinien, 3220207 et 3220132 (le 13 juin) mais aussi de la semence de 3255270, 3219650 (le 20 juin) et enfin de la semence de 3220233 et 3219689 (le 29 juin) (**Tableau 14**).

Toutes ces semences ont été congelées le jour même de leur prélèvement.

Le dilueur utilisé pour cette cryoconservation est le dilueur Tsvetkova ((dilution Modified Tsvetkova's (Horvath *et al.*, 2005; Dorsey *et al.*, 2011) dont la composition est la suivante :

Pour 1L de dilueur :

- 8,00982 g sucrose 23,4 mM
- 0,01864 g KCL 0,25mM
- 3,633 g Tris 30mM

Les paillettes utilisées ont une contenance de 0,5ml. Après avoir rempli individuellement les paillettes de semences avec une pipette l'excédent de semences est évacué grâce à un peigne (**Figure 15**).

Ensuite la paillette est rebouchée grâce à une poudre de rebouchage (**Figure 16**) avant d'être congelé dans l'azote liquide (**Figure 17**).



Figure 15 : Mise en paillettes de la semence de *A. sturio* (© Ph Jatteau, Irstea)



Figure 16 : Mise en place de la poudre de rebouchage (© Ph Jatteau, Irstea)

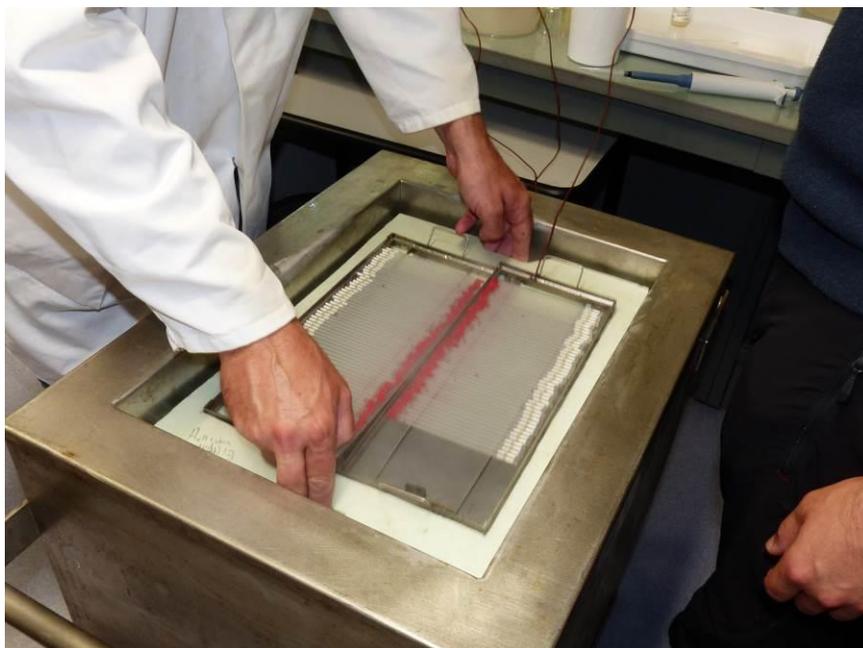


Figure 17 : Congélation de la semence de *A. sturio* (© Ph Jatteau, Irstea)

Le support à paillettes doit être plongé dans l'azote liquide et la température mesurée en temps réel afin qu'elle atteigne -150°C en moins de 10 minutes (**Figure 18**).

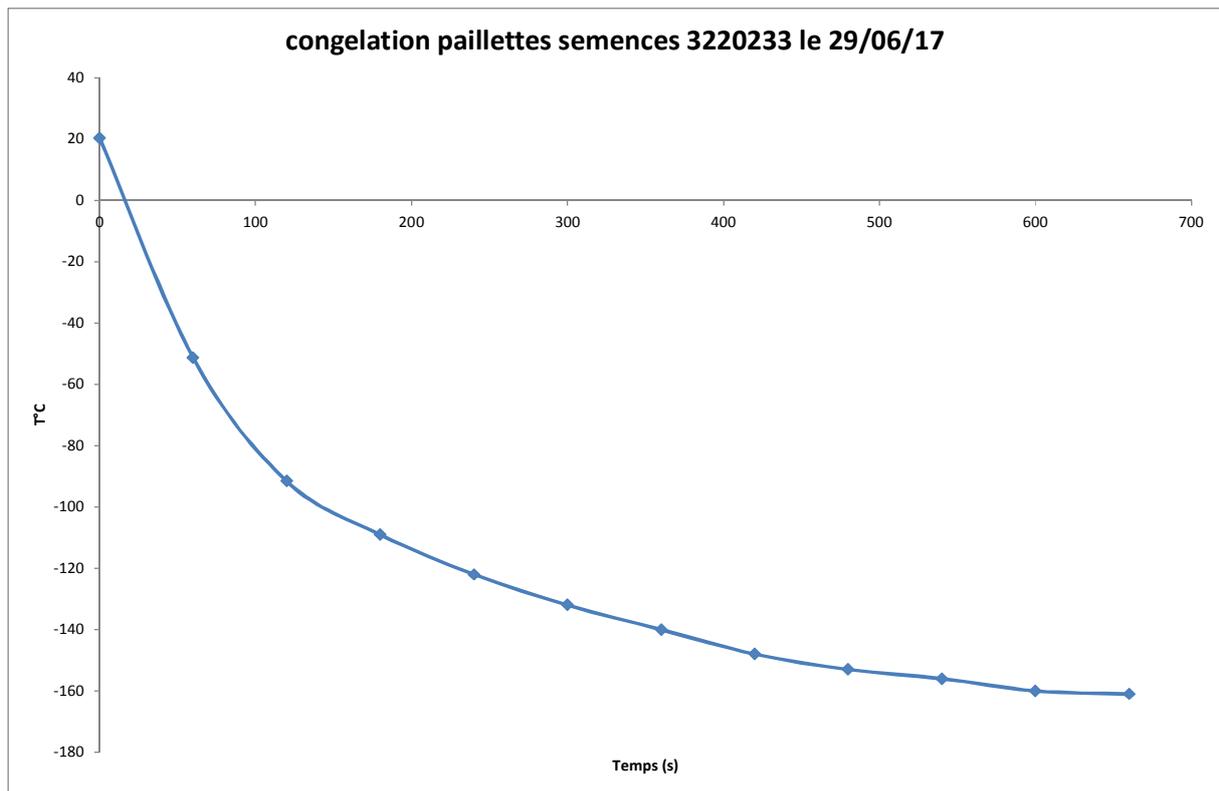


Figure 18 : exemple de descente en température lors la congélation des paillettes d' *A. sturio*

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des congélations de semences 2017

| Date | Nom | DILUTION | | | Nombre de Paillettes (0,5mL) | Nb de Visos | N° Canister | Localisation |
|-----------|-----------|----------|---------|----------|------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| | | Semence | dilueur | méthanol | | | | |
| 13 juin | 88087 | 33 | 26,4 | 6,6 | 110 | 4 | 1 | Haut cuve n°3 |
| | 3219601 | 33 | 26,4 | 6,6 | 110 | 4 | 1 | Haut cuve n°3 |
| | Martinien | 33 | 26,4 | 6,6 | 107 | 4 | 1(2 visos) | Haut cuve N°3 |
| | | | | | | | 2(2 visos) | Haut cuve N°3 |
| | 3220207 | 33 | 26,4 | 6,6 | 120 | 4 | 1 | bas cuve n°2 |
| | 3220132 | 33 | 26.4 | 6.6 | 109 | 4 | 1(3 visos) | Bas cuve N°3 |
| 1(1 viso) | | | | | | | Haut cuve N°3 | |
| 20 juin | 3255270 | 33 | 26.4 | 6.6 | 112 | 4 | 3 | Bas cuve N°3 |
| | 3255270 | 33 | 26.4 | 6.6 | 109 | 4 | 3 | Haut cuve N°3 |
| | 3219650 | 33 | 26.4 | 6.6 | 100 | 4 | 3 | Bas cuve N°3 |
| | | | | | | | 3 | Haut Cuve N°3 |
| 29 juin | 3220233 | 33 | 26.4 | 6.6 | 103 | 4 | 3(2 visos) | Haut cuve N°3 |
| | | | | | | | 4(2 visos) | Bas cuve N°3 |
| | 3219689 | 33 | 26.4 | 6.6 | 124 | 4 | 4 | Bas Cuve N°3 |
| | Bleu | 33 | 26.4 | 6.6 | 105 | 4 | 4 | Haut Cuve N°3 |

Chapitre IV : Intégration des approches génétiques au programme de conservation d'une espèce menacée, l'esturgeon Européen (*Acipenser sturio*) : passé, présent et futur

Roques S. ¹, Chancerel E. ², Acolas M.L. ¹

¹ Irstea, unité EABX, Bordeaux

² INRA, UMR Biodiversité Gènes et Ecosystèmes, Cestas Pierroton

Objectifs et intérêts

- Faire un bilan de l'utilisation des approches génétiques pour la gestion des programmes d'élevage et de repeuplement de l'esturgeon Européen
- Avoir en main les outils nécessaires pour le suivi génétique ex-situ et in-situ dans le futur ; transfert de compétences
- Proposer de nouveaux axes de recherche pour améliorer la connaissance des caractéristiques génétiques associées à la survie de cette espèce dans le milieu naturel

IV.1 Introduction : Programme de conservation ex-situ

Les programmes de conservation sont souvent considérés comme les solutions ultimes et nécessaires pour la préservation des espèces menacées (McGowan *et al.*, 2017). Dans le cas d'espèces pour lesquelles les menaces sont difficiles à contrôler (ex. disparition des habitats, changements climatiques, utilisation excessive des ressources, invasion de pathogènes, pollution) et pour lesquelles il est actuellement impossible d'assurer la survie dans le milieu naturel, la *conservation ex-situ* est en général la solution envisagée. Elle est définie comme la préservation d'une composante de la diversité biologique en dehors de son habitat naturel et ses objectifs peuvent être fixés à court, moyen ou long terme, dépendamment de l'espèce à protéger. La conservation ex-situ inclue les élevages dits conservatoires et les élevages dits de propagation. Les premiers ont pour objectif de retenir au sein des populations captives le maximum de diversité génétique originale sur la période la plus longue possible (environ 100 ans ; (Frankham *et al.*, 2010)). Contrairement aux élevages conservatoires, les élevages de propagation ont une finalité immédiate qui est de produire des individus d'une espèce menacée ou en voie d'extinction pour les réintroduire dans le milieu naturel. Associées à ces différents programmes, les approches génétiques permettent de réaliser un suivi des caractéristiques génétiques des populations captives ou dans le milieu naturel (De Cara *et al.*, 2011). En fournissant des données utiles pour le maintien à long terme de leur diversité

génétique, elles visent à garantir leur potentiel de survie et d'adaptation. Les programmes de conservation des espèces menacées les plus emblématiques ont su tirer profit de cette information (Vargas *et al.*, 2008) (Witzenberger & Hochkirch, 2011)

En résumé, les programmes ex-situ ont deux buts primordiaux : (1) Grâce à une gestion génétique et démographique, maintenir une population en captivité qui servira de « stock de sécurité » pour l'espèce (2) Aider à la mise en place d'une nouvelle population dans le milieu naturel grâce au programme de repeuplement.

La famille des esturgeons est l'une des familles de poissons les plus vulnérables puisque toutes les espèces de cette famille se trouvent, en 2010, sur la Liste rouge de l'UICN et 17 sont considérées comme en danger critique d'extinction (Gesner *et al.*, 2010). La difficulté d'établir des programmes de conservation chez ces espèces vient principalement de certaines de leurs caractéristiques biologiques comme leur grande longévité et une maturité tardive qui nécessitent des actions sur de très longues périodes. Pour ces raisons, il n'existe actuellement que quatre espèces parmi les 25 existantes pour lesquelles un programme de conservation ex-situ sensu stricto a été mis en place, *A. sinensis* (Qiwei, 2010), *A. oxyrinchus* (Kolman *et al.*, 2011) et *A. naccarii* (Boscari & Congiu, 2014). La quatrième est l'esturgeon Européen, *Acipenser sturio* (Williot *et al.*, 2007) qui survit actuellement en Europe occidentale où la dernière population naturelle est présente dans les eaux du système Gironde-Garonne-Dordogne en France (dernière reproduction probablement en 1994). Cette population est soutenue par un programme d'élevage à la station expérimentale de St-Seurin-sur-l'Isle (St-Seurin) et un programme de repeuplement depuis 1995 (Williot *et al.*, 2009). Un stock captif est également maintenu en Allemagne au Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries (IGB)(Kirschbaum *et al.*, 2011). Le programme de conservation de l'esturgeon Européen est certainement l'un des programmes les plus ambitieux et les plus aboutis parmi ces espèces. Il a su relever de nombreuses difficultés, telles que la disponibilité d'un nombre restreint de fondateurs, la difficulté d'élever cette espèce en captivité, ainsi qu'une maturité tardive (environ 14 ans ; (Magnin, 1962; Jatteau *et al.*, 2011)). Par ailleurs, l'information du pedigree est disponible pour l'ensemble des cohortes produites par le programme d'élevage en captivité depuis plus de 10 ans (Acolas *et al.*, 2013), ce qui constitue un contexte idéal pour suivre génétiquement le stock captif, mais aussi pour tester des hypothèses concernant la génétique des individus relâchés et capturés après plusieurs années dans le milieu naturel.

La **Figure 19** ci-dessous représente les études réalisées, en cours ou en projet chez cette espèce, en lien avec les approches génétiques, depuis la capture des derniers individus de la population naturelle et de la mise en place du programme ex-situ (**passé**), aux programmes d'élevage et de réintroduction (**présent**) jusqu'au suivi de la population soutenue et des nouveaux lâchers qui constitueront les générations du milieu naturel dans le futur (**futur**). Les nouveaux résultats présentés dans ce Chapitre sont indiqués par un astérisque *. A continuation, sont résumées les différentes étapes de la gestion génétique de l'esturgeon Européen.

PASSÉ

Un nombre restreint de fondateurs. Le stock captif d'esturgeons Européens a été créé en 1995, à partir d'un petit nombre d'individus capturés dans le milieu naturel, appartenant probablement aux dernières cohortes de l'espèce (N= 39 ; cohortes 1970-1994). Etant donné

la diminution des effectifs de l'espèce à cette période, de nombreux échantillons ont été collectés entre 1995 et 2000 pour des analyses postérieures éventuelles. En 2014, une première méthodologie génétique, fondée sur un set de 17 marqueurs microsatellites a été développée qui a permis d'estimer chez ces individus des dernières générations de l'espèce un faible degré de variabilité génétique ainsi que des signatures génétiques de déclin actuels et plus anciens et une taille effective très réduite (Roques *et al.*, 2018a). Ces résultats mettaient en avant la grande difficulté de sauvegarder cette espèce étant donné sa faible variabilité.

PRÉSENT

Caractérisation génétique du stock captif. Le principe des élevages ex-situ est de maintenir en captivité des populations viables, tout en minimisant la perte de leur variabilité génétique, pour qu'ils puissent s'ajuster aux pressions de sélection après réintroduction ou lors d'un renforcement de population. Nos résultats ont montré que la variabilité génétique des fondateurs constituant le stock captif ayant donné naissance à l'ensemble des individus relâchés, était similaire à celle des dernières générations de la population naturelle (individus des cohortes 1970-1994)(Roques *et al.*, 2018a). Cela indiquait que bien que la diversité génétique originelle de l'espèce soit faible, elle avait été maintenue dans le stock captif. Dans la Section IV.3.2.1, nous utiliserons de nouveaux marqueurs SNPs (Roques *et al.*, 2017; Roques *et al.*, 2018b) pour caractériser la diversité génétique du stock captif des juvéniles F1 (cohortes 2007-2014) pour la comparer à celle des adultes issus du milieu naturel, dits « sauvages » (cohortes 1970 à 1994). Cette comparaison est importante pour évaluer les caractéristiques génétiques des esturgeons qui seront les géniteurs de demain et pour observer les changements par rapport aux individus des dernières générations nés dans le milieu naturel.

Gestion génétique du stock captif. La gestion génétique du programme d'élevage d'*A. sturio* a pour but de fournir des paramètres utiles pour orienter les croisements afin de préserver la diversité et d'éviter la consanguinité. Nos résultats précédents ont indiqué que les stratégies de croisements sur plusieurs années réalisés avec un nombre suffisant de géniteurs non apparentés étaient probablement la meilleure option pour préserver la diversité de cette espèce (Roques *et al.*, 2015; Roques *et al.*, 2018a). Depuis 2014, les croisements sont donc sélectionnés en fonction du coefficient de parenté génétique (R ; Goodnight) calculé à partir des marqueurs microsatellites (Roques *et al.*, 2016). Depuis 2017, le calcul des différents paramètres est réalisé avec un nouveau set de 79 marqueurs SNPs (Roques *et al.*, 2017; Roques *et al.*, 2018b). Dans la Section IV.3.1, nous présenterons la création d'un nouveau répertoire de données, le *Studbook* qui regroupe l'ensemble des spécimens en captivité ainsi qu'une série d'indices génétiques nouvellement sélectionnés pour le choix des paires de géniteurs. Le *Studbook* permettra chaque année de formuler des recommandations d'appariements et des éventuels échanges d'individus (par ex. entre IGB et St-Seurin).

Détermination du sexe chez A. sturio. Nous nous proposons d'explorer dans la Section IV.3.2.2, la possibilité de détermination du sexe par une approche génétique en routine (i.e. utilisation de marqueurs SNPs). Les déterminismes du sexe chez les poissons sont extrêmement variables et peuvent être soit génétiques, soit environnementaux, soit génétiques et modulables par l'environnement (Mank & Avise, 2009). Les gènes

déterminants majeurs du sexe qui contrôlent ce déterminisme génétique évoluent extrêmement rapidement et peuvent être différents même au sein d'espèces relativement proches. Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode non-invasive permettant de différencier les mâles et les femelles d'*A. sturio* bien avant l'âge à maturité. Cette méthode de détection serait utile pour la gestion du programme d'élevage en facilitant l'identification précoce des mâles et des femelles.

FUTUR

Gestion génétique de la population soutenue. Le programme de repeuplement qui a débuté il y a 20 ans s'est traduit par un grand nombre de larves et de juvéniles (> 1.5 million) relâchés ces 10 dernières années dans les rivières. Depuis 2010, un suivi de ces individus est réalisé par des captures dans l'Estuaire et par la déclaration de captures accidentelles de la part des pêcheurs (Acolas *et al.*, 2011; Acolas *et al.*, 2012). Les analyses génétiques ont permis d'apporter une information utile pour estimer la survie des individus relâchés. En assignant ces individus à leurs parents, elles ont permis de confirmer leur origine et d'estimer leur âge (Roques *et al.*, 2015; Roques *et al.*, 2016). Une première évaluation de la diversité génétique des individus nés en captivité et relâchés dans la fraction estuarienne a mis en évidence que la plupart des individus capturés (95%) provenait du stock captif (Roques *et al.*, 2016). Par ailleurs, nous avons pu observer que même si la diversité de la population soutenue était faible avec une certaine proportion d'individus consanguins (environ 10%), elle maintenait les caractéristiques des individus des dernières générations issues du milieu naturel (Roques *et al.*, 2018a). A partir de 2020, ces individus du milieu naturel (7 générations F1 depuis 2007) seront en âge de procréer pour donner naissance à des générations F2. Une approche génétique fiable (un set de 79 marqueurs SNPs) a été mise au point pour détecter ces reproductions, suivre les F1 et les F2 déjà présents dans le milieu ou futurs relâchés dans le cadre du programme continu de repeuplement (Roques *et al.*, 2017; Roques *et al.*, 2018b). Dans la section IV.3.3.1, nous présenterons les résultats de la comparaison des caractéristiques génétiques obtenues avec le set des marqueurs SNPs entre les individus capturés dans l'Estuaire entre 2010 et 2017 (issus du programme d'élevage) et nos individus dits « sauvages » (adultes nés entre 1970 et 1994 dans le milieu naturel).

Détection de l'hybridation potentielle entre A. sturio et A. oxyrinchus. Comme nous l'avons spécifié précédemment, il est important de s'assurer du maintien du maximum de la diversité originelle dans la population. Egalement, depuis quelques années, les prises accidentelles récentes d'*A. oxyrinchus*, l'espèce la plus proche d'*A. sturio* dans des zones situées très au Sud de sa distribution (Elvira *et al.*, 2015) peuvent laisser penser à une possible hybridation de ces deux espèces dans le futur. Ce phénomène serait une menace à l'intégrité génétique de l'espèce et il est important de détecter ces éventuels mélanges. Nous présenterons dans la section IV.3.3.2, une approche qui nous permettra de différencier génétiquement les deux espèces et de détecter les hybrides potentiels.

En conclusion de ce Chapitre, nous aborderons les perspectives futures dans la gestion génétique et génomique de l'espèce dans ses deux volets, élevage et repeuplement.

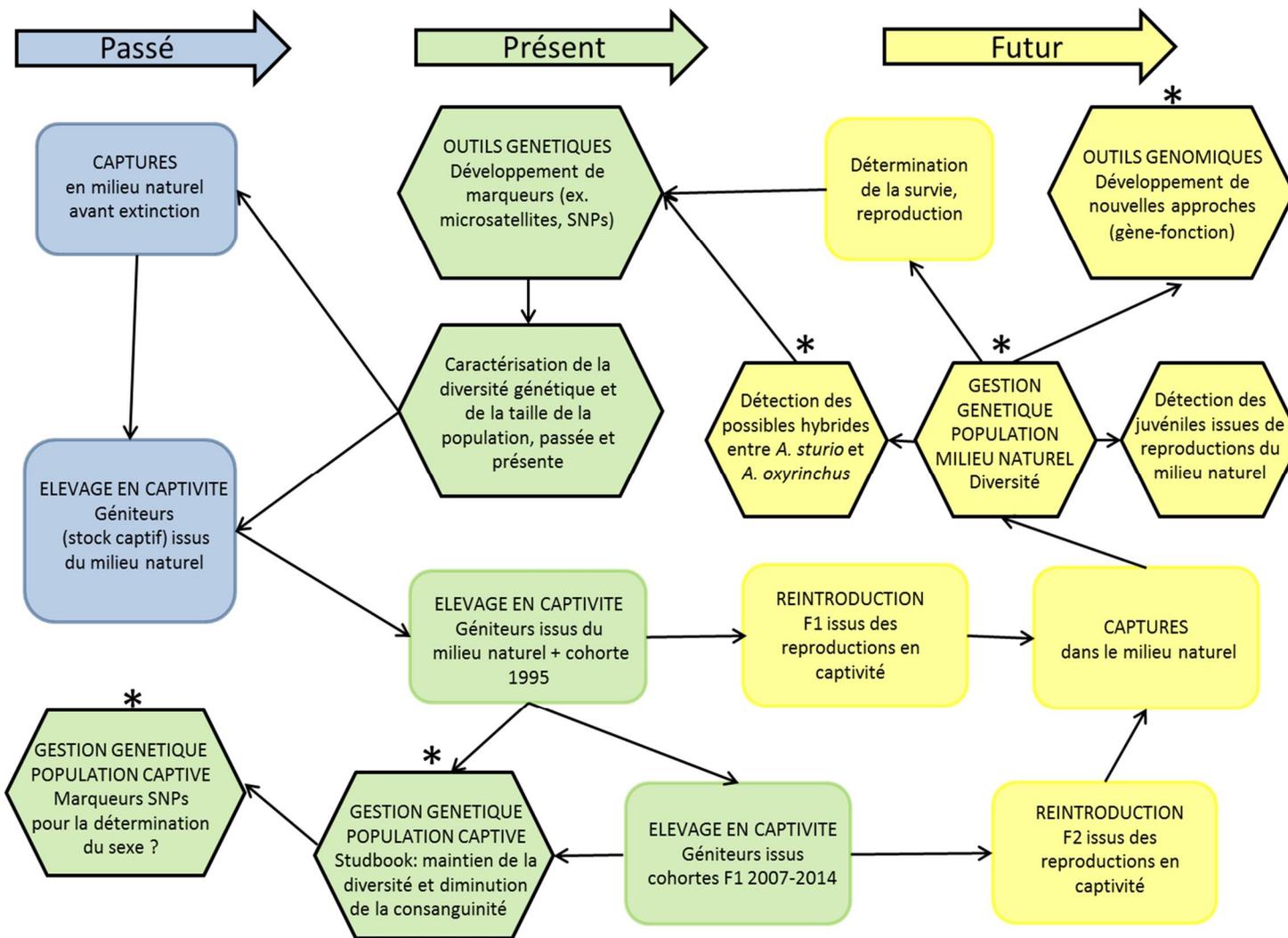


Figure 19 : Approche holistique des mesures de conservation (*passées*, *présentes* et *futures*) de l'esturgeon Européen en lien avec les outils génétiques. Les études génétiques sont indiquées dans les hexagones tandis que les mesures associées (non génétiques) sont représentées par des rectangles Les astérisques * indiquent les sujets qui seront traités dans ce chapitre

IV.2. Matériels et Méthodes

IV.2.1 Gestion génétique et optimisation du stock captif

IV.2.1.1 Création et gestion d'un Studbook génétique pour *A. sturio*

Le « studbook » (ou registre d'élevage en français) est un ensemble de données qui répertorie les individus et leur généalogie depuis les « fondateurs » (en général issus du milieu naturel) et qui fournit également d'autres informations individuelles (ex. naissance, mort, transferts, information sanitaire...etc). Les données génétiques vont être indispensables dans ces registres, puisqu'elles permettent d'identifier les individus importants génétiquement pour la reproduction et de planifier les croisements optimaux pour le maintien de la diversité en évitant la consanguinité. Par exemple, il permet aux gestionnaires d'identifier les individus qui partagent les mêmes « allèles » (allélomorphes). Deux individus qui possèdent les mêmes allèles récessifs ont 25% de risque que ces allèles soient transmis à leurs descendants, leur donnant ainsi deux copies d'un allèle potentiellement nuisible.

Pour *A. sturio*, les indices génétiques de parenté et de consanguinité optimaux ont été sélectionnés et calculés à partir des marqueurs microsatellites et plus récemment pour le nouveau set de marqueurs SNPs (Roques *et al.*, 2017; Roques *et al.*, 2018b). Dans cette section, nous présentons la constitution du « studbook génétique » (*Studbook*) de l'espèce où sont compilés l'ensemble de l'information individuelle et par paires d'individus (79 marqueurs SNPs).

Ce *Studbook* contient plusieurs paramètres génétiques (**Figure 20**) décrits ci-dessous :

La parenté moyenne ou « **mean kinship** » (**MK**) correspond à la moyenne des parentés (coefficient de parenté R) deux à deux d'un individu avec l'ensemble de tous les autres individus (Ballou & Lacy, 1995; Caballero & Toro, 2000). C'est le paramètre le plus utilisé actuellement dans les programmes de conservation pour orienter les reproductions. Chaque individu est donc caractérisé par son MK : plus MK est faible et plus cet individu est éloigné génétiquement (moins apparenté) de l'ensemble des autres individus.

Le coefficient de parenté (**parenté.PAIR**) ou « **Relatedness coefficient** » est le coefficient de parenté R entre paires d'individus. Nous avons choisi le calcul de R selon Trio ML ((Roques *et al.*, 2017; Roques *et al.*, 2018b)) et calculé dans COANCESTRY (Wang, 2011).

La **consanguinité F** ou « **inbreeding** »: le degré de consanguinité dépend de la parenté qui existe entre les deux parents de l'individu concerné et peut varier de 0 à 100%. F est calculé individuellement selon Trio ML (calculée dans COANCESTRY) (les valeurs négatives dans le tableau doivent être considérées comme égales à 0).

Groupe mère ou **père** : c'est le groupe génétique (groupe familial) défini précédemment selon les marqueurs microsatellites (Roques *et al.*, 2015; Roques *et al.*, 2018a). Ils sont au nombre de quatre, représentés par les couleurs ROUGE (cohorte 1995 née en captivité), BLEU, VIOLET et VERT, correspondant aux géniteurs issus du milieu naturel.

Les calculs de l'ensemble des indices ont été réalisés pour tous les individus vivants de St-Seurin et de l'IGB, ainsi que sur les individus pour lesquels des semences ont été conservées. Cela nous amène à un fichier qui regroupe 351 individus et 61 425 paires d'individus. Pour sélectionner les paires optimales, basée sur les critères génétiques, nous avons défini des règles de choix dans cet ordre d'importance, à continuation :

- I. Privilégier les géniteurs avec les MK les plus faibles (kinship_MK <0,075 ; non apparentés)
- II. Au même degré d'importance, choisir les paires d'individus avec un coefficient de parenté également faible (Parenté PAIR <0,075; non apparenté)
- III. La consanguinité F doit être inférieure à 10% (0,1)
- IV. Si possible, privilégier le groupe génétique Vert qui correspond à la diversité des plus vieux géniteurs issus du milieu naturel (plus diverses ; Roques et al. 2018)

IV.2.1.2 Composition génétique des futurs géniteurs : St-Seurin et IGB

Dans le but de comparer la composition génétique des individus du stock captif et celle des derniers individus nés dans le milieu naturel, nous avons réalisé une analyse en composante principale (ACP; Logiciel GENALEX, Peakall and Smouse 2012) sur N=39 échantillons sauvages (SAUVAGES ; cohortes 1970-1994) et l'ensemble des individus (N= 193) du stock captif de St-Seurin (JUV_stSEURIN; cohortes 2007-2014) disponible à ce jour. Nous avons également comparé par ACP ces individus sauvages (SAUVAGES) avec les géniteurs des prochaines années (c.à.d. en tenant en compte seulement les cohortes 2007 et 2008) de l'IGB (N=27) et de St-Seurin (N=113).

Grâce à ces approches, il sera possible de visualiser les individus intéressants pour la reproduction et éventuellement ceux que l'on souhaiterait transférer d'un programme d'élevage à l'autre.

IV.2.2 Gestion génétique de la population soutenue

IV.2.2.1 Composition génétique de la population soutenue

Pour comparer la composition génétique (N=79 SNPs) des individus issus de l'élevage et capturés dans l'Estuaire (N=83) et des individus nés dans le milieu naturel dits « sauvages » (cohortes 1970-1994 ; N=39), nous avons réalisé une ACP, comme précédemment en 2.1.2. Il sera intéressant d'observer les différences entre les individus de la population « sauvage » et ceux qui constituent la nouvelle population dans le milieu naturel (individus des cohortes 2007 à 2014 relâchés dans l'Estuaire et ayant survécu au moins jusqu'à leur capture).

IV.2.2.2 Détection de la possible hybridation avec *Acipenser oxyrinchus*

Nous avons testé le set de 79 marqueurs SNP développés pour *A. sturio* pour différencier les deux espèces. Un total de 36 et 23 échantillons d'*A. sturio* et d'*A. oxyrinchus* ont été génotypés. Pour les analyses, nous avons réalisé une ACP (Analyse en Composantes Principales) ainsi qu'un test d'assignation, grâce au Logiciel GenAlex (Peakall and Smouse 2012).

IV.2.3 Analyse exploratoire de la détermination génétique du sexe chez *A. sturio*

Nous avons utilisé les résultats obtenus à partir du RADseq de l'espèce (Roques *et al.*, 2017; Roques *et al.*, 2018b) pour tester si parmi les 2125 marqueurs SNP génotypés chez 19 mâles

et 17 femelles (N=36), certains permettaient de différencier les deux sexes. Un test de Fisher nous a permis d'identifier les SNPs pour lesquels la probabilité de différencier les fréquences alléliques de ces deux groupes était significative ($P \leq 0.05$, N=108). Parmi ces SNPs, nous en avons conservé 99 que nous avons ensuite analysés sur le programme «assay designer» (Mass array ou Sequenom; voir Encart 3; (Roques *et al.*, 2017) pour pouvoir établir des PCRs multiplexes (ou Plex), qui consistent à combiner plusieurs couples d'amorces (et donc, plusieurs SNPs différents) dans une même réaction. Deux multiplexes (Plex 1, 30 SNPs et Plex 2, 40 SNPs) ont pu être ainsi constitués. Pour visualiser le pouvoir de ces 70 marqueurs à différencier nos deux groupes, mâle et femelle, nous avons réalisé une APC à partir des 36 génotypes RADseq (Logiciel GenAlex; (Peakall & Smouse, 2012).

Nous avons ensuite analysé 34 des 36 échantillons précédents ainsi que d'autres esturgeons de sexe connu (N=49 mâles et 26 femelles) par le système Mass Array (ou Sequenom) qui permet une analyse plus précise des génotypes en comparaison au séquençage RADseq, ce dernier pouvant engendrer un certain pourcentage d'erreurs. Les résultats obtenus ont été visualisés par APC, comme précédemment, pour nous permettre de valider ou d'invalider la méthodologie d'identification du sexe.

IV.3. Résultats

IV.3.1 Génétique studbook

Chaque année, l'utilisation du studbook consistera à observer les indices génétiques pour les paires de géniteurs disponibles pour la reproduction et de sélectionner les paires optimales (d'un point de vue génétique). Par exemple, sur la **Figure 20** nous observons à la ligne 9 (en vert) une paire optimale, puisque tous les critères sont optimaux : les MK sont faibles pour chaque individu, les deux individus 3874964 et STU_IGB34 ne sont pas apparentés (coefficient de parenté $R=0$); la consanguinité de chaque individu est faible et l'appartenance au groupe « vert » de l'un des parents de ces individus permettra une représentation génétique de ce groupe chez les descendants de cette paire.

Pour le stock captif de St-Seurin ainsi que celui de l'IGB, nous avons représenté (**Figure 21**) l'ensemble des paires en fonction des coefficients de parenté (R) entre elles, en indiquant (en vert) le seuil optimal ($R=0.075$) en dessous duquel les paires ne sont pas apparentées. Nous observons que la proportion de paires pour lesquelles le critère de parenté est optimum représente un faible pourcentage du total, indiquant un grand nombre d'individus apparentés parmi le stock captif.

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O |
|----|---------|-----------|-------------|-------------|--------------|------------------|------------------|----------|----------|----------|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 1 | IND1 | IND2 | Parenté_MK1 | Parenté_MK2 | Parenté.PAIR | Consanguinité_F1 | Consanguinité_F2 | mère_ID1 | père_ID1 | mère_ID2 | père_ID2 | Groupe_mère1 | Groupe_père1 | Groupe_mère2 | Groupe_père2 |
| 2 | 3874964 | 3878634 | 0,0413 | 0,0585 | 0,3986 | 0,0557 | -0,0635 | LEONCE | CAROL | LEONCE | CAROL | BLEU | VIOLET | BLEU | VIOLET |
| 3 | 3874964 | 3896882 | 0,0413 | 0,0616 | 0,4296 | 0,0557 | -0,0852 | LEONCE | CAROL | LEONCE | DELPHINE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 4 | 3874964 | 3878922 | 0,0413 | 0,0642 | 0,0999 | 0,0557 | 0,211 | LEONCE | CAROL | LEONCE | DELPHINE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 5 | 3874964 | STU_IGB37 | 0,0413 | 0,0670 | 0 | 0,0557 | 0,0511 | LEONCE | CAROL | GEORGINA | EMELINE | BLEU | VIOLET | BLEU | VERTMOLET |
| 6 | 3874964 | 3877157 | 0,0413 | 0,0702 | 0,4042 | 0,0557 | -0,1311 | LEONCE | CAROL | LEONCE | CAROL | BLEU | VIOLET | BLEU | VIOLET |
| 7 | 3874964 | STU_IGB03 | 0,0413 | 0,0709 | 0,0098 | 0,0557 | -0,1414 | LEONCE | CAROL | GEORGINA | ISABEAU | BLEU | VIOLET | BLEU | VIOLET |
| 8 | 3874964 | STU_IGB25 | 0,0413 | 0,0728 | 0 | 0,0557 | 0,0458 | LEONCE | CAROL | GEORGINA | EMELINE | BLEU | VIOLET | BLEU | VERTMOLET |
| 9 | 3874964 | STU_IGB24 | 0,0413 | 0,0740 | 0 | 0,0557 | 0,0731 | LEONCE | CAROL | JEANNE | JUDE | BLEU | VIOLET | VIOLET | VERT |
| 10 | 3874964 | 3917331 | 0,0413 | 0,0746 | 0,281 | 0,0557 | 0,2124 | LEONCE | CAROL | LEONCE | DELPHINE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 11 | 3874964 | 3905205 | 0,0413 | 0,0768 | 0,0168 | 0,0557 | 0,4046 | LEONCE | CAROL | LEONCE | DELPHINE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 12 | 3874964 | 3877340 | 0,0413 | 0,0777 | 0,295 | 0,0557 | -0,2361 | LEONCE | CAROL | LEONCE | CAROL | BLEU | VIOLET | BLEU | VIOLET |
| 13 | 3874964 | 3877445 | 0,0413 | 0,0788 | 0 | 0,0557 | -0,0144 | LEONCE | CAROL | JEANNE | MARIETTE | BLEU | VIOLET | VIOLET | VERT |
| 14 | 3874964 | 3877195 | 0,0413 | 0,0795 | 0 | 0,0557 | 0,2128 | LEONCE | CAROL | JULIE | DELPHINE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 15 | 3874964 | STU_IGB35 | 0,0413 | 0,0816 | 0 | 0,0557 | 0,1937 | LEONCE | CAROL | GEORGINA | EMILE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 16 | 3874964 | 3879036 | 0,0413 | 0,0822 | 0,3274 | 0,0557 | -0,2192 | LEONCE | CAROL | LEONCE | CAROL | BLEU | VIOLET | BLEU | VIOLET |
| 17 | 3874964 | 3877354 | 0,0413 | 0,0841 | 0,0047 | 0,0557 | 0,0358 | LEONCE | CAROL | JULIE | DELPHINE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 18 | 3874964 | 3877496 | 0,0413 | 0,0841 | 0,6162 | 0,0557 | -0,1678 | LEONCE | CAROL | LEONCE | CAROL | BLEU | VIOLET | BLEU | VIOLET |
| 19 | 3874964 | 3878330 | 0,0413 | 0,0863 | 0,0043 | 0,0557 | -0,1345 | LEONCE | CAROL | JEANNE | MARIETTE | BLEU | VIOLET | VIOLET | VERT |
| 20 | 3874964 | 3878410 | 0,0413 | 0,0867 | 0,0107 | 0,0557 | 0,0081 | LEONCE | CAROL | JULIE | DELPHINE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 21 | 3874964 | 3878208 | 0,0413 | 0,0873 | 0,0174 | 0,0557 | 0,1175 | LEONCE | CAROL | JULIE | DELPHINE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 22 | 3874964 | 3914595 | 0,0413 | 0,0876 | 0,1806 | 0,0557 | 0,4119 | LEONCE | CAROL | LEONCE | DELPHINE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 23 | 3874964 | 3879233 | 0,0413 | 0,0877 | 0,3258 | 0,0557 | -0,1468 | LEONCE | CAROL | LEONCE | CAROL | BLEU | VIOLET | BLEU | VIOLET |
| 24 | 3874964 | 3877372 | 0,0413 | 0,0926 | 0 | 0,0557 | 0,057 | LEONCE | CAROL | JULIE | DELPHINE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 25 | 3874964 | STU_IGB36 | 0,0413 | 0,0927 | 0,1638 | 0,0557 | 0,1388 | LEONCE | CAROL | GEORGINA | EMILE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 26 | 3874964 | 3877968 | 0,0413 | 0,0934 | 0 | 0,0557 | 0,0707 | LEONCE | CAROL | JULIE | DELPHINE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 27 | 3874964 | STU_IGB26 | 0,0413 | 0,0979 | 0,1159 | 0,0557 | 0,1986 | LEONCE | CAROL | GEORGINA | EMILE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 28 | 3874964 | 3878568 | 0,0413 | 0,0990 | 0 | 0,0557 | 0,0382 | LEONCE | CAROL | JULIE | DELPHINE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 29 | 3874964 | 3916927 | 0,0413 | 0,1011 | 0,1565 | 0,0557 | 0,2757 | LEONCE | CAROL | LEONCE | DELPHINE | BLEU | VIOLET | BLEU | BLEU |
| 30 | 3874964 | STU_IGB31 | 0,0413 | 0,1159 | 0,0431 | 0,0557 | -0,0232 | LEONCE | CAROL | FRANCINE | HERVE | BLEU | VIOLET | VIOLET | BLEU |
| 31 | 3874964 | 3878852 | 0,0413 | 0,1160 | 0 | 0,0557 | -0,1011 | LEONCE | CAROL | JEANNE | MARIETTE | BLEU | VIOLET | VIOLET | VERT |

Figure 20 : Extrait du *Studbook* d'*A. sturio*. Le cadre vert met en évidence une paire d'individus optimale selon les critères de sélection choisis (voir Matériels et Méthodes, 2.2.1.1 pour les détails et les commentaires concernant les indices génétiques et les critères)

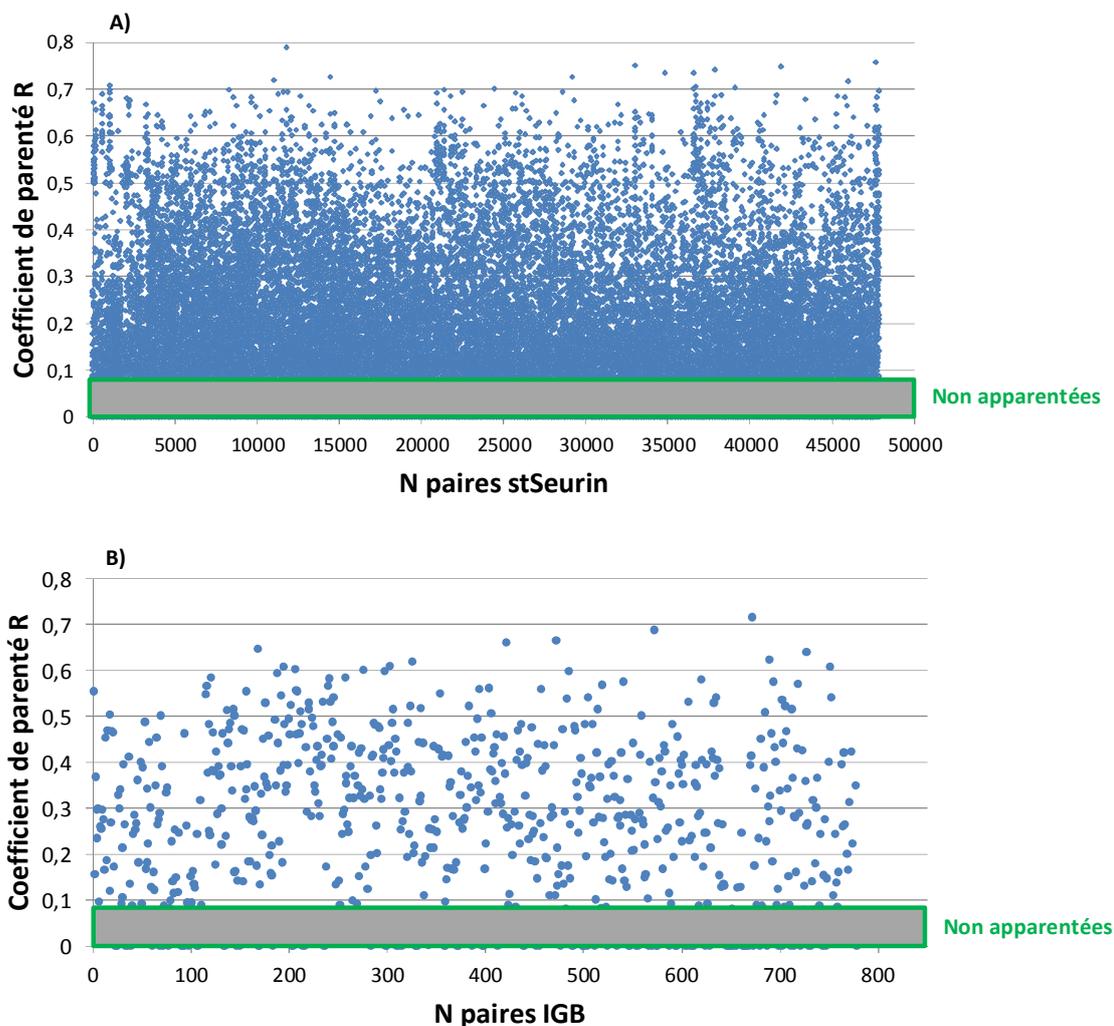


Figure 21 : Graphique montrant les valeurs des coefficients de parenté R (en ordonnée) pour les combinaisons d'individus (en abscisse) de A) St-Seurin (N=47 895) et B) celles de l'IGB (N=781). En vert, le seuil au-dessus duquel les individus sont apparentés ($R \leq 0.075$).

IV.3.2 Gestion de la population captive

IV.3.2.1 Composition génétique

L'analyse en composantes principales (ACP) 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.

Sur la **Figure 22A**, l'ACP montre la composition génétique des anciens esturgeons sauvages par rapport au juvéniles de St-Seurin nés en captivité, leurs descendants directs. Nous observons des individus très proches mais aussi plus éloignés génétiquement de ces fondateurs issus du milieu naturel, mais en général, les résultats montrent que la variabilité génétique des « sauvages » est bien représentée parmi les descendants. Cette **Figure 22** est intéressante dans le contexte du programme d'élevage en captivité pour observer quels sont les individus les plus éloignés génétiquement, ainsi que ceux qui préservent des compositions génétiques similaires à leur parents (cohorte 1970-1994). La **Figure 22B** se

concentre sur les individus des stocks captifs de St-Seurin et l'IGB des cohortes 2007 et 2008 qui seront les prochains géniteurs du programme d'élevage, certainement à partir de 2019-2020 (en 2017, les premiers mâles de ces cohortes ont atteint la maturité et donné du sperme). Comme ci-dessus, on peut visualiser les caractéristiques génétiques des futurs parents et les comparer à ceux des fondateurs.

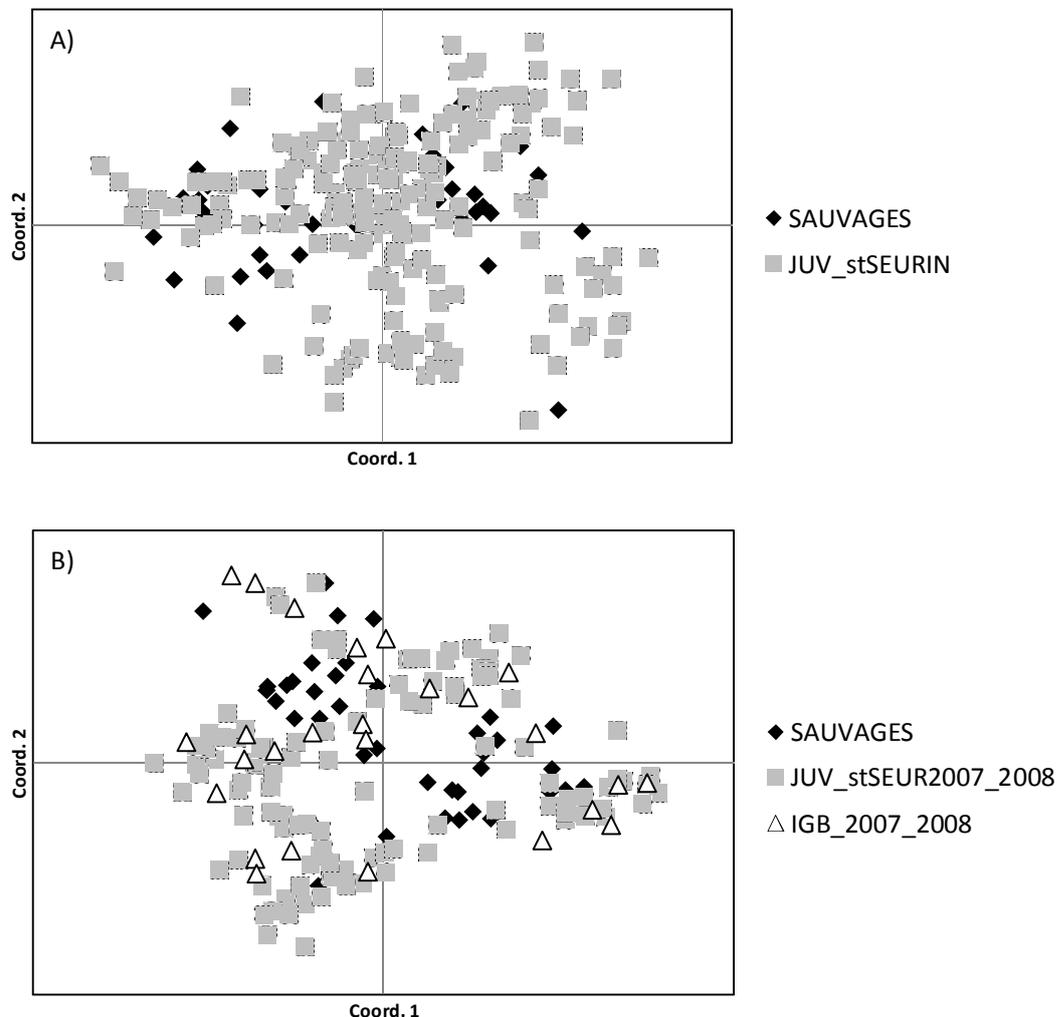


Figure 22 : Analyse en Composantes Principales (ACP) à partir des génotypes (79 SNPs) A) des individus nés dans le milieu naturel dits « SAUVAGES » (N=39, cohortes 1970-1994) et l'ensemble des juvéniles de l'élevage de St-Seurin (JUV_stSEURIN; cohorte 2007-2014; N=113) et B) des individus « SAUVAGES » et les futurs géniteurs (cohortes 2007 et 2008) de St-Seurin (JUV_stSEUR2007_2008) et de l'IGB (IGB_2007_2008).

IV.3.2.2 Différentiation génétique du sexe chez *A. sturio* : résultats préliminaires

Les analyses statistiques testant les différences entre les génotypes des mâles et des femelles montrent que 70 SNPs présentent des différences significatives de fréquences alléliques entre ces deux groupes (tests de Fisher, $P < 0,1$) (ANNEXE 1). L'analyse en composantes principales (Figure 23) des génotypes par RADseq met également en évidence la différenciation des deux groupes, mâle et femelle, qui sont séparés dans l'espace selon l'axe 1. Le taux d'assignation à ces deux groupes est de 100%.

IV.3.3 Gestion population soutenue

IV.3.3.1 Composition génétique des captures 2010-2017

Sur la **Figure 25**, L'analyse en composante principale des individus correspondant aux esturgeons issus du milieu naturel (cohorte 1970-1994 ; SAUVAGES) et ceux appartenant aux juvéniles capturés dans l'Estuaire de 2010 à 2017 (CAPTURES) nous indique que les descendants relâchés dans l'Estuaire et ayant survécu, ont conservé en grande partie la composition génétique de leur parents. Les deux groupes ne sont pas séparés dans l'espace, confirmant leur proximité génétique. Par contre, on peut observer que la composition génétique de certains parents (en vert) n'est pas représentée dans les descendants.

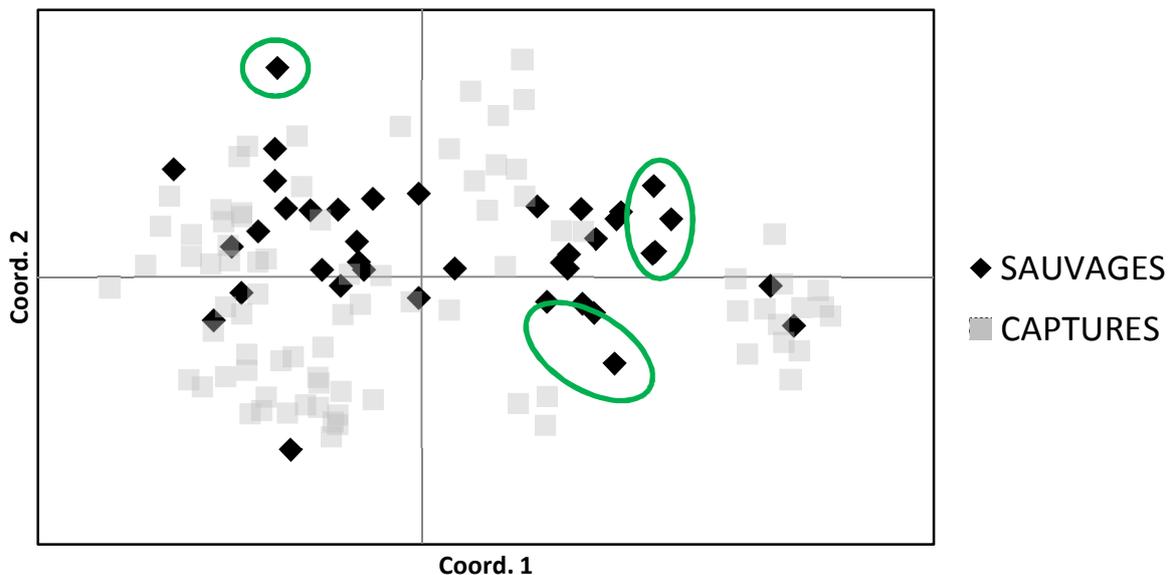


Figure 25 : Analyse en Composantes Principales (ACP) à partir des génotypes (79 SNPs) des individus nés dans le milieu naturel dits « SAUVAGES » (N=39, cohortes 1970-1994) et l'ensemble des individus issus du programme d'élevage et capturés dans l'Estuaire de 2010 à 2017 (CAPTURES).

IV.3.3.2 Différentiation génétique des deux espèces : *Acipenser oxyrinchus* et *Acipenser sturio*

L'analyse en composantes principales (**Figure 26**) à partir des 74 SNPs permet d'observer que les deux groupes *A. sturio* et *A. oxyrinchus* sont clairement différenciés génétiquement, démontrant le pouvoir de cette approche à différencier les deux espèces. Egalement, on peut observer sur cette Figure que les individus capturés ces dernières années appartiennent sans aucun doute à l'espèce *A. sturio*. Nous pouvons voir également, que les individus d'*A. oxyrinchus* forment un nuage de points compacts. Cela est dû au fait qu'ils ont été analysés avec des SNPs d'une autre espèce (ceux d'*A. sturio*) : les résultats d'amplification (ANNEXE 2) nous montrent d'ailleurs qu'ils sont monomorphes (1 seul allèle) pour la majorité des SNPs (69/74) et polymorphes (2 allèles) pour seulement 5 SNPs.

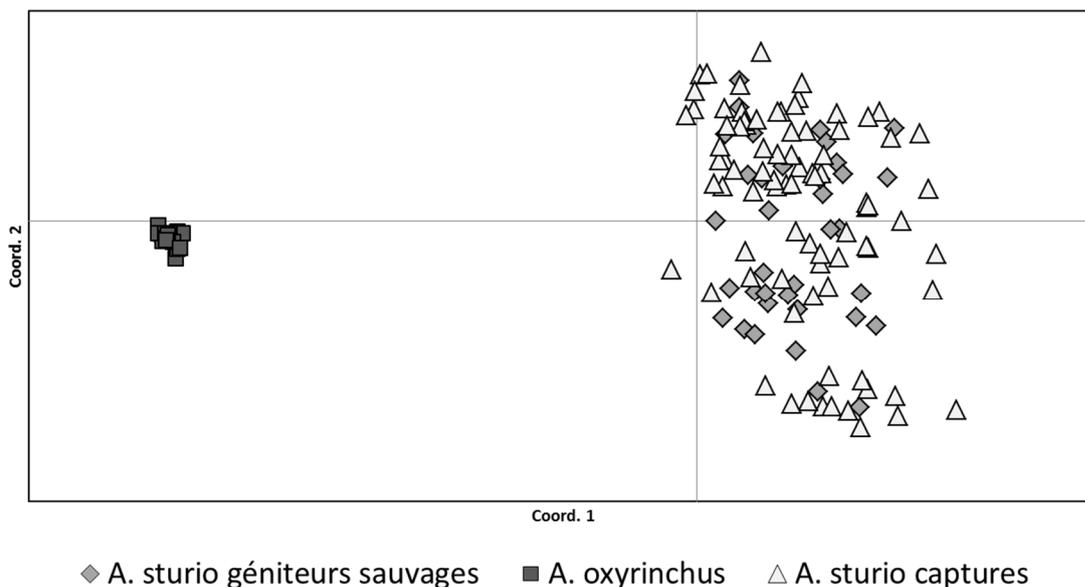


Figure 26 : Analyse en composante principale (ACP) à partir des génotypes des 74 SNPs des individus *A. oxyrinchus*, ainsi que des captures (*A. sturio captures*) et des géniteurs « sauvages » (*A. sturio géniteurs sauvages*) de l'espèce *A. sturio*.

IV.4. Conclusions et perspectives

IV.4.1. Programme d'élevage

Dans les programmes conservatoires, le suivi génétique au fil des générations reste plus que jamais nécessaire. En effet, des goulets d'étranglement peuvent apparaître à chaque cohorte et être responsables d'une perte de diversité génétique (Ralls & Ballou, 1986; Willoughby *et al.*, 2015) pouvant entraîner une modification de certains traits de vie avec la possibilité de mal-adaptations au milieu naturel lors des repeuplements. La mise en place d'un *Studbook* pour *A. sturio* est indispensable pour gérer le stock captif constitué à ce jour d'un grand nombre d'individus et sera un outil utile dans le choix sélectif des futurs croisements, visant à maintenir la diversité génétique et à éviter l'endogamie dans la population captive et soutenue.

Dans ce *Studbook*, nous avons considéré non seulement les individus de St-Seurin mais également les poissons de l'IGB, ainsi que des anciens géniteurs du milieu naturel morts en captivité, mais pour lesquels des semences congelées sont disponibles. Etant donné la faible variabilité de l'espèce et la faible probabilité de capturer des géniteurs dans la population naturelle, l'utilisation de gamètes d'individus intéressants génétiquement est une option intéressante dans le long terme. La préservation de semences permet d'obtenir du matériel génétique sans prélèvement sur des animaux vivants, d'assurer la survie de petites populations captives (archives génétiques vivantes), d'augmenter le temps de génération (pas de mort génétique des individus tant que les semences sont conservées) et d'accroître l'efficacité des élevages quand la gestion de l'espèce se fait sur des bases génétiques (ex. sex-ratio déséquilibré)(Ballou, 1992; Johnston & Lacy, 1995). Des expériences sont

actuellement en cours à la station expérimentale de St-Seurin pour optimiser les méthodes de conservation et évaluer la qualité des semences disponibles d'*A. sturio* (voir Chapitre II). En particulier, l'utilisation de ces gamètes sera déterminante pour préserver la « génétique » des derniers représentants de la population naturelle. On sait par ailleurs que la majorité des esturgeons capturés lors des campagnes de suivi sont presque exclusivement issus de l'élevage en captivité (Roques *et al.*, 2016), ce qui donne davantage d'importance à la conservation de ce matériel unique.

Pour intégrer l'ensemble des informations individuelles du programme d'élevage d'*A. sturio*, il sera également possible d'envisager dans le futur l'utilisation d'un logiciel couramment utilisé dans les parcs zoologiques, mais qui a également prouvé son utilité dans la gestion des programmes de conservation ex-situ d'espèces menacées (Belén Jiménez-Mena *et al.*, 2016; Marker *et al.*, 2017). Ce programme, PMx (Lacy *et al.*, 2012) permet de réaliser une gestion plus automatisée de la population captive. Notamment, il permet d'analyser la structure démographique et génétique de la population captive et modélise son évolution pour atteindre une taille cible en relation avec les enjeux génétiques, les aptitudes démographiques et les possibilités d'accueil des poissons.

Un autre volet important du programme d'élevage est la possibilité de déterminer le sexe des individus bien avant leur maturité sexuelle. Les mécanismes de détermination du sexe chez les poissons sont extrêmement divers et changeants. Un grand nombre d'études a montré que le dimorphisme sexuel chez les vertébrés s'explique principalement par la sélection génétique au cours du processus évolutif (Bonduriansky R, 2009) et est la conséquence de l'expression différentielle des gènes liés au sexe lors du développement et la croissance de l'embryon, des larves ou des adultes (Williams & Carroll, 2009; Parsch & Ellegren, 2013). Ainsi, des travaux récents chez les esturgeons ont identifié certains gènes (Ex. Sox, dm-rt1, cyp17a1) présentant des expressions différentielles chez les mâles et les femelles à différents stades de maturité (Hale *et al.*, 2010; Ogden *et al.*, 2013; Yarmohammadi *et al.*, 2017). L'immense accumulation de données complètes de génomes, transcriptomes et protéomique de poissons d'élevage devrait fournir par ailleurs une base de données sans précédent pour explorer les mécanismes génétiques et moléculaires du dimorphisme sexuel (Gui & Zhu, 2012). Chez certaines espèces de poissons, des marqueurs spécifiques du sexe ont pu être identifiés par de nombreuses techniques, telles que l'AFLP (amplified fragment length polymorphism), les SNPs (single nucleotide polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), SSR (simple sequence repeats) et QTL (quantitative trait locus) (voir Table 2 and références in (Mei & Gui, 2015). Par exemple, en utilisant l'analyse de liaison à l'échelle du génome et la cartographie génétique d'association, (Kamiya *et al.*, 2012) ont mis en évidence qu'un seul polymorphisme SNP (C/G) du gène *Amhr2* était associé avec le sexe phénotypique chez des espèces de poissons du genre *Fugu* et *Takifugu*. Nos résultats montrent que bien que des SNPs aient été identifiés statistiquement comme discriminants du sexe à partir des données RADseq (séquenceur Ion Torrent), ils n'ont pas été validés par la méthode de génotypage Mass Array. Ce résultat corrobore des études récentes mettant en avant les taux d'erreur de génotypage souvent associés aux séquençages haut débit (Mastretta-Yanes 2015) estimés entre 0,1 et 10% selon les plateformes de séquençage. Dans une étude précédente, nous avons estimé un taux d'erreur pour notre espèce d'environ 10% pour le séquenceur Ion Torrent (Roques *et al.* 2018a). Pour explorer la différenciation génétique du sexe chez *A. sturio*, il serait intéressant de se concentrer sur les gènes situés sur des régions associées à la détermination du sexe identifiés chez d'autres espèces. L'analyse du transcriptome de l'esturgeon européen,

maintenant disponible (Patrice Gonzalez ; communication personnelle) devrait également faciliter le développement de nouvelles méthodes de détermination du sexe (par ex. expression de gènes ; identification de SNPs) chez cette espèce.

IV.4.2. Programme de repeuplement et population soutenue

Les espèces candidates à la réintroduction sont relativement rares car au préalable il faut s'assurer que l'habitat soit favorable et que les causes du déclin aient été identifiées et écartées. Le programme de repeuplement d'*A. sturio* peut être considéré comme une réussite depuis la première reproduction artificielle obtenue en juin 2007 à la station de à St-Seurin

Notamment, le suivi des individus *A. sturio* élevés en captivité et relâchés dans l'Estuaire aux cours des 10 dernières années a permis par exemple de réaliser une évaluation unique des modifications de la composition génétique qui se sont produites lors du repeuplement (Roques et al. 2018a). Dans la section IV.3.3.1, la génétique d'une grande proportion des captures a été comparée à celle des anciens géniteurs nés dans le milieu naturel et montre que même si la diversité génétique a été maintenue en sa presque totalité dans le milieu naturel, certaines compositions génétiques sont moins bien représentées (**Figure 25**). Lors d'une analyse antérieure d'un nombre réduit d'individus capturés, nous avons également observé ce résultat (Roques et al. 2016). Une absence ou une faible représentation de descendants de certaines paires de parents peut provenir de plusieurs facteurs, notamment une mortalité différentielle dû à la sélection agissant dans le milieu naturel ou à un plus faible succès reproducteur de certains géniteurs (Thrower & Hard, 2008; Schenekar & Weiss, 2017). Ces résultats mettent en avant la nécessité du suivi génétique de la population soutenue au cours du temps ainsi que l'importance des stratégies d'élevage visant à maintenir la plus grande proportion de la variabilité originelle de l'espèce.

Un autre aspect présenté dans la section IV.3.3.2 qui pourrait altérer l'intégrité génétique d'*A. sturio* dans le futur est l'hybridation potentielle avec l'espèce qui lui est le plus proche génétiquement, *A. oxyrinchus*. Ces couples « mixtes » pourraient donner naissance à des descendants hybrides, pouvant entraîner une introgression génétique d'*A. oxyrinchus* dans la population d'*A. sturio*. Ce phénomène est important d'autant plus chez les espèces à faible effectif puisque l'hybridation peut, dans certains cas, entraîner une perte d'adaptations locales augmentant les risques d'extinction (Barton, 2001). Des cas d'hybridation entre ces deux espèces ont été mis en évidence dans le passé à l'aide d'outils moléculaires (Chassaing *et al.*, 2013). Plus récemment, la présence d'*A. oxyrinchus* dans des zones au Sud de sa distribution (Elvira *et al.*, 2015) a mis en avant la nécessité d'une méthode de détection des hybrides potentiels. Le suivi génétique en routine sera ici également plus que jamais indispensable. Nos résultats montrent une nette différenciation génétique entre les deux espèces avec les marqueurs SNPs, ce qui permettra d'identifier les hybrides (c.à.d. avec une composition génétique intermédiaire entre les deux espèces, facilement identifiable). Etant donnée la grande étendue de l'aire de répartition marine de l'esturgeon européen, cette approche devrait être intégrée aux outils de gestion de cette espèce non seulement au niveau local, mais aussi au niveau européen.

IV.4.3. Vers d'autres outils génomiques

Il existe un grand intérêt concernant les changements génétiques qui surgissent en captivité, en particulier ceux qui peuvent être désavantageux dans le milieu naturel (Kitada *et al.*,

2009; Christie *et al.*, 2016; Schenekar & Weiss, 2017). D'ailleurs, le développement d'approches génomiques a largement augmenté la possibilité d'évaluer dans quelle mesure la sélection pouvait affecter à la diversité génétique et à la survie (Bierne *et al.*, 2016 ; Babin *et al.*, 2017; Attard *et al.*, 2018). Une étude récente (Waters *et al.*, 2018) qui présente les résultats des analyses d'association de caractères à l'échelle du génome chez le saumon sockeye d'élevage (*Oncorhynchus nerka*), a mis en évidence des régions importantes associées à plusieurs caractères importants du fitness.

Ces approches génomiques (par exemple, via les analyses RADseq ou RNAseq) pourraient être très intéressantes chez l'esturgeon européen. La comparaison du génome des populations captives et des individus relâchés ayant survécus au cours du temps dans le milieu naturel, pourraient apporter des informations pertinentes sur les mécanismes de survie de l'espèce et d'adaptabilité dans des conditions changeantes. L'identification de marqueurs en lien direct avec des caractères associés à sa survie permettrait notamment d'obtenir des outils plus pertinents pour la gestion et la conservation de cette espèce, par exemple en prédisant les «variants génétiques» les plus adaptés au milieu naturel.

Il n'existe à l'heure actuelle que de rares données génomiques disponibles concernant les esturgeons (Ogden *et al.*, 2013). Le séquençage du génome entier pour cette espèce non-modèle, et en danger critique d'extinction devrait être une priorité dans les prochaines années.

ANNEXE 1:

Table: Liste des 70 SNPs (ID) répartis en 2 multiplex (PLEX1 et PLEX2) sélectionnés pour le test de sexage génétique. Valeur et ordre de P issues des tests Fisher de différenciation entre les génotypes mâles et femelles, issus du RADseq2.

| PLEX | SNP ID | P value | Ordre P | PLEX | SNP ID | P value | Ordre P |
|-------|--------|----------|---------|-------|--------|----------|---------|
| PLEX1 | 22985 | 1,51E-05 | P02 | PLEX2 | 21402 | 9,29E-06 | P01 |
| PLEX1 | 26928 | 1,89E-05 | P03 | PLEX2 | 14448 | 0,00159 | P18 |
| PLEX1 | 17038 | 0,00019 | P05 | PLEX2 | 20729 | 0,00193 | P20 |
| PLEX1 | 13495 | 0,00040 | P07 | PLEX2 | 5261 | 0,00208 | P23 |
| PLEX1 | 16580 | 0,00067 | P10 | PLEX2 | 13586 | 0,00243 | P24 |
| PLEX1 | 17036 | 0,00105 | P12 | PLEX2 | 26533 | 0,00308 | P26 |
| PLEX1 | 7329 | 0,00117 | P15 | PLEX2 | 6708 | 0,00336 | P27 |
| PLEX1 | 6452 | 0,00133 | P17 | PLEX2 | 23189 | 0,00460 | P29 |
| PLEX1 | 17516 | 0,00185 | P19 | PLEX2 | 5170 | 0,00543 | P31 |
| PLEX1 | 25120 | 0,00403 | P28 | PLEX2 | 21463 | 0,00711 | P36 |
| PLEX1 | 16754 | 0,00621 | P32 | PLEX2 | 3528 | 0,01302 | P44 |
| PLEX1 | 22063 | 0,00688 | P33 | PLEX2 | 31489 | 0,01437 | P47 |
| PLEX1 | 14185 | 0,00693 | P34 | PLEX2 | 20706 | 0,01492 | P51 |
| PLEX1 | 4659 | 0,00765 | P37 | PLEX2 | 8703 | 0,01816 | P58 |
| PLEX1 | 20247 | 0,00820 | P38 | PLEX2 | 20973 | 0,02561 | P68 |
| PLEX1 | 7856 | 0,00827 | P39 | PLEX2 | 2003 | 0,02636 | P70 |
| PLEX1 | 15559 | 0,01133 | P41 | PLEX2 | 22626 | 0,02643 | P71 |
| PLEX1 | 12745 | 0,01155 | P42 | PLEX2 | 838 | 0,02644 | P72 |
| PLEX1 | 7875 | 0,01201 | P43 | PLEX2 | 5173 | 0,02690 | P73 |
| PLEX1 | 3512 | 0,01418 | P45 | PLEX2 | 13661 | 0,02692 | P74 |
| PLEX1 | 17650 | 0,01428 | P46 | PLEX2 | 4692 | 0,03467 | P83 |
| PLEX1 | 15466 | 0,01452 | P48 | PLEX2 | 33398 | 0,03569 | P84 |
| PLEX1 | 32659 | 0,01559 | P53 | PLEX2 | 17471 | 0,03571 | P85 |
| PLEX1 | 12014 | 0,01563 | P54 | PLEX2 | 3192 | 0,03634 | P86 |
| PLEX1 | 34930 | 0,01710 | P57 | PLEX2 | 10774 | 0,03995 | P90 |
| PLEX1 | 17798 | 0,01867 | P59 | PLEX2 | 4664 | 0,04014 | P91 |
| PLEX1 | 8861 | 0,02017 | P60 | PLEX2 | 8907 | 0,04198 | P93 |
| PLEX1 | 20618 | 0,02248 | P63 | PLEX2 | 14228 | 0,04203 | P94 |
| PLEX1 | 28961 | 0,02329 | P64 | PLEX2 | 28210 | 0,04404 | P95 |
| PLEX1 | 1034 | 0,02392 | P66 | PLEX2 | 24152 | 0,04432 | P97 |
| PLEX1 | 24872 | 0,02545 | P67 | | | | |
| PLEX1 | 4892 | 0,02902 | P77 | | | | |
| PLEX1 | 20287 | 0,03064 | P78 | | | | |
| PLEX1 | 6086 | 0,03219 | P79 | | | | |
| PLEX1 | 38628 | 0,03228 | P80 | | | | |
| PLEX1 | 16092 | 0,03634 | P87 | | | | |
| PLEX1 | 24111 | 0,03634 | P88 | | | | |
| PLEX1 | 2139 | 0,03863 | P89 | | | | |
| PLEX1 | 27810 | 0,04404 | P95 | | | | |
| PLEX1 | 10072 | 0,04448 | P98 | | | | |

ANNEXE 2 : Résultats de l'amplification croisée de N=79 SNPs de *A. sturio* chez *A. oxyrinchus*

| Locus ID | Amplification | Alleles | Locus ID | Amplification | Alleles |
|----------|---------------|---------|----------|---------------|---------|
| 489 | oui | 1 | 14507 | oui | 1 |
| 772 | oui | 1 | 15052 | oui | 1 |
| 1034 | oui | 1 | 16009 | oui | 1 |
| 1667 | oui | 1 | 16258 | oui | 1 |
| 1944 | oui | 1 | 16285 | oui | 2 |
| 2130 | oui | 1 | 16574 | oui | 1 |
| 2473 | oui | 1 | 16874 | oui | 1 |
| 2544 | oui | 1 | 17039 | oui | 1 |
| 2936 | oui | 1 | 17147 | oui | 1 |
| 3229 | oui | 1 | 17216 | oui | 1 |
| 3461 | oui | 1 | 17471 | oui | 1 |
| 3762 | oui | 1 | 17646 | oui | 1 |
| 3931 | oui | 1 | 18308 | oui | 1 |
| 4648 | oui | 1 | 18413 | oui | 1 |
| 5600 | oui | 1 | 18856 | oui | 1 |
| 6059 | oui | 1 | 20286 | oui | 1 |
| 6420 | oui | 1 | 20674 | oui | 1 |
| 6778 | oui | 1 | 21330 | oui | 1 |
| 6836 | oui | 1 | 21498 | oui | 1 |
| 7329 | oui | 1 | 21527 | oui | 1 |
| 7561 | oui | 1 | 21723 | oui | 1 |
| 7615 | oui | 2 | 22296 | oui | 1 |
| 7684 | oui | 1 | 22541 | oui | 1 |
| 7912 | oui | 1 | 22557 | oui | 1 |
| 8590 | oui | 1 | 22813 | oui | 1 |
| 8813 | oui | 1 | 23321 | oui | 1 |
| 9169 | oui | 1 | 23523 | oui | 2 |
| 9857 | oui | 1 | 23694 | oui | 1 |
| 10202 | oui | 1 | 24080 | oui | 1 |
| 10256 | oui | 1 | 24102 | oui | 1 |
| 10338 | oui | 1 | 24178 | oui | 1 |
| 11262 | oui | 1 | 24244 | oui | 1 |
| 11374 | oui | 2 | 24793 | oui | 1 |
| 12158 | oui | 1 | 24843 | oui | 1 |
| 12171 | oui | 1 | 24872 | oui | 1 |
| 12523 | oui | 1 | 12719 | non | 0 |
| 13520 | oui | 1 | 13935 | non | 0 |
| 14106 | oui | 2 | 14899 | non | 0 |
| 14268 | oui | 1 | 17876 | non | 0 |
| | | | 23756 | non | 0 |

Chapitre V : Suivi de la population d'esturgeons européens en milieu naturel - focus sur les échantillonnages 2017

Acolas M.L.¹, Le Barh R.¹, Mas L.², Souben J.³, Roques S.¹, Gazeau C.¹, Jatteau P.¹, Bigot J.F.⁴

¹Irstea, centre de Bordeaux, unité EABX

²IMA, Institut des milieux aquatiques, Bordeaux

³CNPMEM, Comité National des Pêches Maritimes et des Elevages Marins, Paris

⁴Genavir, gestion de navires de recherche, Plouzané

Objectifs

Suivre l'état de la population, documenter l'évolution des différentes cohortes, analyser l'intégration des poissons issus de reproductions *ex situ* et renseigner les captures accidentelles.

Intérêts

Avoir une vision à jour sur l'état de la population en milieu naturel, estimer les effets des mesures de soutien et de sensibilisation.

V.1 Introduction

La population d'esturgeons européens est suivie en milieu naturel par le biais de deux méthodes : des échantillonnages scientifiques au chalut réalisés par Irstea dans les secteurs chalutables de l'estuaire de la Gironde (action 15 du PNA); un recueil des observations citoyennes (déclarations de captures accidentelles ou d'observations par tous citoyens) d'*A. sturio* géré conjointement par le CNPMEM, l'IMA et Irstea ; Irstea ayant en charge la gestion de la base des observations citoyennes (action 7 du PNA) dans le cadre du PNA *sturio* (Dreal, 2011). Le prochain PNA, actuellement en cours de finalisation, intégrera également des actions spécifiques pour ces suivis en milieu naturel.

Depuis 2007 les opérations de repeuplement d'*A. sturio* sont régulières et plus d'1.6 millions d'individus ont été relâchés entre 2007 et 2014. Cependant, en 2015, 2016 et 2017, les reproductions assistées ont échoué et il n'y a pas eu de lâcher de larves ou de juvéniles. Les campagnes de chalutage scientifiques sont mises en œuvre depuis 2009 (Acolas *et al.*, 2011) sur le modèle des échantillonnages réalisés historiquement sur la population sauvage (Rochard *et al.*, 2001) et ce chapitre présente le bilan des captures de 2017. Il s'agit de caractériser la fraction estuarienne de la population.

Depuis 2007, en parallèle du programme de repeuplement, la sensibilisation auprès des pêcheurs a été assurée par le CNPMEM et depuis 2012 également par l'IMA en tant que relai local. Au cours de l'année 2016, l'interlocuteur du CNPMEM a changé, Nicolas Michelet a transféré ses fonctions à Jérémie Souben. Les opérations d'information et de sensibilisation ont donc permis de recueillir un nombre croissant de déclarations ces dernières années ce qui nous renseigne sur l'aire de distribution de la population soutenue.

Fin 2017, plusieurs aspects de ces travaux en milieu naturel, ont été présentés lors du 8^{ième} symposium international sur les esturgeons à Vienne (voir Chapitre VI).

V.2 Matériels et Méthodes

V.2.1 Campagnes d'échantillonnage « Sturat » dans l'estuaire de la Gironde

Les campagnes d'échantillonnage par chalutage dans l'estuaire de la Gironde sont réalisées environ tous les 2 mois à l'aide de deux grilles d'échantillonnage utilisées alternativement (**Figure 27**). Ces deux grilles décalées (grille 1 et grille 2) sont utilisées afin d'éviter un effet bordure dans l'échantillonnage. Les zones 15A (la plus amont), 10A et 10B (en rive gauche) sont identiques pour les deux grilles. Une partie de la zone 9 (la plus aval en rive droite) a été supprimée dans la grille 2 car il est impossible de faire un trait de 30 min dans ce secteur décalé à cause de la nature des fonds. Ces grilles représentent les principaux secteurs chalutables de l'estuaire médian et aval. En effet, il est impossible de chaluter dans le chenal de navigation, dans les accès portuaires, dans les zones intertidales et dans les secteurs présentant des hauts fonds.



Figure 27 : Grilles d'échantillonnage utilisées alternativement lors des campagnes Sturat. Les zones sont indiquées par un Z suivi du numéro de la zone. Les zones 10A, 10B et 15A sont identiques pour les 2 grilles.

Un trait de chalut dure environ 30 min, 2 traits par zone sont réalisés à chaque campagne d'échantillonnage dans la mesure du possible. Pour chaque trait, l'ensemble des espèces de poissons est caractérisé et dénombré (Annexe 1 Tableau récapitulatif des données brutes), 30 individus de chaque espèce sont mesurés. Une attention particulière est apportée aux poissons migrateurs. Pour les anguilles, le diamètre oculaire ainsi que la longueur de la pectorale sont mesurés afin d'évaluer le taux d'argenture. Pour les mullets, des écailles sont prélevées afin d'évaluer la structure en âge de la population. En ce qui concerne les esturgeons, les individus capturés sont mesurés, pesés et marqués avec un identifiant unique en interne (pit-tag) et en externe (Hall-print) ; les marques externes permettant également d'être recensées lors de captures accidentelles. Des prélèvements de morceaux de nageoires sont réalisés en vue d'analyses génétiques (assignation parentale cf. Chapitre IV) (Roques *et al.*, 2016) et d'analyses isotopiques (régime alimentaire et répartition spatiale). Sur une partie des individus, un prélèvement de rayon est réalisé afin d'estimer

l'âge des individus (Rochard & Jatteau, 1991) et un lavage gastrique est réalisé afin de qualifier et de quantifier la nature des proies consommées (Brosse *et al.*, 2002).

Depuis 2015, les données acquises lors de Sturat ont été compilées dans une base de données dédiées « STURAT » permettant de sécuriser les données et de faciliter leur interrogation (construction ingénieur base de données E. Quinton ; responsable Irstea M.L. Acolas). La saisie sur le bateau est réalisée via une application dédiée « STURATj ». Depuis novembre 2016, l'équipage « marin » des campagnes est assurée par du personnel GENAVIR (groupement pour la gestion de navires de recherche), 2 biologistes Irstea assurant à bord la manipulation des poissons et l'acquisition des données.

V.2.2 Recensement des déclarations de captures accidentelles d'esturgeons, gestion de la base de données

Les déclarations de captures accidentelles d'un esturgeon européen peuvent être faites auprès des trois organismes impliqués (CNPMM, IMA et Irstea) par des pêcheurs professionnels, des pêcheurs amateurs mais aussi par tous citoyens qui croise un esturgeon européen dans son activité (*i.e.* échouage). Ces 3 organismes interagissent par le biais de fiches de déclarations pour échanger les informations concernant les captures (localisation de la capture, nombre d'individus capturés, caractéristiques du poisson, engins de pêche). Les déclarations concernent les fleuves, l'estuaire de la Gironde et la façade maritime Atlantique Manche et Mer du Nord. Les déclarations en eaux douces peuvent parfois correspondre à des espèces d'esturgeons non autochtones qui sont également recensées dans la base de données mais dont les résultats ne seront pas présentés ici. Le CNPMM et l'IMA recontactent et remercient systématiquement les pêcheurs déclarants. Irstea assure la mise à jour de la base de données et transfère les données mises à jour environ tous les 3 mois aux partenaires (CNPMM, IMA) ainsi qu'au coordinateur et animateur du PNA (DREAL et MIGADO). Depuis 2015, Irstea a conçu et maintient (construction ingénieur base de données E. Quinton ; responsable Irstea M.L. Acolas) une application web « STURWILD » permettant de saisir, sauvegarder et extraire ces données de manière à faciliter les échanges d'informations entre les partenaires.

V.3 Résultats-Discussion

V.3.1 Campagne d'échantillonnage « Sturat » dans l'estuaire de la Gironde

Caractéristiques des individus : biométrie, âge et stades de lâcher

Entre 2009 et 2017, 432 captures d'esturgeons ont été réalisées dont 8,8% de recaptures soit 393 individus différents. En 2017, 33 captures ont été réalisées (32 individus différents) au cours de 129 traits de chalut soit une surface de 6,8 km² échantillonnée dans l'estuaire.

En 2017, les individus mesuraient entre 58,5 et 160 cm en longueur totale (moyenne 95.1 cm ± écart-type (ET) 26,0) et pesaient entre 820 g et 20,6 kg (moyenne 4.9 kg ± ET 4,5). Quatorze DST (marques à mémoire enregistrant profondeur, salinité et température) ont été posées sur des individus pesant entre 3,4 et 20 kg. Les années de naissance de l'ensemble des individus, estimées à la fois grâce aux techniques d'assignation parentale et aux lectures de rayons sont présentées dans la **Figure 28**. Les mêmes informations pour l'année 2016, individus dont les lectures d'âge ont été réalisés en 2017 sont présentées en **Figure 29**.

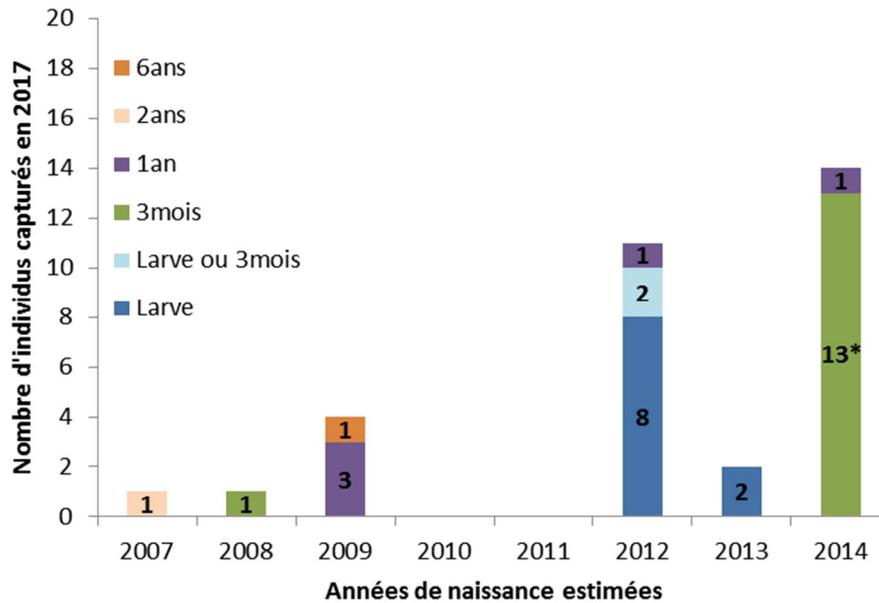


Figure 28 : Nombre d'individus capturés en 2017 par cohortes (années de naissance) et par stade de lâcher.

*indique que parmi les 13 individus nés en 2014 lâchés à 3 mois il y a un individu qui a été capturé 2 fois au cours de l'année 2017 soit 12 individus différents au total.

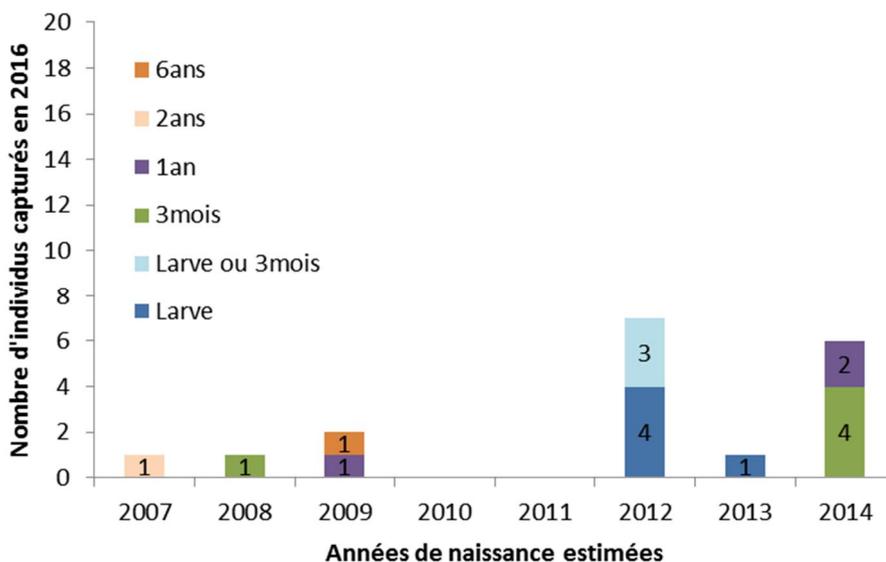


Figure 29 : Nombre d'individus capturés en 2016 par cohortes (années de naissance) et par stade de lâcher.

En 2017, 5 des 6 cohortes lâchées (pas de lâcher en 2010) ont été capturées, la majorité des individus appartenant à la cohorte 2014 (3 ans) puis à la cohorte 2012 (5 ans).

La cohorte 2011 est absente des prélèvements, elle a été par ailleurs très peu représentée au cours des 3 dernières années, ce qui peut être interprété comme un échec de cette année de lâcher. Au vu du cycle de vie de l'espèce il est logique de capturer peu d'individus issus des individus les plus âgés qui vivent essentiellement en mer.

Concernant les captures de 2016 (**Figure 29**), les individus ont été âgés en 2017. On observe un patron de cohortes présentes en estuaire similaire à 2017 même si peu d'individus ont été capturés en 2016 (n=18).

Les stades de lâchers des individus recapturés sont variables selon les cohortes. Pour la cohorte 2014, on retrouve principalement des individus lâchés à 3 mois, pour les cohortes 2012 et 2013, principalement des individus lâchés au stade larvaire et pour la cohorte 2009, des individus relâchés à 1 an. Pour mémoire, il n'y a pas eu de lâcher aux stades larves au cours des 3 premières années de repeuplement (2007, 2008, 2009).

Tous les individus capturés en 2016 et 2017 ont pu être attribués à une cohorte lâchée ce qui suggère qu'il n'y a pas eu de reproduction naturelle récente.

Captures par unité d'effort

Les captures par unité d'effort (CPUE) annuelles ont été calculées à partir des CPUE par trait, c'est-à-dire la densité par trait (nombre d'individus/surface du trait), moyennées à l'échelle des zones d'échantillonnage pour les deux grilles (**Figure 30**).

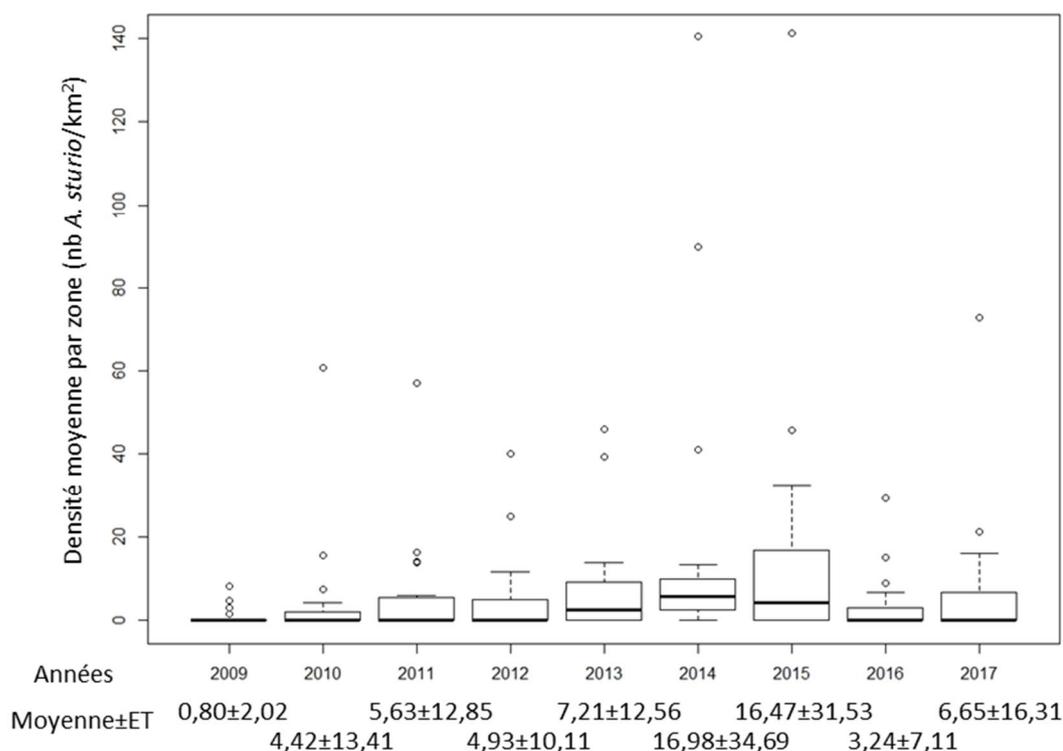


Figure 30 : Box plot des captures par unité d'effort (CPUE) pour chaque année de capture. La moyenne annuelle et son écartype (ET) sont indiqués pour chaque année sous la barre des abscisses en nombre d'individus par km².

La densité estimée en 2017 a doublé comparé à 2016. L'arrivée dans l'estuaire médian ou une meilleure capturabilité des individus de la cohorte 2014 maintenant âgé de 3 ans pourrait expliquer cette augmentation, une densité moyenne de 6,6 individus (indiv.)/km² se situant dans la gamme des valeurs estimées entre 2010 et 2013 ; les années 2014 et 2015 étant exceptionnelles (>16 indiv./km²).

Si on observe un peu plus en détail les CPUE par zones (**Figure 31**), en 2017 des esturgeons ont été capturés surtout dans les secteurs aval de l'estuaire avec plus de 70 indiv./m² estimés dans la zone 9. On observe également des captures en rive gauche (zone 10A 20 indiv./m²) comme en 2016 (>20 indiv./km²) ce qui est rare. Seulement quelques captures avaient été recensées en 2010 (zone 10A) et en 2012 (zone 10B) mais à des densités inférieures (moins de 8 individus par km²). Globalement la rive gauche est relativement peu échantillonnée (seulement 2 zones) en raison de la présence du chenal de navigation mais les individus peuvent se déplacer en fonction de la production des proies.

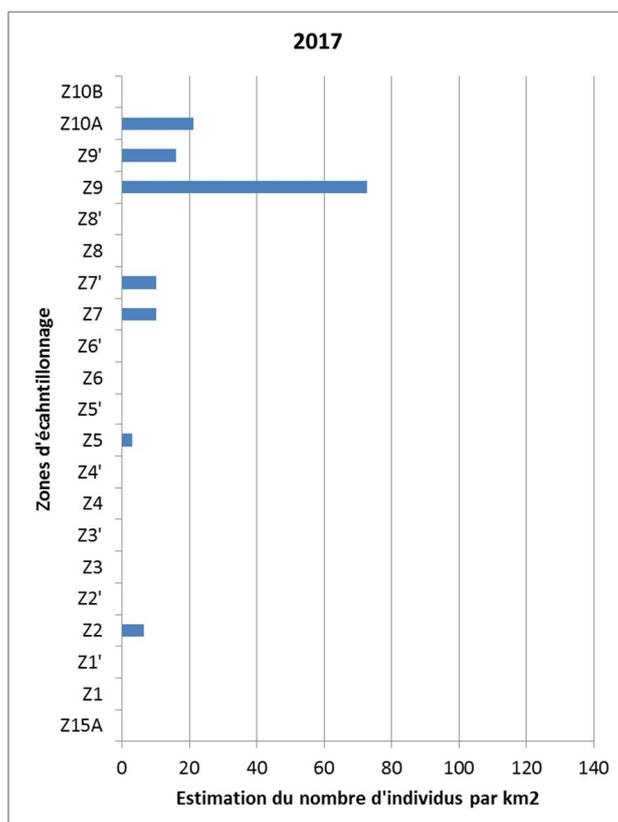


Figure 31 : Estimation des CPUE par zone d'échantillonnage.

Bol alimentaire

Sont présentés ici les résultats des lavages gastriques de 2016 et 2017 (**Figure 32 et Figure 33**). En 2016, les 18 individus capturés ont subi un lavage gastrique, 6 individus avaient l'estomac vide soit un taux de vacuité de 33%. En 2017, 29 lavages gastriques ont été réalisés, 3 individus avaient l'estomac vide soit un taux de vacuité de 10%. Les taux de vacuité oscillant entre 37% et 16% sur la période 2010-2015 (Vega, 2016), 2016 constitue une année avec un fort taux de vacuité et 2017 une année avec un faible taux de vacuité ce qui pourrait suggérer la disponibilité de moins de proies dans la zone d'échantillonnage en 2016 qu'en 2017 et ainsi expliquer le faible effectif capturé en 2016, les individus privilégiant d'autres secteurs.

Une nouvelle proie est apparue dans les contenus stomacaux en 2017, un mollusque bivalve hétérodonte *Barnea candida*, consommé en août 2017 dans la zone 9 de manière quasi exclusive, les mollusques étant plutôt rares dans les contenus stomacaux d'esturgeons. Pour les 2 années (Figures 6 et 7), comme sur la période précédente 2009-2015 (Vega 2016), les principales proies restent les annélides polychètes avec *Heteromastus filiformis* et les

crustacés isopodes (principalement *Cyathura carinata*). L'annélide polychète, *B. ligERICA* qui avait remplacé *H. filiformis* en 2015 n'est plus présent dans les échantillons.

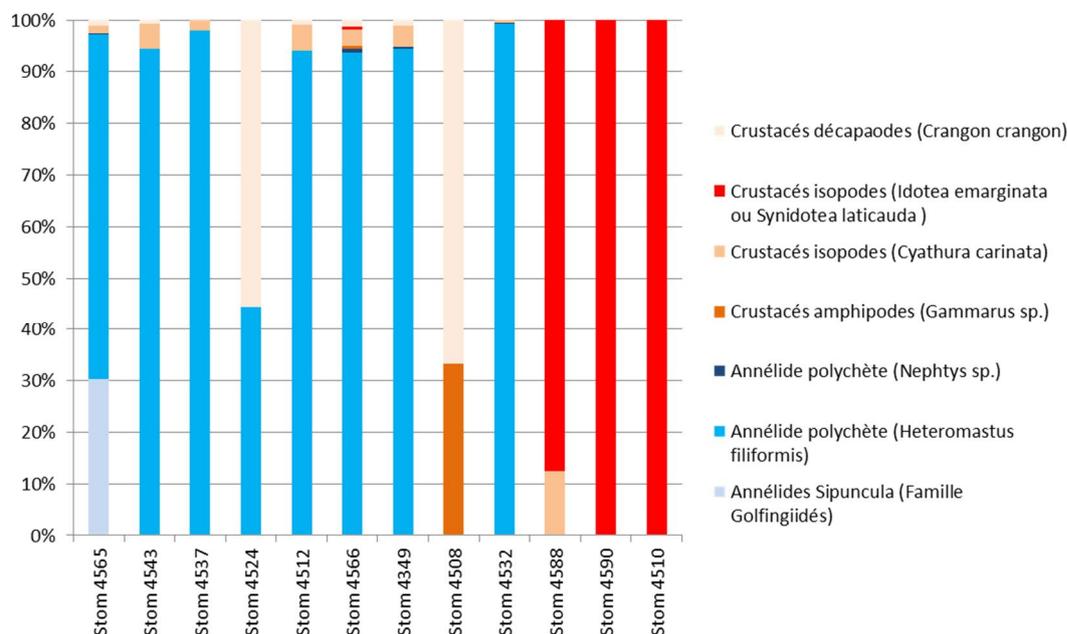


Figure 32 : Proportion des différentes espèces dans les contenus stomacaux des esturgeons capturés en 2016.

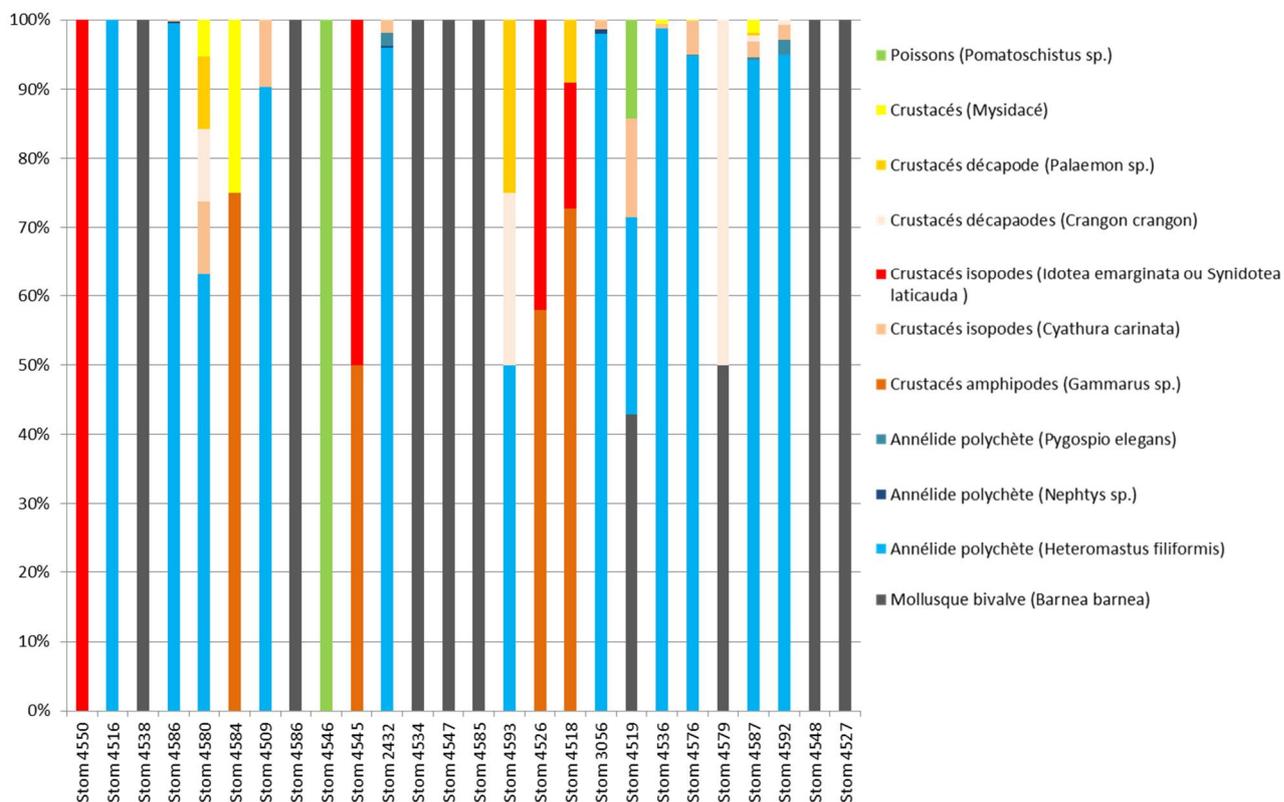


Figure 33 : Proportion des différentes espèces dans les contenus stomacaux des esturgeons capturés en 2017.

V.3.2 Recensement des déclarations de captures accidentelles d'esturgeons

Entre 2006 et 2017, 1390 observations ont été recensées (**Tableau 15, Figure 34**) en Europe dont 1360 en France soit près de 98% des observations.

Tableau 15 : Bilan du nombre d'observations d'esturgeons européens sur la période 2006-2017 en mer (côtes pays frontaliers, côtes françaises, panache estuaire Gironde), dans l'estuaire de la Gironde et dans les fleuves (principalement Dordogne et Garonne).

*En 2012, les captures en mer « côtes pays Européens » correspondent à des recaptures au Pays Bas de lâchers expérimentaux d'*A. sturio* dans le Rhin (Brevé *et al.*, 2014), c'est également le cas pour 1 des poissons capturé en fleuve.

**Les pays européens où des déclarations ont été recensées sont les suivants : Angleterre, Belgique, Danemark, Espagne, Norvège et Pays bas.

| | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012* | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | Total |
|--------------------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|-------------|
| Côtes pays Européens** | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 5 | 0 | 1 | 1 | 9 | 8 | 28 |
| Côtes françaises | 1 | 3 | 0 | 1 | 2 | 4 | 7 | 16 | 32 | 34 | 29 | 23 | 152 |
| Panache estuaire Gironde | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 146 | 183 | 106 | 14 | 21 | 20 | 490 |
| Estuaire Gironde | 0 | 0 | 1 | 4 | 31 | 114 | 164 | 54 | 64 | 108 | 110 | 48 | 698 |
| Fleuves | 0 | 1 | 1 | 5 | 1 | 0 | 4 | 6 | 2 | 2 | 0 | 0 | 22 |
| Total | 1 | 6 | 3 | 10 | 35 | 118 | 326 | 259 | 205 | 159 | 169 | 99 | 1390 |

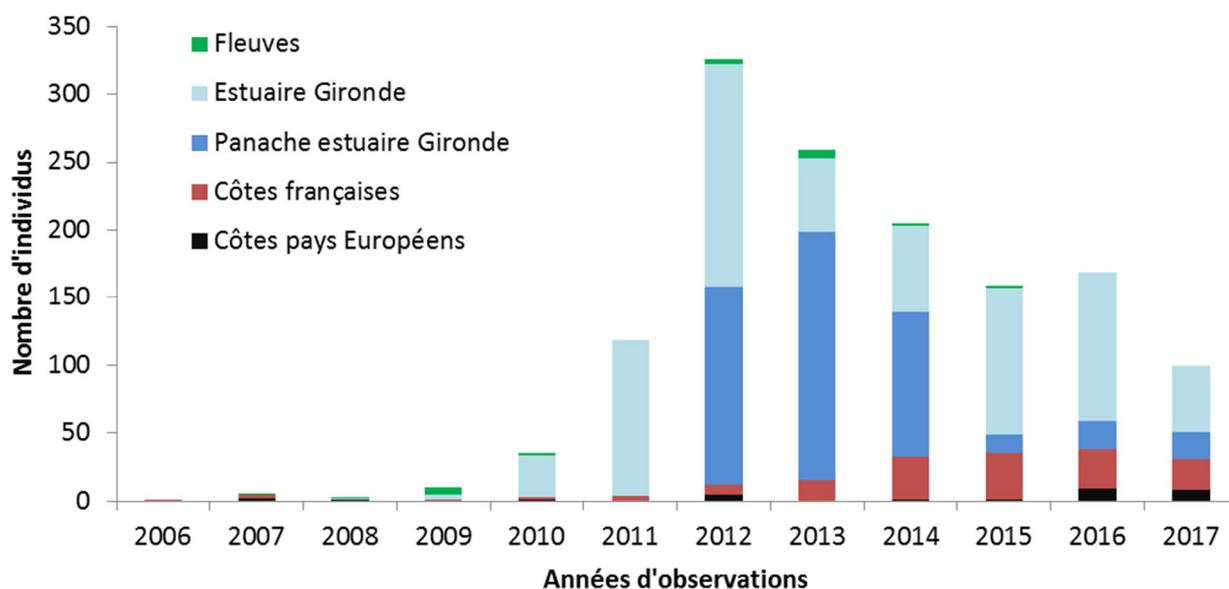


Figure 34 : Evolution du nombre d'observations par grand type de milieu sur la période 2006-2017.

Le pic d'observations déclarées se situe l'année 2012 (326 déclarations), il peut s'expliquer par l'effort de sensibilisation de la part des partenaires qui s'est intensifié en 2011 avec le lancement du premier PNA. Puis le nombre d'observation diminue sensiblement pour à peine atteindre 100 déclarations en 2017. Il est difficile d'interpréter cette baisse du nombre de déclarations. Celles-ci sont basées sur le volontariat, il peut s'agir soit d'une baisse du taux de déclarations, les esturgeons devenant plus « communs » dans le milieu, les observateurs peuvent être moins enclins à les déclarer ou bien il se peut qu'il y ait moins

de poissons. Ce sont des observations citoyennes donc les aspects quantitatifs sont difficilement interprétables.

Les observations dans le panache de l'estuaire de la Gironde sont conséquentes en 2012, 2013 et 2014 puis chutent ces 3 dernières années. Ce phénomène s'expliquerait par une baisse de l'effort de pêche dans ce secteur d'après les représentants des pêcheurs.

Les observations dans l'estuaire de la Gironde sont variables mais se maintiennent. L'absence de repeuplement de jeunes stades depuis 2015 implique également une absence des cohortes âgées de 1 an et 2 ans en 2017 ce qui peut expliquer le faible nombre d'observations en 2017 dans ce milieu (48 individus).

Les observations en mers (hors panache estuaire) sont stables depuis 2014 soit une trentaine d'individus déclarés chaque année. Plus récemment (2016, 2017) on observe une augmentation des déclarations sur les côtes des pays voisins soit 12 en mer du Nord (Danemark, Pays Bas, Belgique), 3 en Atlantique (Angleterre, Espagne) et 2 en Manche (Angleterre). Ceci traduit un signe d'extension de l'aire de répartition de la population soutenue avec notamment la capture la plus au sud jamais recensée en Galice en avril 2017 (**Figure 35**). Le poisson était vivant à la capture mais a été ramené mort à l'aquarium de La Corogne et récupéré par la suite par les scientifiques de l'université de St Jacques de Compostelle. Le poisson portait un pit-tag et correspondait à un individu issu du repeuplement né en 2009 et relâché à 1 an en Dordogne.

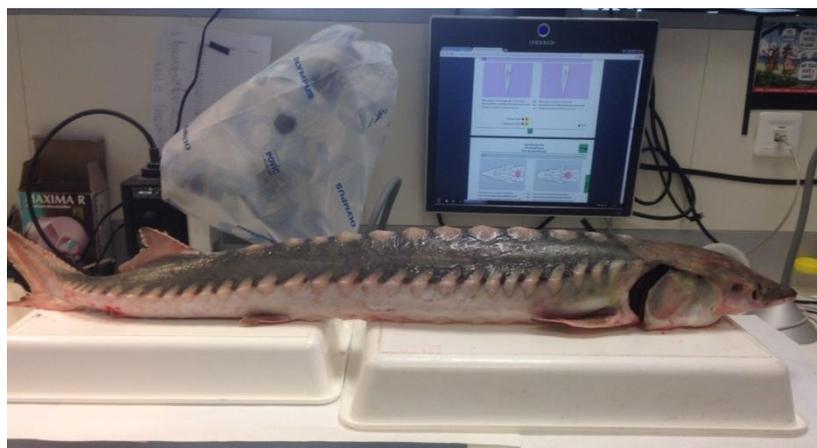


Figure 35 : *A. sturio* capturé en Galice (Espagne) issu d'un repeuplement en Dordogne. Longueur totale : 110 cm ; Poids 6kg. © F. Cobo, université St jacques de Compostelle, Espagne.

En 2017 les poissons ont été mesurés dans 82 % des captures et le poids a été estimé dans 19% des cas. Les longueurs totales s'étendaient de 50 à 180 cm (moyenne 108 cm \pm ET254 cm) et les poids entre 1.3 et 18 kg (6.8 \pm ET4.8 kg).

Les poissons déclarés marqués étaient au nombre de 8 soit 8% des captures. 3 individus portaient une DST, 2 ont été laissées en place (Figure 10), la troisième nous a été renvoyée mais elle avait été posée dans la semaine donc ne contenait pas d'informations. Pour 2 individus le numéro de la marque externe n'a pas été noté.

Neuf poissons de plus de 140 cm dont 4 dans l'estuaire de la Gironde ou son panache ont été observés. Ceci constitue un indicateur de la présence d'individus qui seront bientôt en âge de se reproduire en milieu naturel, indicateur en augmentation depuis 2015 (Acolas *et al.*, 2017). Il n'y a pas eu d'observation de poissons de petite taille pouvant être indicateur d'une reproduction naturelle.

En 2017 la majorité des poissons ont été déclarés vivants et en bon état (1 en état moyen, 1 en état critique) et ont été relâchés vivants (**Figure 36**). Six individus ont été déclarés morts soit 6% du total des captures ce qui correspond au taux de mortalité le plus élevé au cours des 9 dernières années (2% de mortalité sur la période 2006-2017). Il s'agit de 2 individus marqués capturés morts dans le panache de l'estuaire : 1 dans un filet trémail, 1 flottant en surface le lendemain de son marquage lors d'une campagne Sturat, âgés respectivement à 9 et 5 ans. Les 4 autres correspondent à des captures en mer dont 1 en Galice (évoquée précédemment), 2 dans le secteur sud Bretagne (morts à la capture) ramenés au muséum de Concarneau (dont 1 débarqué à la criée de Lorient juste avant) et 1 en Manche sur les côtes anglaises dont l'état à la capture reste inconnu et dont le cadavre a été transféré au muséum de Londres. Pour ce dernier la demande d'échantillon auprès du muséum est toujours en cours. Pour l'esturgeon ramené à Concarneau, l'individu a été naturalisé et nous avons obtenu des échantillons de nageoires permettant de l'attribuer à la cohorte 2013 (individu lâché à 3 mois en Garonne) (**Figure 37**). Pour celui ramené à Lorient, nous avons également obtenus des échantillons et il s'agissait d'un individu de la cohorte 2012 (lâché au stade larve en Garonne).



Figure 36 : Individus capturés en bon état et relâchés vivants. A gauche : individu capturé entre Calais et Dunkerque en avril 2017 à 10 m de profondeur, 80 cm LT pour 5 kg. © anonyme. A droite, individu capturé en Belgique en Face d'Ostende en mars 2017, 110 cm équipé d'une DST qui a été laissée en place (poisson marqué lors de la campagne Sturat de novembre 2016). © anonyme.



Figure 37 : Capture accidentelle au filet trémail, poisson mort, Concarneau, avril 2017, Lt 92 cm 3 kg. © S. Iglesias MNHN.

V.4 Conclusions-Perspectives

V.4.1 Campagnes d'échantillonnage « Sturat » dans l'estuaire de la Gironde

Après 2 années de fortes abondances d'*A. sturio* en 2014 et 2015 dans l'estuaire, on assiste en 2016 à une baisse importante des effectifs puis à une remontée en 2017 équivalente aux années précédentes (2013, 2010), les individus âgés de 3 ans (cohorte 2014) composant la majeure partie de l'échantillonnage. Comme en 2016 on assiste à une distribution spatiale des individus un peu atypique avec une utilisation plus marquée de la rive gauche qui pourrait suggérer que les individus s'alimenteraient en dehors de la grille d'échantillonnage, surtout localisée en rive droite. Les individus échantillonnés en 2016 et en 2017, ont tous pu être réattribués à une cohorte correspondant aux années de lâcher ce qui suggère qu'il n'y a pas eu de reproduction naturelle récente (2015, 2016). L'année prochaine, étant donné qu'il n'y a pas eu de repeuplement de jeunes stades après 2014, on peut s'attendre à une baisse des effectifs en estuaire puisque la majorité des individus devraient migrer en mer.

En 2016, le stage de J Vega avait permis une analyse assez complète des contenus stomacaux (Vega, 2016). Les analyses des contenus de 2016 et 2017 confirment les proies principales (annélides polychètes et isopodes) mais en 2017 dans une zone aval nous avons identifié une consommation conséquente d'un mollusque bivalve sur une campagne de pêche.

V.4.2 Recensement des déclarations de captures accidentelles d'esturgeons

Le recensement des déclarations de captures accidentelles est très important pour la réussite du programme de repeuplement de l'espèce. Il permet de sensibiliser les pêcheurs, de dialoguer avec eux, d'évaluer l'aire de répartition de la population soutenue et d'évaluer qualitativement la présence de l'espèce dans les différents milieux qui ne peuvent pas être échantillonnés par ailleurs.

L'information reste cependant qualitative car il y a certaines limites à l'exploitation des données :

- les localisations sont liées à l'activité de pêche, si un secteur n'est pas pêché cela ne signifie pas qu'il n'y a pas d'esturgeon et selon l'année les secteurs de pêche peuvent changer en fonction des conditions météorologiques et de la localisation des espèces ciblées donc les déclarations ne sont pas forcément représentatives d'une année à l'autre.
- les déclarations sont fondées sur le volontariat ce qui implique que l'ensemble des citoyens ne déclare peut être pas les captures accidentelles.
- les engins et les pratiques de pêche sont variés donc on ne peut pas réaliser une estimation quantitative des captures.

Pour l'année 2017, les indicateurs principaux sont :

(1) la confirmation, comme en 2016, de l'augmentation des observations sur les côtes des pays frontaliers qui indique la colonisation par la population soutenue de l'aire de répartition connue pour la population sauvage. Une capture exceptionnelle de par sa position très au sud en Galice est notable.

(2) les observations près des côtes françaises d'individus de grandes tailles plus nombreux qui laissent présager l'arrivée à maturation des futurs géniteurs. Cependant aucun individu de petite taille, pouvant être un signe de reproduction naturelle, n'a été recensé, ce qui est cohérent avec l'indicateur « Sturat ».

(3) une baisse du nombre de déclarations de près de 50% comparé à la moyenne des 6 dernières années avec un taux de mortalité supérieur (6%).

En 2017, un travail spécifique de cartographie des captures dans l'espace du parc naturel Marin Gironde Pertuis (AMP) et au sein et à proximité du site N2000 Hourtin a été réalisé (Acolas, 2017b; a).

Les suivis ont été présentés lors de la ISS8 (8^{ème} congrès international esturgeons) en septembre 2017 : 2 posters et une présentation invitée lors du workshop « population assessment » :

Acolas M.L., Le Barh R., Roques S., Lambert P., Bigot J.F., Gazeau C., Rochard E., Jatteau P., Mas L., Souben J., Michelet N.. 2017. Post release monitoring strategies for *Acipenser sturio* in France. **Oral presentation**, ISS8 8th International Symposium on Sturgeons, September 10-16 2017, Vienna, Austria. *Workshop « Stock assessment » - Vienna - 13th September 2017.*

Acolas M.L., Le Barh R., Roques S., Lambert P., Bigot J.F., Gazeau C., Rochard E., Jatteau P., Mas L., Souben J., Michelet N. 2017. Importance of monitoring methods in a restoration program: case study of *Acipenser sturio* sustained population. **Poster communication**, ISS8 8th International Symposium on Sturgeons, September 10-16 2017, Vienna, Austria. *Workshop « Stock assessment » - Vienna - 13th September 2017.*

Acolas M.L., Vega J., Lassalle G. Feeding ecology of the European sturgeon sustained population in the Gironde estuary. 2017. **Poster communication**, ISS8 8th International Symposium on Sturgeons, September 10-16 2017, Vienna, Austria. *Workshop « Stock assessment » - Vienna - 13th September 2017.*

Pour 2018, une communication via un poster lors du congrès SIBIC VII (congrès ibérique d'ichtyologie) est envisagée concernant la capture de l'individu en Galice.

Remerciements

Merci au bureau d'étude Aqua-Logic qui a réalisé la détermination des proies des contenus stomacaux.

Nous tenons à remercier l'ensemble des pêcheurs et citoyens qui ont déclarés des captures accidentelles ou des observations, leur rôle de sentinelle étant primordial pour la survie de l'espèce.

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des données brutes du nombre de captures toutes espèces confondues au cours des campagnes Sturat 2017. Il s'agit du nombre d'individus capturés, données brutes non vérifiées.

Le nombre de mulets porc (*Liza ramada*) ainsi que celui des maigres, dans une moindre mesure, est sous-estimée dans ce tableau car une partie des captures est également estimée en poids.

Les espèces migratrices anadromes et catadromes sont surlignées en gris.

| Nom espèces | Nombre d'individus capturés en 2017 |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Acipenser sturio</i> | 33 |
| <i>Alosa alosa</i> | 21 |
| <i>Alosa alosa, Alosa fallax</i> | 1 |
| <i>Alosa fallax</i> | 326 |
| <i>Anguilla anguilla</i> | 395 |
| <i>Argyrosomus regius</i> | 4308 |
| <i>Barbus barbus</i> | 4 |
| <i>Chelidonichthys lucernus</i> | 4 |
| <i>Chelon</i> | 7 |
| <i>Ciliata mustela</i> | 6 |
| <i>Clupea harengus</i> | 1 |
| <i>Conger conger</i> | 45 |
| <i>Dicentrarchus labrax</i> | 154 |
| <i>Dicentrarchus punctatus</i> | 211 |
| <i>Engraulis</i> | 1 |
| <i>Engraulis encrasicolus</i> | 31 |
| <i>Glyptocephalus cynoglossus</i> | 1 |
| <i>Gobiidae</i> | 62 |
| <i>Liza ramada</i> | 2351 |
| <i>Merlangius merlangus</i> | 220 |
| <i>Petromyzon marinus</i> | 3 |
| <i>Platichthys flesus</i> | 53 |
| <i>Pleuronectes platessa</i> | 1 |
| <i>Pomatoschistus</i> | 128 |
| <i>Pomatoschistus minutus</i> | 36 |
| <i>Raja clavata</i> | 140 |
| <i>Raja undulata</i> | 3 |
| <i>Solea solea</i> | 348 |
| <i>Spondyliosoma cantharus</i> | 1 |
| <i>Sprattus sp.</i> | 1 |
| <i>Sprattus sprattus</i> | 63 |
| <i>Syngnathidae</i> | 1 |
| <i>Syngnathus acus</i> | 1 |
| <i>Syngnathus rostellatus</i> | 3 |
| <i>Trachurus trachurus</i> | 1 |
| <i>Trisopterus luscus</i> | 4 |
| <i>Umbrina canariensis</i> | 17 |

Chapitre VI: Actions de communication en 2017 dans le cadre du Plan National d'Actions

Jatteau Ph., Lambert G.

VI.1 Actions de communication grand public – présence dans les médias

Les recherches dans le « press-book » Irstea, sur internet, ont permis de repérer les productions papier, web, radio ou télévision suivantes :

VI.1.1 Presse format papier

1. Lynx, ours brun, esturgeon ... Quelles espèces risquent de disparaître en France ?
Libération 11 juillet 2017 –
http://www.liberation.fr/planete/2017/07/11/lynx-ours-brun-esturgeon-quelles-especes-risquent-de-disparaitre-en-france_1583167
1. La folle histoire de l'esturgeon – Sud-Ouest le Mag N°250, 20 janvier 2017
2. L'esturgeon européen capable de s'acclimater à la pollution et aux changements climatiques – RSE Magazine, 8 septembre 2017
3. Lorient : Un esturgeon dans les langoustines – Sud-Ouest, 21 octobre 2017
<https://www.ouest-france.fr/bretagne/lorient-56100/lorient-un-esturgeon-dans-les-langoustines-5327023>
4. Un pesquero captura en aguas coruñesas un ejemplar de esturión extinguido en Galicia – La opinión a Coruña, 9 mai 2017
<http://www.laopinioncoruna.es/mar/2017/05/09/pesquero-captura-aguas-corunesas-ejemplar/1179171.html>

Un esturgeon a été capturé en Galice, en mai 2017. Il a fait l'objet de nombreuses publications dans la presse régionale. Les prélèvements récupérés par Irstea (génétique, rayon de la pectorale) ont permis de déterminer que ce poisson appartenait à la cohorte 2009.

VI.1.2 Actualités WEB

Actualités Irstea – 4 septembre 2017

L'esturgeon européen, capable de s'adapter à la pollution et aux changements climatiques
<http://www.irstea.fr/toutes-les-actualites/departement-eaux/esturgeon-europeen-pollution-climat-sturtop>

VI.1.3 Actualités télévision

<https://www.youtube.com/watch?v=ZGsfZPm66Fk>

Esturgeon – Estuaire de la Gironde - Emission Curieuse de nature, Ushuaïa TV - Diffusion : 23 avril 2017

VI.4 Actions de communications scientifiques

VI.4.1 Colloque

VI.4.1.1 Colloque de clôture du projet ANR Sturtop

Mercredi 22 mars 2017 - Université de Bordeaux, Pessac

<http://sturtop.irstea.fr/fr/resultats-publications/#Communications>

Programme du colloque :

14h : Accueil et introduction

Représentants de l'ONEMA, Agence de l'eau, Dreal, ANR, région Nouvelle Aquitaine

14h15 : Présentation générale des objectifs et attendus du projet Sturtop

E. Rochard, IRSTEA, UR EABX

14h30 : Qualité des habitats des premiers stades de vie de l'esturgeon Européen en Dordogne, Garonne et Gironde

E. Rochard IRSTEA EABX et A. Coynel, Univ. Bordeaux, UMR EPOC

15h : Sensibilité des premiers stades de développement de l'esturgeon européen à la pollution, hypoxie et accroissement des températures de surface

J. Cachot, Univ. Bordeaux, UMR EPOC

15h30 : Capacité de survie des juvéniles d'esturgeon en Garonne et en Dordogne

C. Lefrancois, Univ. De La Rochelle, UMR LIENSs

16h : Pause-café

16h30 : Etat de santé et imprégnation chimique des esturgeons européens dans l'estuaire de Gironde

M.L. Acolas, IRSTEA, UR EABX

17h00 : Modélisation des effets du réchauffement climatique, de l'hypoxie et de la pollution sur la dynamique de la population d'esturgeon européen en Gironde

P. Lambert, IRSTEA, UR EABX

17h30 : Discussion générale

Quels enseignements peut-on tirer de ce projet, quels questionnements restent en suspens, quelles perspectives pour la suite ?

J. Cachot et E. Rochard

18h00 : fin de journée

VI.4.1.2 ISS8 8th International Symposium on Sturgeons,

10-16 septembre 2017, Vienne, Autriche

Présentations orales

Acolas Marie-Laure, Carrera-Garcia Erika, Le Pichon Céline, Rochard Eric. Downstream migration of stocked young of year European sturgeon *Acipenser sturio* in the Gironde-Garonne-Dordogne aquatic system: knowledge acquired thanks to acoustic telemetry. ISS8 8th International Symposium on Sturgeons, September 10-16 2017, Vienna, Austria.

Acolas Marie-Laure, Le Barh Romaric, Roques Séverine, Lambert Patrick, Bigot Jean-François, Gazeau Christine, Rochard Eric, Jatteau Philippe, Mas Lise, Souben Jérémie, Michelet Nicolas. Post release monitoring strategies for *Acipenser sturio* in France. ISS8 8th International Symposium on Sturgeons - Workshop « Stock assessment » - ISS8 - Vienna - 13th September 2017.

Roques S., Chancerel E., Boury C., Rochard E., Acolas M.L. From microsatellites to SNP markers for the conservation and genetic monitoring of the critically endangered European sturgeon (*A. sturio*). ISS8 8th International Symposium on Sturgeons, September 10-16 2017, Vienna, Austria.

Posters

Acolas Marie-Laure, Vega Joanna, Lassalle Géraldine. Feeding ecology of the European sturgeon sustained population in the Gironde estuary. ISS8 8th International Symposium on Sturgeons, September 10-16 2017, Vienna, Austria

Acolas Marie-Laure, Le Barh Romaric, Roques Séverine, Bigot Jean-François, Gazeau Christine, Rochard Eric, Jatteau Philippe, Mas Lise, Souben Jérémie, Michelet Nicolas. Importance of monitoring methods in a restoration program: case study on *Acipenser sturio* sustained population. ISS8 8th International Symposium on Sturgeons, September 10-16 2017, Vienna, Austria.

Carrera-García Erika, Rochard Eric, Acolas Marie-Laure. European sturgeon young of the year performance in different rearing environments – a study within a stocking program. ISS8 8th International Symposium on Sturgeons, September 10-16 2017, Vienna, Austria.

VI.4.2 Publications

CARRERA GARCIA, E., KORDEK, J., GESSET, C., JACOBS, L., ACOLAS, M.L. - 2017. Tracking juvenile sturgeon in the wild: Miniature tag effects assessment in a laboratory study on Siberian sturgeon (*Acipenserbaerii*). *Fisheries Research*, vol. 186, p. 337-344

ACOLAS, M.L., LE PICHON, C., ROCHARD, E. - 2017. Spring habitat use by stocked one year old European sturgeon *Acipenser sturio* in the freshwater-oligohaline area of the Gironde estuary. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, vol. 196, p. 58-69

CARRERA GARCIA, E., ROCHARD, E., ACOLAS, M.L. - 2017. Effects of rearing practice on post-release young-of-the-year behavior: *Acipenser sturio* early life in freshwater. *Endangered Species Research*, vol. 34, p. 269-281

Références bibliographiques

- Acolas, M. L. (2012). Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* ; bilan scientifique et technique 2011. p. 61. Bordeaux: Irstea.
- Acolas, M. L. (2013). Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* ; Bilan scientifique et technique 2012., p. 75: Irstea Bordeaux, étude N°153.
- Acolas, M. L. (2017a). *Données de présence de l'esturgeon européen Acipenser sturio au sein et à proximité du site N2000 Hourtins-Carcans*: Irstea CNPMEM IMA.
- Acolas, M. L. (2017b). *Données de présence de l'esturgeon européen Acipenser sturio dans l'espace du parc naturel Marin Gironde Pertuis.*: Irstea CNPMEM IMA.
- Acolas, M. L., Gessner, J. & Rochard, E. (2013). Chapitre I - Etat récapitulatif des stocks ex situ allemands et français. In *Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen Acipenser sturio ; bilan scientifique et technique 2012* (Acolas, M. L., ed.), pp. 9-13. Bordeaux: Irstea, Etude N° 153.
- Acolas, M. L., Le Barh, R., Vega, J., Roques, S., Gazeau, C., Jatteau, P., Lassalle, G., Mas, L., Souben, J., Bigot, J. F. & Ballion, B. (2017). Suivi de la population d'esturgeon européen en milieu naturel - Focus sur les échantillonnages 2015 et 2016. In *Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen Acipenser sturio - bilan scientifique et technique 2016* (Jatteau, P., ed.), pp. 68-81. Bordeaux: Irstea, Etude N°196.
- Acolas, M. L., Roqueplo, C., Rouleau, E. & Rochard, E. (2011). Post release monitoring techniques. In *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio L., 1758* (Williot, P., Rochard, E., Desse-Berset, N., Kirschbaum, F. & Gessner, J., eds.), pp. 407-416. Berlin Heidelberg: Springer.
- Acolas, M. L., Rouleau, E., Le barh, R., Bigot, J. F., ballion, B., Gessner, C. & E., R. (2012). Suivi de la population d'esturgeons européens. In *Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen Acipenser sturio; bilan scientifique et technique 2011*. (Acolas, M. L., ed.), pp. 24-32. Bordeaux: Irstea, Etude N° 150.
- Attard, C., Brauer, C., Sandoval-Castillo, J., Faulks, L., Unmack, P., Gilligan, D. & Beheregaray, L. (2018). Ecological disturbance influences adaptive divergence despite high gene flow in golden perch (*Macquaria ambigua*): Implications for management and resilience to climate change. *Molecular Ecology* **27**, 196-215.
- Babin, C., Gagnaire, P., Pavey, S. & Bernatchez, L. (2017). RAD-Seq Reveals Patterns of Additive Polygenic Variation Caused by Spatially-Varying Selection in the American Eel (*Anguilla rostrata*). *Genome Biol Evol* **9**, 2974-2986.
- Ballou, J. (1992). Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology* **29**, 19-25.

- Ballou, J. & Lacy, R. (1995). Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in pedigreed populations. In *Population Management for Survival & Recovery. Analytical Methods and Strategies in Small Population Conservation*. (J.D. Ballou, M. G., and T.J. Foose (eds.), ed.), pp. 76-111. New York: Columbia University Press.
- Barton, N. (2001). The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* **10**, 551-568.
- Belén Jiménez-Mena, B., Schad, K., Hanna, N. & Lacy, R. (2016). Pedigree analysis for the genetic management of group-living species. *Ecology and Evolution* **6**, 3067-3078.
- Bierne, N., Bonhomme, F. & Arnaud-Haond, S. (2016). Dedicated population genomics for the silent world: The specific questions of marine population genetics. *Current Zoology* **62**, 545-550.
- Bonduriansky R, C. S. (2009). Intralocus sexual conflict. *Trends in Ecology and Evolution* **24**, 280-288.
- Boscari, E. & Congiu, L. (2014). The need for genetic support in restocking activities and ex situ conservation programmes: the case of the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii* Bonaparte, 1836) in the Ticino River Park. *Journal of Applied Ichthyology* **30**, 1416-1422.
- Brevé, N. W. P., Vis, H., Houben, B., de Laak, G. A. J., Breukelaar, A. W., Acolas, M. L., de Bruijn, Q. A. A. & Spierts, I. (2014). Exploring the possibilities of seaward migrating juvenile European sturgeon *Acipenser sturio* L., in the Dutch part of the River Rhine. *Journal of Coastal Conservation* **18**, 131-143.
- Brosse, L., Dumont, P., Lepage, M. & Rochard, E. (2002). Evaluation of a gastric lavage method for sturgeons. *North American Journal of Fisheries Management* **22**, 955-960.
- Caballero, A. & Toro, M. (2000). Interrelations between effective population size and other pedigree tools for the management of conserved populations. *Genet Res* **75**, 331-343.
- Chassaing, O., Desse-Berset, N., Duffraisie, M., Hughes, S., Hänni, C., Berrebi, P. & McClain, C. (2013). Palaeogenetics of western French sturgeons spotlights the relationships between *Acipenser sturio* and *Acipenser oxyrinchus*. *Journal of Biogeography* **40**, 382-393.
- Chèvre, P., Jacob, L., Gesset, C., Polèse, F., Bons, S., Tillaut, R. & Gauthier, J. (2016). Bilan des reproductions assistées réalisées en 2015 à partir du stock captif d'esturgeon européen. In *Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* ; bilan scientifique et technique 2015* (Jatteau, P., ed.), pp. 13-31. Bordeaux: Irstea, Etude N°191.
- Christie, M., Marine, M., Fox, S., French, R. & Blouin, M. (2016). A single generation of domestication heritably alters the expression of hundreds of genes. *Nat Commun* **7**.
- De Cara, M. A., Fernandez, J., Toro, M. A. & Villanueva, B. (2011). Using genome-wide information to minimize the loss of diversity in conservation programmes. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **128**, 456-464.

Dorsey, K. M., Guthrie, H. D., Welch, G. R., Mohler, J., Theisen, D. D., Siewerdt, F., Vinyard, B. T. & Woods, L. C. (2011). Quality Assessment of Wild Atlantic Sturgeon Semen under Conditions of Short-Term Storage. *North American Journal of Aquaculture* **73**, 418-425.

Dreal (2011). Plan National d'Actions en faveur de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* 2011-2015. p. 69: Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable -DREAL Aquitaine.

Elvira, B., Leal, S., Doadrio, I. & Almodóvar, A. (2015). Current Occurrence of the Atlantic Sturgeon *Acipenser oxyrinchus* in Northern Spain: A New Prospect for Sturgeon Conservation in Western Europe. *PLoS ONE* **10**: e0145728.

Frankham, R., Ballou, J. & Briscoe, D. (2010). *Introduction to conservation genetics*.

Gesner, J., Williot, P., Rochard, E., Freyhof, J. & Kottelat, M. (2010). *Acipenser sturio*. In *The IUCN Red List of Threatened Species 2010*.

Gessner, J., Tautenhahn, M., Von Nordheim, H. & Borchers, T. (2010). Plan national d'actions pour la protection et la conservation de l'Esturgeon européen (*Acipenser sturio*). p. 86. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Rostock: Gesellschaft zur Rettung des Störes *Acipenser sturio* L. .

Ginsburg, A. S. (1968). *Fertilization in fishes and the problem of polyspermy*. Moscow: Nauka.

Goncharov, B. F., Skoblina, M. N., Trubnikova, O. B. & Vassetzky, S. G. (2009). *Hormonal Induction of Ovulation In Vitro in Sturgeon Fishes*. Dordrecht: Springer.

Gui, J. & Zhu, Z. (2012). Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals *Chinese Science Bulletin* **57**, 1751-1760.

Hale, M. C., Jackson, J. R. & Dewoody, J. A. (2010). Discovery and evaluation of candidate sex-determining genes and xenobiotics in the gonads of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Genetica* **138**, 745-756.

Havelka, M., Kašpar, V., Hulák, M. & Flajšhans, M. (2011). Sturgeon genetics and cytogenetics: a review related to ploidy levels and interspecific hybridization. *Folia Zoologica* **60**, 93-103.

Horvath, A., Chèvre, P. & Urbanyi, B. (2011). Sperm cryopreservation in sturgeon with a special focus on *A. sturio*. In *Biology and Conservation of the European sturgeon Acipenser sturio L. 1758: the reunion of the European and Atlantic sturgeons* (Williot, P., Rochard, E., Desse-Berset, N., Kirschbaum, F. & Gessner, J., eds.), pp. 465-475: Springer.

Horvath, A., Urbanyi, B., Mims, S. D., Bean, W. B., Gomelsky, B. & Tiersch, T. R. (2006). Improved cryopreservation of sperm of paddlefish (*Polyodon spathula*). *Journal of the World Aquaculture Society* **37**, 356-362.

Horvath, A., Wayman, W. R., Urbanyi, B., Ware, K. M., Dean, J. C. & Tiersch, T. R. (2005). The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species. *Aquaculture* **247**, 243-251.

Jatteau, P. (2014). Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* ; bilan scientifique et technique 2013. p. 112. Bordeaux: Irstea.

Jatteau, P. (2015). Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* ; bilan scientifique et technique 2014. p. 133. Bordeaux: Irstea.

Jatteau, P. (2016). Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* ; bilan scientifique et technique 2015. p. 61. Bordeaux: Irstea.

Jatteau, P., Rochard, E., Lepage, M. & Gazeau, C. (2011). Chapter 23 Age assessment in European sturgeon. In *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* (Williot, P., Rochard, E., Desse-Berset, N., Kirschbaum, F. & Gessner, J., eds. , ed.), pp. 343-348: Springer.

Johnston, L. & Lacy, R. (1995). Genome resource banking for species conservation: selection of sperm donors. *Criobiology* **32**, 68-77.

Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., Fujita, M., Suetake, H., Suzuki, S., Hosoya, S., Tohari, S., Brenner, S., Miyadai, T., Venkatesh, B., Suzuki, Y. & Kikuchi, K. (2012). A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). . *PLoS Genetics* **8**: e1002798.

Kirschbaum, F., Williot, P., Fredrich, F., Tiedemann, R. & Gessner, J. (2011). Chapter 21 Restoration of the European sturgeon *Acipenser sturio* in Germany. In *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio* (Williot, P., Rochard, E., Desse-Berset, N., Kirschbaum, F. & Gessner, J., eds. , ed.), pp. 309-334: Springer.

Kitada, S., Shishidou, H., Sugaya, T. e. a., Kitakado, T., Hamasaki, K. & Kishino, H. (2009). Genetic effects of long-term stock enhancement programs. *Aquaculture* **290**, 69-79.

Kolman, R., Kapusta, A. & Duda, A. (2011). Re-establishing the Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* Mitchill) in Poland. In *Biology and conservation of the Atlantic European sturgeon Acipenser sturio L., 1758* (Williot, P., Rochard, E., Desse-Berset, N., Kirschbaum, F. & Gessner, J., eds.), pp. 439-448: Springer Berlin Heidelberg.

Lacy, R. C., Ballou, J. D. & Pollak, J. P. (2012). PMx: software package for demographic and genetic analysis and management of pedigreed populations. *Methods in Ecology and Evolution* **3**, 433-437.

Magnin, E. (1962). Recherches sur la systématique de la biologie des Acipenséridés. . *Annales de la station centrale d'hydrobiologie appliquée* **9**.

Mank, J. & Avise, J. (2009). Evolutionary Diversity and Turn-Over of Sex Determination in Teleost Fishes. *Sexual Development* **3**, 7-60.

Marker, L., Boast, L. & Schmidt-Kuentzel, A. (2017). *Cheetahs: Biology and Conservation (Biodiversity of the World: Conservation from Genes to Landscapes)*: Academic Press.

McGowan, P. J. K., Traylor-Holzer, K. & Leus, K. (2017). IUCN Guidelines for Determining When and How Ex Situ Management Should Be Used in Species Conservation. *Conservation Letters* **10**, 361-366.

Mei, J. & Gui, J. F. (2015). Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish. *Sci China Life Sci* **58**, 124-136.

Ogden, R., Gharbi, K., Mague, N., Martinsohn, J., Senn, H., Davey, J., Pourkazemi, M., McEwing, R., Eland, C., Vidotto, M., Sergeev, A. & Congiu, L. (2013). Sturgeon conservation genomics: SNP discovery and validation using RAD sequencing. *Molecular Ecology* **22**, 3112-3123.

Parsch, J. & Ellegren, H. (2013). The evolutionary causes and consequences of sex-biased gene expression. *Nature Review Genetics* **14**, 83-87.

Peakall, R. & Smouse, P. (2012). GENALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* **28**, 2537-2539.

Psenicka, M., Dietrich, G. J., Wojtczak, M., Nynca, J., Rodina, M., Linhart, O., Cosson, J. & Ciereszko, A. (2008). Acrosome staining and motility characteristics of sterlet spermatozoa after cryopreservation with use of methanol and DMSO. *Cryobiology* **56**, 251-253.

Qiwei, W. (2010). *Acipenser sinensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T236A13044272.

Ralls, K. & Ballou, J. (1986). Captive breeding programs for populations with a small number of founders. *Trends Ecol Evol*, 19-22.

Rochard, E., ed. (2009). *Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen Acipenser sturio ; bilan scientifique et technique 2008*. Bordeaux: Cemagref, Etude N°133.

Rochard, E., ed. (2011). *Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen Acipenser sturio ; bilan scientifique et technique 2009*. Bordeaux: Cemagref, Etude N°141.

Rochard, E. & Jatteau, P. (1991). Amélioration de la méthode de détermination de l'âge de l'esturgeon commun *Acipenser sturio* et premières applications. In *Acipenser, Actes du premier colloque international sur l'esturgeon* (Williot, P., ed.), pp. 193-208. Bordeaux: Cemagref Publication, Antony, France.

Rochard, E., Lepage, M., Dumont, P., Tremblay, S. & Gazeau, C. (2001). Downstream migration of juvenile European sturgeon *Acipenser sturio* L. in the Gironde estuary. *Estuaries* **24**, 108-115.

Rochard, E. & Williot, P. (2006). Actions de recherches proposées pour contribuer au plan international de restauration de l'esturgeon européen *Acipenser sturio*. p. 51. Bordeaux: Cemagref.

Roques, S., Berrebi, P. & Acolas, M. (2015). Caractérisation génétique de l'esturgeon européen et assignation parentale : implications pour le Plan National d'Actions : chapitre

VIII. . In *Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen Acipenser sturio : bilan scientifique et technique 2014* (Jatteau, P. e., ed.), pp. 99-118.

Roques, S., Berrebi, P., Chancerel, E., Boury, C., Gonzalez, P., Rochard, E. & Acolas, M. (2017). Evaluation comparative des marqueurs microsatellites et SNPs pour les analyses de consanguinité, de parenté et d'assignation chez l'esturgeon Européen (*Acipenser sturio*): utilité pour le suivi génétique à long terme des programmes d'élevage et de repeuplement: Chapitre IV In *Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen Acipenser sturio : bilan scientifique et technique 2016* (Jatteau, P. e., ed.).

Roques, S., Berrebi, P., Chevre, P., Rochard, E. & Acolas, M. L. (2016). Parentage assignment in the critically endangered European sturgeon (*Acipenser sturio*) based on a novel microsatellite multiplex assay: a valuable resource for restocking, monitoring and conservation programs. *Conservation Genetics Resources* **8**, 313-322.

Roques, S., Berrebi, P., Rochard, E. & Acolas, M. (2018a). Genetic monitoring for the successful restocking of species with low diversity: the case of the critically endangered european sturgeon, *Acipenser sturio*. *Biological Conservation* **221**, 91-102.

Roques, S., Chancerel, E., Boury, C., Maud, P. & Acolas, M. (2018b). From microsatellites to SNPs for the genetic management of a critically endangered sturgeon species *Ecology and Evolution* (submitted).

Rosenthal, H., Bronzi, P., Gessner, J., Moreau, D. & Rochard, E. (2007). Action plan for the conservation and the restoration of the european sturgeon. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats (Berne Convention). p. 125. Council of Europe Publishing: Nature and Environment N°152.

Rouault, T., Chèvre, P., Rochard, E., Jatteau, P., Jacobs, L. & Gonthier, P. (2008). Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* ; bilan scientifique et technique 2007. p. 79: Cemagref de Bordeaux.

Sanchez-Rodriguez, M. & Billard, R. (1977). Conservation de la motilité et du pouvoir fécondant du sperme de truite arc en ciel maintenu à des températures voisines de 0°C. *Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture* **265**, 143-152.

Schenekar, T. & Weiss, S. (2017). Selection and genetic drift in captive versus wild populations: an assessment of neutral and adaptive (MHC-linked) genetic variation in wild and hatchery brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Conservation Genetics* **18**, 1011-1022.

Thrower, F. P. & Hard, J. J. (2008). Effects of a single event of close inbreeding on growth and survival in steelhead. *Conservation Genetics* **10**, 1299-1307.

Vargas, A., Sánchez, I., Martínez, F., Rivas, A., Godoy, J., Roldan, E., Simon, M., Serra, R., PÉRez, M., EnseÑAt, C., Delibes, M., Aymerich, M., Sliwa, A. & Breitenmoser, U. (2008). *The Iberian lynx Lynx Pardinus Conservation Breeding Program*.

- Vega, J. (2016). Etude de la capacité d'accueil trophique de l'estuaire de la Gironde pour les juvéniles d'esturgeon européen *Acipenser sturio*. . p. 49: Université de Lille 1 et Université du littoral Côte d'opale.
- Wang, J. (2011). COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* **11**, 141-145.
- Waters, C., Hard, J., Briec, M., Fast, D., Warheit, K., Knudsen, C., Bosch, W. & Naish, K. (2018). Genomewide association analyses of fitness traits in captive-reared Chinook salmon: Applications in evaluating conservation strategies. *Ecological Applications*.
- Williams, T. & Carroll, S. (2009). Genetic and molecular insights into the development and evolution of sexual dimorphism. . *Nature Review Genetics* **10**, 797-804
- Williot, P., Rochard, E., Castelnaud, G., Rouault, T., Brun, R., Lepage, M. & Elie, P. (1997). Biological characteristics of European Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio*, as the basis for a restoration program in France. *Environmental Biology of Fishes* **48**, 359-372.
- Williot, P., Rochard, E., Rouault, T. & Kirschbaum, F. (2009). *Acipenser sturio* Recovery Research Actions in France. In *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons* (Carmona, R., Domezain, A., Garcia Gallego, M., Hernando-Casal, J., Rodriguez, F. & Ruiz Rejon, M., eds.), pp. 247-263: Springer.
- Williot, P., Rouault, T., Pelard, M., Mercier, D., Lepage, M., Davail-Cuisset, B., Kirschbaum, F. & Ludwig, A. (2007). Building a broodstock of the critically endangered sturgeon *Acipenser sturio*: Problems and observations associated with the adaptation of wild-caught fish to hatchery conditions. *Cybium* **31**, 3-11.
- Willoughby, J. R., Fernandez, N. B., Lamb, M. C., Ivy, J. A., Lacy, R. C. & DeWoody, J. A. (2015). The impacts of inbreeding, drift and selection on genetic diversity in captive breeding populations. *Mol Ecol* **24**, 98-110.
- Witzenberger, K. A. & Hochkirch, A. (2011). Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodiversity and Conservation* **20**, 1843-1861.
- Yarmohammadi, M., Pourkazemi, M., Kazemi, R., Ali, M., Sadati, Y., Hallajian, A. & Saber, M. (2017). Sex steroid level and sexual dimorphism expression of genes in gonads of the great sturgeon *Huso huso* Linnaeus, 1758 during maturity developmental stages. *Aquaculture Research* **48**, 1413-1429.